



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**PERİODONTİTİS PATOGENEZİNİN MAKROFAJ FENOTİPLERİ
(M1-M2) İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Hayrunnisa KASAP

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Doç. Dr. Hatice BALCI YÜCE

TOKAT-2021



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**PERİODONTİTİS PATOGENEZİNİN MAKROFAJ FENOTİPLERİ
(M1-M2) İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Hayrunnisa KASAP

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Doç. Dr. Hatice BALCI YÜCE

TOKAT-2021

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(15/02/2021)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Hayrunnisa KASAP

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimin tüm aşamalarında büyük katkıları olan ve eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Hatice BALCI YÜCE'ye;

Eğitimim süresince ve bu uzmanlık tezinin yazılması sırasında bilgilerini benden esirgemeyen, tecrübe önerilerini her zaman içtenlikle benimle paylaşan, üzerimde büyük emeği olan değerli hocam Mehmet Murat TAŞKAN'a;

Klinik bilgi ve deneyimleri ile uzmanlık eğitimime ışık tutan, desteğini her zaman hissettiğim hocam Dr. Öğr. Üyesi Özkan KARATAŞ'a,

Laboratuvar aşamalarında ve analizlerimizde bize yardımcı olan ve değerli zamanını bizimle özveri ile paylaşan Doç. Dr. Fikret GEVREK ve Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a;

Desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her anımda yanımda olan, uzmanlık eğitiminin bana kattığı en güzel insan Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA ve kızı Buket YÜKSEKKAYA'ya;

Dostluğunu her zaman hissettiğim, tüm anılarımin dinleyicisi Arş. Gör. Amine KÜÇÜKİLHAN'a;

Bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi, güvenlerini her zaman üzerimde hissettiğim emeklerini asla ödeyemeyeceğim, canım annem Hacer KASAP ve canım babam Hayati KASAP'a;

Güvenlerini her zaman hissettiren, varlıklarıyla bana güç veren canım kardeşlerim Oğuzhan KASAP ve Burakcan KASAP'a;

Sonsuz teşekkürler...

ÖZET*

Periodontitis Patogenezinin Makrofaj Fenotipleri (M1-M2) İle İlişkisinin

Araştırılması

Amaç: Bu tez çalışmasında aynı evre ama farklı derecelerdeki periodontitis vakalarında makrofaj polarizasyonunu gösteren biyobelirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma Grup PER-C: Evre 3 Derece C periodontitisli 15 hasta, Grup PER-B: Evre 3 Derece B periodontitisli 15 hasta, Grup S: 15 sağlıklı bireyden oluşmak üzere toplamda 45 bireyden oluşan 3 grupta yapılmıştır. Hastaların detertraj ve subgingival küretaj işlemini içeren periodontal tedavileri esnasında, diş eti büyümesi ve gingivektomi endikasyonu konulmuş olan veya preprotetik olarak kron boyu uzatma operasyonu ihtiyacı olan alanlardan eksize edilen 2x2mm diş eti örnekleri elde edildi. Diş eti örnekleri her hastada hastalıktan etkilenmiş bölgelerden iki adet, toplamda ise 15 hastadan 30 adet örnek olacak şekilde alındı. Örnekler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve immünohistokimya yöntemleri ile incelendi. PZR incelemelerinde İnterlökin (IL) -12,23,10 ve Arginin (Arg)-1 biyobelirteçleri, immünohistokimya analizlerinde CCR-7, CD 206, CD 163 biyobelirteçleri incelenmiştir.

Bulgular: Gruplar arasında yaş ve cinsiyette istatistiksel olarak fark yoktu. Plak İndeksi (Pİ), Gingival İndeks (Gİ), bukkal cep derinliği, ataçman seviyesi değerlendirildiğinde Grup PER –B ve Grup PER-C’ de Grup S’e göre anlamlı derecede yüksek değerler bulundu ($p<0,05$). Grup PER-C ve Grup PER-B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Gruplar arası CD206 ve CD163 biyobelirteçleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). CCR7 seviyesi değerlendirildiğinde Grup PER-B ve Grup PER-C’ de grup S’ye göre anlamlı derecede

yüksek değerler tespit edildi ($p<0,05$). Grup PER-B ve Grup PER-C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). PZR verileri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). IL-12,23,10 ve Arg-1 Grup PER-C de diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek tespit edildi.

Sonuç: Makrofajların hem M1 hem de M2 fenotiplerinin periodontitiste artış gösterdiğini ancak fenotipik değişimin yüksek oranda M1 makrofajlarına doğru olduğunu göstermektedir. Bu da enflamasyon bulunan dokularda her iki makrofaj fenotipinde artışı yansıtmakla beraber M1 makrofajda daha yüksek oranda artış olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: M1 makrofaj, M2 makrofaj, Periodontitis, CCR7, CD206

Hayrunnisa KASAP, Uzmanlık Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Tokat, 2021

ABSTRACT*

Evaluation of the Relationship of Periodontitis Pathogenesis with Macrophage Phenotypes (M1-M2)

Objective: The aim of this thesis study was to determine the biomarkers showing macrophage polarization in gingival tissue samples of periodontitis patients at the same stage but at different grades and healthy individuals.

Method: This study was consisted of 45 participants and three study groups as; Group 1: PER-C: 15 patients with Stage 3 Grade C periodontitis, Group 2: PER-B: 15 patients with Stage 3 Grade B periodontitis, Group 3: Group S: 15 healthy individuals. During the non-surgical periodontal treatments of the patients, 2x2mm gingiva samples were collected from areas that were indicated for gingivectomy or were preprotetically needing a crown lengthening operation. Samples were collected from the affected areas in each patient. Two samples from each participant were taken from the affected areas, and 30 samples from 15 patients in total were collected for each study group. The samples were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and immunohistochemistry methods. Interleukin (IL)-12,23,10 and Arginine (Arg) -1 biomarkers were analyzed by PCR, and CCR-7, CD 206, CD 163 biomarkers in immunohistochemistry analyzes.

Results: There is no statistically significant difference in age and gender among the groups. When Plaque Index (PI), Gingival Index (GI), buccal pocket depth and attachment level were evaluated, significantly higher values were found in Group PER - B and Group PER-C compared to Group S ($p < 0.05$). There was no significant difference between Group PER-C and Group PER-B ($p > 0.05$). When the CD206 and CD163 biomarkers among the groups were evaluated, no significant difference was found

($p>0.05$). CCR7 level was found to be significantly higher in Group PER-B and Group PER-C compared to group S ($p <0.05$). There was no significant difference between Group PER-B and Group PER-C ($p> 0.05$). When the PCR data were evaluated, a statistically significant difference was found among the groups ($p <0.05$). IL-12,-23,-10 and Arg-1 were found significantly higher in Group PER-C compared to other groups ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that both M1 and M2 phenotypes of macrophages increased in periodontitis, but the phenotypic change was highly towards to the M1 macrophages. This may reflect an increase in both macrophage phenotypes in tissues with inflammation, but a higher increase in M1 macrophage cells.

Keywords: M1 macrophage, M2 macrophage, Periodontitis, CCR7, CD206

Hayrunnisa KASAP, Thesis

Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Dentistry

Tokat, 2021

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET*	iii
ABSTRACT*	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Periodonsiyum	4
2.2. Periodontal Hastalık	5
2.2.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması	7
2.3. Periodontitis ve Periodontal Hastalık Patogenezi	10
2.3.1. Periodontitis Patogenezinde Enflamasyonun Yeri	12
2.3.2. Makrofajlar ve Enflamasyon	16
2.3.3. Makrofaj Plastitesi ve Polarizasyonu	23
2.4. Hipotez	32
2.5. Amaç	32

3. MATERİYAL VE METOT.....	34
3.1. Çalışma Grupları	34
3.2. Hasta Seçimi.....	35
3.3. Klinik Periodontal Ölçümler	37
3.3.1. Plak İndeksi (PI).....	37
3.3.2. Gingival İndeks (GI).....	37
3.3.3. Sondlama Cep Derinliği (CD).....	38
3.3.4. Sondlamada Kanama.....	38
3.4. İmmünohistokimya Analizi.....	39
3.5. RT-PZR Yöntemi	40
3.6. İstatiksel Analiz.....	43
4.BULGULAR.....	45
4.1. Klinik Bulgular.....	45
4.2. İmmünohistokimya Bulguları	47
4.3. RT-PZR Bulguları.....	49
5. TARTIŞMA.....	53
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKÇA.....	63
EKLER	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1.: Periodontal Ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması 2017.	8
Tablo 2. 2.: Periodontitisin Formları.....	9
Tablo 2. 3.: Fagositozda makrofaj yüzey reseptörleri.....	21
Tablo 2. 4.: İnsan ve farelerde M1 ve M2 fenotipleri.....	32
Tablo 4. 1.: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler	45
Tablo 4. 2.: Çalışmanın immünohistokimyasal verileri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.: Periodonsiyumun gösterimi .	4
Şekil 2. 2.: Periodontitisin oluşum aşamaları.	7
Şekil 2. 3.: Subgingival mikrobiyom.....	12
Şekil 2. 4.: Periodontal doku yıkımı ve enflamasyon.....	13
Şekil 2. 5.: Subgingival mikrobiyom ile enflamatuvar ve immün yanıt arasındaki çift yönlü ilişki	14
Şekil 2. 6.: Fagositoz sırasında makrofaj	22
Şekil 2. 7.: Makrofaj polarizasyon profilleri	24
Şekil 2. 8.: Konak ve mikrobiyal uyarılarla ilgili makrofaj fonksiyonlarının plastisitesi ve polarizasyonu	25
Şekil 2. 9.: M1 ve M2 makrofajının farklı fenotip ve alt sınıfları.....	29
Şekil 4. 1.: Gruplar arası plak ve gingival indeks.....	59
Şekil 4. 2.: Gruplar arası Bukkal Cep derinliği ve Ataçman Seviyesi	47
Şekil 4. 3.: İmmünohistokimya Görüntüleri.....	48
Şekil 4. 4.: İmmünohistokimya verileri.....	49
Şekil 4. 5.: IL-23 PZR sonuçları.....	50
Şekil 4. 6.: IL-12 PZR sonuçları.....	50
Şekil 4. 7.: IL-10 PZR sonuçları.....	51
Şekil 4. 8.: Arg-1 PZR sonuçları	52

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

B: Beta

Y: Gama

α : Alfa

<: Küçük

>: Büyük

%: Yüzde

APC: Antijen sunan hücre

Arg: Arginin

CAL: Klinik ataçman kaybı

CD: Sondlama cep derinliği

COX: Siklooksijenaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOS: Dişeti oluğu sıvısı

F. alocis: *Filifaktör alocis*

Gİ: Gingival indeks

HLA: İnsan lökosit antijeni

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IFN: İnterferon

Ig: İmmünoglobulin

IL: İnterlökin

iNOS: İndüklenebilir nitrit oksit sentaz

LPS: Lipopolisakkarit

LTA: Lipoteikoik asit

MCP: Monosit kemoaktraktan protein

MGI: Modifiye gingival indeks skoru

MHC: Ana histouyumluluk kompleksi

MMP: Matriks metalloproteinaz

NADPH: Nikotinamid adenindinükleotid fosfat

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

NO: Nitrik oksit

O⁻²: Süperoksit

OBr⁻: Hipobromit

OCI⁻: Hipoklorit

OH: Hidroksil radikali

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler paternler

PGE2: Prostoglandin E2

P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

PI: Plak indeksi

P. intermedia: *Prevotella intermedia*

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RANKL: Nükleer faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü

RNA: Ribonükleik asit

RNS: Reaktif azot türleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

STAT: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

T. denticola: *Treponema denticola*

T. forsythia: *Tannerella forsythia*

TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü

Th: Yardımcı T hücreleri

TLR: Toll benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktörü

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

1.GİRİŞ

Periodontitis, disbiyotik plak biyofilmleri ile ilişkili kronik, çok faktörlü enflamatuvar bir hastalıktır ve diş destek dokularında ilerleyen yıkım ile karakterize edilir (Papapanou ve ark., 2018). Epidemiyolojik çalışmalar yetişkin nüfusun %85’inde periodontitis bulgusu olan klinik ataçman kaybı ve radyografik kemik kaybı görüldüğünü bildirmektedir (Özçaka & Bıçakcı, 2010).

2017 yılında yapılan güncel periodontal hastalık sınıflaması;

Sınıflandırmaya göre periodontitis formları;

1.Nekrotizan Periodontal Hastalıklar,

2.Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitisler,

3. Periodontitis, olmak üzere 3 başlık altında incelenmektedir ve periodontitis başlığı evre ve derece olarak gruplandırılmıştır.

a. Evreler: Şiddet ve Kompleksiteye Bağlı

Evre I: Periodontitis Başlangıcı

Evre II: Orta Derecede Periodontitis

Evre III: Diş Kayıplarına Neden Olabilecek Şiddetli Periodontitis

Evre IV: Dentisyonun Tümüyle Kaybedilme Potansiyeli Olan Şiddetli Periodontitis

b. Kapsam ve Dağılım: Lokalize, generalize molar-kesici dağılımı

c. Dereceler: İlerleme riski, tedaviye beklenen yanıt

Derece A: Yavaş ilerleyen

Derece B: Orta hızda ilerleyen

Derece C: Hızlı ilerleyen periodontitis formları (Caton ve ark., 2018a)

Periodontal sağlıkla ilişkili dişeti mikrobiyomu, konak ile dinamik bir denge içerisinde stabildir. Diş eti enflamasyonu, stabil bir enflamatuvar durumdur ve birçok yönden homeostazı temsil eder. Aşırı, kontrolsüz ve kronik enflamasyon, periodontitis olarak bilinen sert ve yumuşak dokuların geri dönüşü olmayan tahribatına neden olur (Van Dyke, Bartold, & Reynolds, 2020).

Mukozal dokular mikrobiyotanın çeşitli bakterileri tarafından yoğun bir şekilde kolonize edilir. Bu bakteri kolonizasyonuna yanıt olarak konakta makrofajlar mikroorganizmalar ile etkileşime giren ilk hücreler olarak bildirilmiştir (Fernando O Martinez, Helming, & Gordon, 2009). Makrofajlar antijen sunucu hücrelerdir, ana histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini eksprese eder ve T hücreleri üzerinde uyarıcı aktiviteye sahiptir (Fernando O Martinez ve ark., 2009).

Makrofajlar immün yanıtı uyarmak için lenf düğümlerine enfeksiyon hakkında önemli bilgiler taşırlar. Makrofajların, çeşitli bakteriyel, viral ve fungal patojenlerin ligandları dahil mikroorganizma ile ilişkili moleküler paternlerin farklı sınıflarını tanıyan patern tanıma reseptörleri kullandıkları bildirilmiştir (Epelman, Lavine, & Randolph, 2014).

Son zamanlarda, makrofaj fenotiplerinin plastisitesi ve lokal dokulardaki doğal ve adaptif immünyetede gerçekleştirdikleri önemli işlevleri vurgulanmaktadır (Fernando O Martinez ve ark., 2009). Bu makrofaj fenotiplerindeki çeşitlilik, lokal konak ortamı ve mikroorganizma çeşitleri tarafından düzenlenir.

Klasik olarak aktive edilen makrofajlar (M1), interferon gama (IFN- γ) ve lipopolisakkaritler (LPS) ile aktive edilir, alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar (M2) IL-4 veya IL-13'e yanıt olarak üretilen makrofajlardır (Fernando O Martinez ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında aynı evre farklı derece periodontitis hastalarında makrofaj fenotiplerinin araştırılması planlanmıştır.



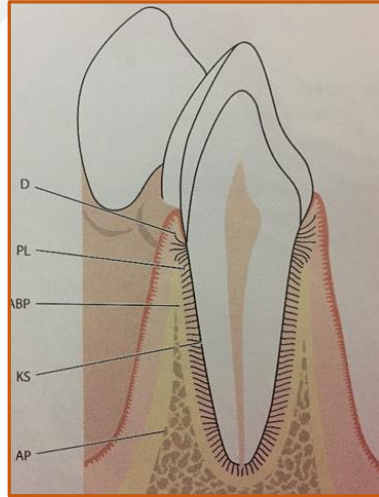
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum dişi destekleyen ve çevreleyen yapılar olarak tanımlanır (Nanci & Bosshardt, 2006).

Periodonsiyum aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır:

- 1) Diş eti,
- 2) Periodontal ligament (PL),
- 3) Kök sementi (KS),
- 4) Kribriform tabaka (Lang & Lindhe, 2015).



Şekil 2. 1.: Periodonsiyumun gösterimi (Lang & Lindhe, 2015).

Periodonsiyumun ana görevi, dişlerin, kemik dokusuna bağlanması ve ağız boşluğundaki çiğneme mukozasının yüzey bütünlüğünün korunması olarak bildirilmiştir

(Lang & Lindhe, 2015). Periodonsiyumun devamlılığı, sağlıklı mikroyapının korunması ve bileşenlerinin birbirleriyle uyumlu bir şekilde devamlılığı ile sağlanabilmektedir.

2.2. Periodontal Hastalık

Periodonsiyumu etkileyen iki yaygın enfeksiyöz hastalık vardır. Bu hastalıklar dentogingival sınırda bakteri birikimi ile ilişkili bulunmuştur (R. C. Page & Schroeder, 1976).

İlk olarak diş eti bağ dokusunun orjinal seviyesinde kaldığı diş etinin enflamasyonu olarak tanımlanan gingivitistir. Hastalık, gingival epitel ve bağ dokusunda sınırlıdır (M. Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2006).

İkincisi ise disbiyotik plak biyofilmleri ile ilişkili kronik, çok faktörlü enflamatuvar bir hastalık olan periodontitistir ve periodontitis diş destek dokularının ilerleyen yıkımı ile karakterize edilir. Başlıca özellikleri, klinik ataçman kaybı (CAL) ve radyografik olarak değerlendirilen alveol kemik kaybı ile ortaya çıkan periodontal doku desteğinin kaybı, periodontal cep oluşumu ve diş eti kanaması olarak tanımlanmıştır (Papapanou ve ark., 2018).

Periodontal dokulardaki ilk enflamasyon, patolojiden ziyade mikrobiyal aktiviteye karşı fizyolojik bir savunma mekanizması olarak düşünülmelidir. Bu aşamadaki hastalığın klinik bulguları, genellikle supragingival ve subgingival plak oluşumuyla birlikte buna eşlik eden diş taşı oluşumu ve diş etinin enflamasyonunu içermektedir. Plak kaldırılırsa, homeostaza geri dönüş sağlandığı; lezyon devam ederse, patolojik durumun devam ettiği tespit edilmiştir (M. G. Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2011).

Periodontitisin oluşum aşamaları:

- Başlangıç lezyonu, lökositlerin ve endotel hücrelerin bakteriyel biyofilme yanıtı olarak tanımlanır. Bu aşamada klinik enflamasyon belirtileri yoktur, ancak dokulardaki değişiklikler histolojik olarak izlenebilir. Bakterilerin metabolik ürünleri, sitokinleri ve nöropeptidleri üretmek, nötronları uyarmak için birleşim epitel hücrelerini uyarak lokal kan damarlarının vazodilatasyonuna yol açar. Nötrofiller damardan ayrılır ve kemokinlere yanıt olarak enflamasyon alanına doğru göç ederler (Cekici, Kantarci, Hasturk, & Van Dyke, 2014; Fiorellini, Ishikawa, & Kim, 2006).
- Erken lezyon, bağ dokusunda nötrofil artışı ve makrofajların, lenfositlerin, plazma hücrelerinin, mast hücrelerinin ortaya çıkması ile izlenen safha olarak tanımlanır. Bütün proteinler aktive edilir. Epitel, histolojik olarak gözlemlenen ve kanama, gingival enflamasyon gibi klinik belirtiler gösteren retepegleri oluşturmak için proliferer olur. Diş eti oluğu sıvısında artış olur (Cekici ve ark., 2014; Fiorellini ve ark., 2006).
- Yerleşik lezyon, doğal immün yanıttan kazanılmış immün yanıtı geçiş olarak tanımlanabilir. Makrofajlar, plazma hücreleri, T ve B lenfositler baskındır, immünoglobulin (Ig) G1 ve Ig G3' de bulunmaktadır. Kan akımı bozulmuş ve kolajenolitik aktivite artmıştır. Ayrıca fibroblastlar tarafından kollajen üretimi de artar. Yerleşik lezyon diş eti kanaması, renk ve kontur değişiklikleri ile birlikte gözüken orta ve şiddetli gingivitis olarak klinik bulgu vermektedir (Cekici ve ark., 2014; Fiorellini ve ark., 2006).

- İleri (ilerlemiş) lezyon, histolojik ve klinik olarak geri dönüşümü olmayan ataçman ve kemik kaybı olarak tanımlanmaktadır. Enflamatuvar lezyon alveol kemiği etkileyerek daha derin dokulara yayılmıştır (Cekici ve ark., 2014; Fiorellini ve ark., 2006).



Şekil 2. 2.: Periodontitisin oluşum aşamaları, MGI (modifiye gingival indeks skoru) MGI 0- Sağlıklı diş eti, MGI 1-Başlangıç lezonu, MGI 2-Erken lezyon, MGI 3-Yerleşik lezyon, Periodontitis -İlerlemiş lezyon (Nowicki ve ark., 2018).

2.2.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

1999 sınıflandırmasının ardından geçen 19 yılda önemli değişiklikler olmuştur. Periodontitisler; kronik, agresif (lokalize ve generalize), nekrotize ve sistemik hastalıklarla birlikte izlenenler olarak sınıflandırılmaktaydı.

2017 Kasım ayında Chicago’da Amerika Periodontoloji Akademisi, Avrupa Periodontoloji Federasyonu ve dünyanın çeşitli yerlerinden gelen uzmanlar tarafından bir çalıştay organizasyonu düzenlenmiştir. Burada periodontal, peri-implant hastalık ve durumları yeniden gözden geçirilerek sınıflama güncellenmiştir (Papapanou ve ark., 2018). Çalıştay; bir veya daha fazla bölgede gingival enflamasyon bulunmasıyla, enflamasyon durumunun tanımlanması arasındaki farka odaklanmıştır. Sondlamada kanamanın gingivitisin tanısında esas parametre olması gerektiğine karar verilmiştir.

Periodontitisin başarılı bir şekilde tedavisinin tamamlanmasından sonraki periodontal sağlık ve gingival enflamasyon da tanımlamıştır.

PERİODONTAL VE PERİ-İMLANT HASTALIK VE DURUMLARIN SINIFLANDIRILMASI 2017										
Periodontal Hastalık ve Durumlar										
Periodontal Sağlık, Gingival Hastalık ve Durumlar			Periodontitis			Periodonsiyumu Etkileyen Diğer Durumlar				
Periodontal Sağlık, Gingival Sağlık	Dental Biyofilme Bağlı Gingivitis	Dental Biyofilme Bağlı Olmayan Gingivitis	Nekrotizan Periodontal Hastalıklar	Periodontitis	Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitis	Periodontal destek dokularını etkileyen sistemik hastalık ve durumlar	Periodontal Absesler ve Endodontik-Periodontal Lezyonlar	Mukogingival Deformiteler ve durumlar	Travmatik Oklüzal Kuvvetler	Diş ve Proteze Bağlı Faktörler
Peri-İmplant Hastalık ve Durumlar										
Peri-İmplant Sağlık			Peri-İmplant Mukozitis			Peri-İmplantitis		Peri-İmplant Yumuşak ve Sert Doku Yetersizlikler		

Tablo 2. 1.: Periodontal Ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması 2017 (Caton ve ark., 2018b).

2017 sınıflaması, patofizyoloji hakkındaki bilgilere dayanarak periodontitisi üç formda tanımlamıştır:

- 1) Sistemik hastalıklara bağlı periodontitis,
- 2) Nekrotizan periodontitis,
- 3) Periodontitis (daha önce “kronik” veya “agresif” olarak kabul edilen hastalık formları (Papapanou ve ark., 2018).

PERİODONTİTİSİN FORMLARI	
1. Nekrotizan Periodontal Hastalıklar	
a. Nekrotizan Gingivitis	
b. Nekrotizan Periodontitis	
c. Nekrotizan Stomatitis	
2. Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitisler	
Bu koşulların sınıflandırılması, Uluslararası İstatistiksel Hastalık Sınıflandırması ve İlgili Sağlık Sorunları (ICD) kodlarına göre primer sistemik hastalığa göre yapılmalıdır.	
3. Periodontitis	
a. Evreler: Şiddet ve Kompleksiteye Bağlı	
Evre I: Periodontitis Başlangıcı	
Evre II: Orta Derecede Periodontitis	
Evre III: Diş Kayıplarına Neden Olabilecek Şiddetli Periodontitis	
Evre IV: Dentisyonun Tümüyle Kaybedilme Potansiyeli Olan Şiddetli Periodontitis	
b. Kapsam ve Dağılım: Lokalize, generalize molar-kesici dağılımı	
c. Sınıflar: İlerleme riski, tedaviye beklenen yanıt	
Derece A: Yavaş ilerleyen	
Derece B: Orta hızda ilerleyen	
Derece C: Hızlı ilerleyen	

Tablo 2. 2.: Periodontitisin Formları (Caton ve ark., 2018b).

Hastalığın şiddeti ve hastalığın biyolojik özelliklerine ilişkin ek bilgiler, geçmişin analizi ve ileriye yönelik risk değerlendirmesi sınıflamada yer almaktadır. Hastalığın dört evresi vardır (evreler 1 ile 4). Klinik ataçman kaybı, sondlanan cep derinliği, horizontal ve vertikal kemik defektleri, mobilité, furkasyon tutulumu ve periodontal nedenlerle diş kayıpları gibi değişkenler göz önüne alınarak hastalık 4 evrede sınıflandırılmıştır. Ek olarak hastalığın üç derecesi tanımlanmıştır ve bunlar hastalığın ilerleme hızı ile ilgilidir [Derece A periodontitis (düşük ilerleme hızı gösteren periodontitis), Derece B periodontitis (orta derecede ilerleme hızı gösteren periodontitis), Derece C (yüksek ilerleme hızı gösteren periodontitis)]. Periodontitisin ilerlemesinde genel sağlık durumu, sigara, diyabet gibi diğer etkenlerde rol aldığından bu etkenler derece sınıflamasını etkilemektedir (Albandar, Susin, & Hughes, 2018; Herrera, Retamal-Valdes, Alonso, &

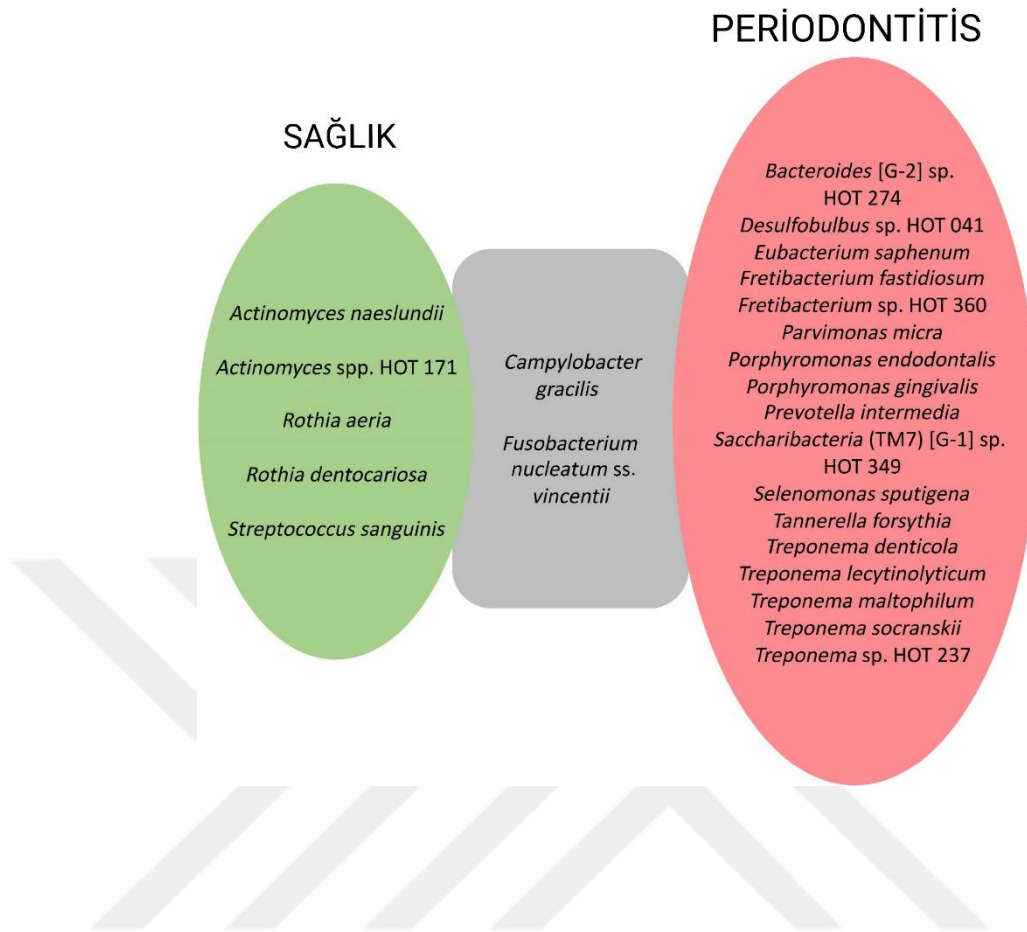
Feres, 2018; Needleman ve ark., 2018; Papapanou ve ark., 2018; Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018).

2.3. Periodontitis ve Periodontal Hastalık Patogenezi

Periodontitis, bir enfeksiyon hastalığıdır ancak doku yıkımı enflamatuvar bir süreçtir (Darveau, 2010; Hajishengallis & Lamont, 2014). Periodontitise neden olan biyolojik süreçlerin kesin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır, ancak hastalığın başlaması ve ilerlemesinin her zaman periodontal dokulardaki konak ve mikroorganizma arasındaki homeostazın bozulması ile olduğu bildirilmiştir (Hajishengallis & Lamont, 2014). Periodontal homeostaz, konak veya mikroorganizma ilgili çeşitli faktörler tarafından bozulabilir. Bunların konağın konjenital veya edinilmiş immün yetmezlikleri, mutasyonlar veya polimorfizmlerle ilişkili immün bozuklukları, yaşlılık, diyabet gibi sistemik hastalıkları, çevresel faktörleri (Sigara, diyet ve stres), çevresel değişikliklere yanıt olarak epigenetik değişiklikleri içerdiği bilinmektedir. Bu değişikliklerin simbiyotik bir mikrobiyotayı disbiyotik bir mikrobiyotaya dönüştürdüğü gösterilmiştir (Divaris ve ark., 2013; Eskin ve ark., 2012; Hajishengallis, 2014; Hajishengallis & Lamont, 2012; Laine, Crielaard, & Loos, 2012; Lindroth & Park, 2013; Stabholz, Soskolne, & Shapira, 2010; Q. Zhou, Leeman, & Amar, 2011). Bu faktörler tek başına veya daha büyük olasılıkla birlikte hareket ederek periodontal mikrobiyotada disbiyotik, periodontitis oluşum ve ilerlemesine neden olabilir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, periodontitis ile ilişkili mikrobiyotanın daha önce düşünülenenden daha heterojenik ve çeşitli olduğunu göstermiştir. Ağız ortamında Başlıca örnekleri *Filifactor alocis* (*F. alocis*) ve *Peptostreptococcaceae*, *Desulfobulbus*

ve *Synergistetes* gibi cinsler olmak üzere klasik kırmızı kompleks bakterileri olan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) ve *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) 'dan daha fazla bulundukları gösterilmiştir (Michael A Curtis, Zenobia, & Darveau, 2011; Dewhirst ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2006). Periodontitis oluşumu, çoğunlukla diş eti enflamasyonu sırasında farklı gram negatif türlerin ortaya çıkması ve subgingival mikroorganizma topluluklarının bileşiminin değişmesi ile başlar. Zenginleştirilmiş türleri arasında klasik tarif edilen kırmızı kompleksi oluşturan *T. denticola*, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* bulunmaktadır (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent Jr, 1998). Ayrıca *Treponema spp.* Spiroketler, *Prevotella intermedia* (*P. Intermedia*), *F. alocis*, *Desulfobulbus sp.* ve *Fretibacterium sp.* periodontitiste bol miktarda bulunan bileşenlerdir (Armitage, Dickinson, Jenderseck, Levine, & Chambers, 1982). Son yıllarda yapılan çalışmalar, periodontitis oluşum ve ilerlemesinde rol alan virulans faktörlerinin çok farklı bakteri türleri tarafından üretildiğini göstermektedir (Duran-Pinedo ve ark., 2014). Bu bakteriler ve virülans faktörlerine karşı konak tarafından oluşturulan yanıt periodontitisin ilerleyip ilerlemediğini gösteren faktördür (R. Page, 2000) (Lamont, Koo, & Hajishengallis, 2018). Periodontitisin patogenezinde rol alan bakteriler spesifik olarak kesinleşmemesine rağmen hastalık ve sağlıktaki mikroorganizmalar olarak belirlenmiştir (Şekil 2.4) (Mike A Curtis, Diaz, & Van Dyke, 2020).

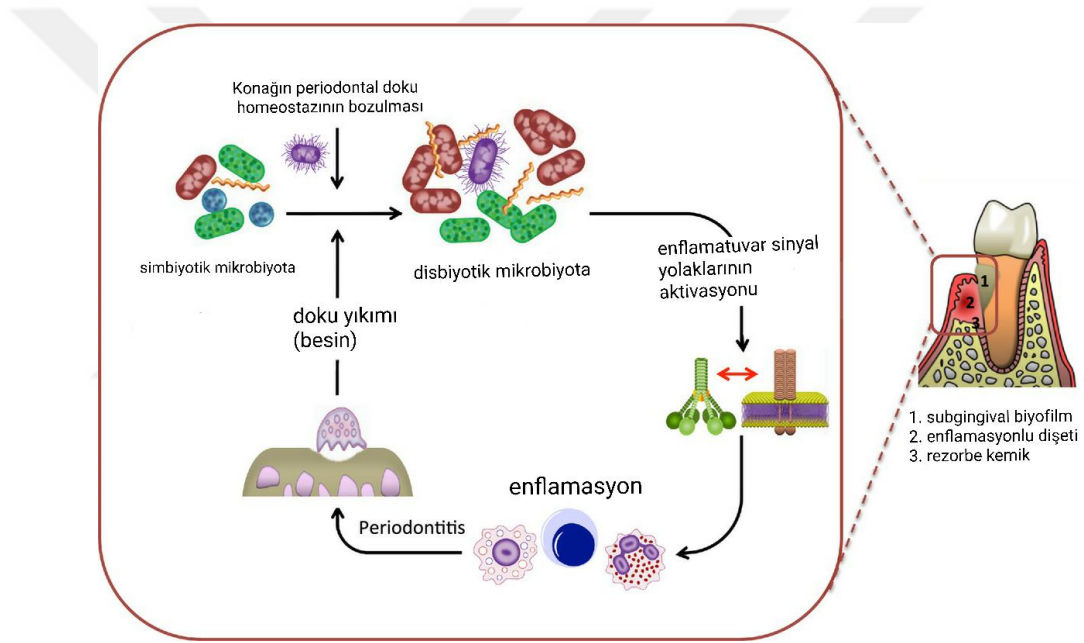


Şekil 2. 3.: Subgingival mikrobiyom (Mike A Curtis ve ark., 2020)

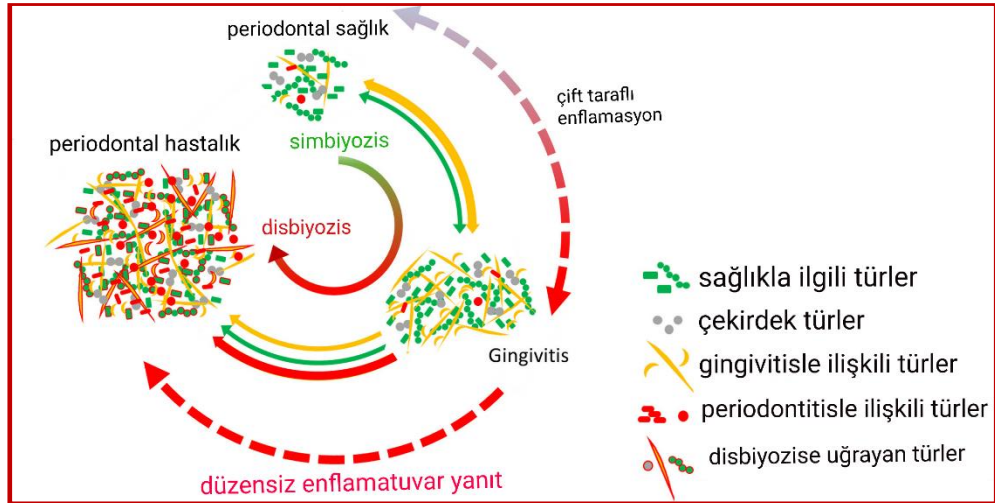
2.3.1. Periodontitis Patogenezinde Enflamasyonun Yeri

Sağlıktan periodontitise geçiş, yeni türlerin ortaya çıkmasından çok yeni baskın topluluk üyelerinin ortaya çıkışına işaret etmektedir (Abusleme ve ark., 2013). Subgingival alanda bulunan mikroorganizmaların tür ve miktarlarındaki değişiklik subgingival alanda enflamasyona bağlı olarak oluşan biyolojik değişikliklere paraleldir. Enflamasyon, belirli bakteri türlerinin beslenme ihtiyaçlarına hizmet eden bol miktarda doku yıkım ürünleri üretir; örneğin, bozulmuş kollajen ve hem içeren bileşiklerin (haptoglobin, hemopeksin ve hemoglobin), temel amino asitleri ve demiri elde etmek için proteolitik ve asakkarolitik bakteriler tarafından kullanılabileceği gösterilmiştir (Şekil

2.4) (Hajishengallis, Darveau, & Curtis, 2012). Periodontitis ile ilişkili bakterileri barındıran subgingival bölgeler, düşük bir redoks potansiyeli sergiler ve artan periodontal enflamasyonla akışı artan, besleyici olarak zengin bir serum benzeri eksüda olan diş eti oluğu sıvısı (DOS) ile yıkanır (Marsh, 2003). Enflamasyonla birlikte subgingival alanda oluşan yeni koşullar, aerobik türlerin ortadan uzaklaşmasına ve zorunlu anaerobik bakteri türlerinin sayıca artışına yol açarak subgingival mikrobiyotayı modifiye eder (Hajishengallis ve ark., 2012).



Şekil 2. 4.: Periodontal doku yıkımı ve enflamasyon (Hajishengallis & Lamont, 2014)



Şekil 2. 5.: Subgingival mikrobiyom ile enflamatuvar ve immün yanıt arasındaki çift yönlü ilişki (Mike A Curtis ve ark., 2020)

Konağın mikroorganizmalara karşı gösterdiği proenflamatuvar aktiviteler ile antimikrobiyal aktivitelerin dengesinin bozulması periodontitise zemin hazırlar (Jaradat ve ark., 2012).

Mikroorganizmalar önce birleşim epiteli bölgesinde kolonize olur. Konağın periodontal patojenlere karşı ilk savunma hattını nötrofil, kompleman sistemi oluşturur. Mikroorganizmalar ve salgıladıkları virülans faktörleri ile ilk temas halinde olan birleşim epiteli hücreleri ilk savunmada önemli rol oynamaktadır. Dental plak varlığında birleşim epitelinden salınan IL-8, prostoglandin E2 (PGE2) ve Matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi proenflamatuvar moleküller, birleşim epitelini geçerek bağ dokusuna ulaşır. Böylece gingival enflamasyon gerçekleşir ve mikrobiyal plağa bağlı ortaya çıkan kemoatraktan sinyaller ile damarlardan dokuya lökosit göçü olur (Abe, Hara, & Aono, 1991).

Birleşim epitelindeki, proenflamatuvar cevap lokal akut enflamasyona sebep olur. İlk cevap damar geçirgenliğinin artmasıyla birlikte lökositlerin göçüdür. Periodontal

enflamasyonun akut döneminde en önemli cevabı oluşturan hücreler endotellerden göç eden nötrofiller olarak bildirilmiştir (Dennison & VAN DYKE, 1997). Enflamasyonla birlikte lökositlerin damar epitelinden göç ederek, bağ dokusu boyunca ilerlediği ve gingival sulkusta subgingival plak ve gingival doku arasında bariyer oluşturduğu bildirilmiştir (Waldrop, Anderson, Hallmon, Schmalstieg, & Jacobs, 1987).

Akut enflamatuvar yanıtta ana hücreler nötrofilken, enflamatuvar yanıtın ardından lenfositler enflamatuvar hücre infiltratı içinde artış göstermeye başlar. Antijen ve yoğun sitokin varlığında T lenfosit hücrelerinin CD4+ ve CD8+ T hücrelerine, B lenfosit hücrelerinin de plazma hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (Kornman, Page, & Tonetti, 1997).

Sitokinler, kemokinler ve MMP'lerin periodontal dokularda bulunduğu ve periodontitiste DOS'ta yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Assuma, Oates, Cochran, Amar, & Graves, 1998; Gainet ve ark., 1998; Romanelli ve ark., 1999). Periodontal enflamasyona karşı erken yanıtta nötrofiller, lipid medyatörleri, lökotrien B4 ve PGE2, belirgin şekilde artış gösterir. Siklooksijenaz aktivitesinin, özellikle siklooksijenaz-2, periodontitiste ve *in vitro* periodontal patojenlere yanıt olarak arttığı bildirilmiştir (Pouliot, Clish, Petasis, Van Dyke, & Serhan, 2000). Akut enflamatuvar yanıtta ana hücreler nötrofilken, kronik bağışık yanıtta makrofajların ön plana çıktığı gösterilmektedir (R. C. Page, 1998). Makrofajlar dokuda bakterilerin LPS'leri ile karşılaştıklarında aktif hücreler haline gelirler. Aktif makrofajlar ve fibroblastlardan salınan IL-1 β , IL-6 ve Tümör nekroz faktörü- α (TNF) sitokinlerinin alveolar kemik yıkımına sebep olan sinyalleri taşıdıkları bildirilmektedir (R. C. Page, 1998). Bu sitokinler, antijene özgü immün cevabı başlatır ve enflamasyonu şiddetlendirir. Proteazların bağ dokuda yıkıma sebep olarak nötrofil girişi için bağ dokuda boşluklar

oluşturduğu bildirilmiştir (Reynolds & Meikle, 1997). Enflamasyon lokal bağışıklık yanıt ile sınırlandırılmadığında, bakterilere karşı konak dokudan salgılanan sitokin ve enzimler doku hasarını devam ettirir. Konak hücrelerinin kollajen yıkımında rol alan MMP' leri ve alveol kemik rezorpsiyonuna yol açan sitokinleri (Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), IL-1 β , IL -6, TNF- α , PGE2) salgıladıkları bildirilmiştir (Schwartz, Goultschin, Dean, & Boyan, 1997). Böylece periodontal dokularda ödem ve enflamasyonla birlikte birleşim epiteli hücreleri apikale doğru kök yüzeyi boyunca ilerleme gösterirler ve periodontal cep oluşur. Periodontal cep varlığının subgingival plak miktarında artışa, subgingival plağında periodontal cepte artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Schwartz ve ark., 1997).

2.3.2. Makrofajlar ve Enflamasyon

Doğuştan gelen bağışıklığın ilk tanımı 19. yüzyılın sonlarında “makro = büyük ve faj = yiyen” anlamına gelen “makrofaj” terimini tanıtan Elie Metchnikoff tarafından yapılmıştır (Divangahi, King, & Pernet, 2015; Stefater III, Ren, Lang, & Duffield, 2011).

Monositler / Makrofajlar, konumlarına, fenotiplerine, morfolojilerine ve ayrıca gen ekspresyon profillerine göre tanımlanan küçük lökosit popülasyonlarıdır. Monositlerin sağlıklı insanın periferik kanındaki çekirdekli hücrelerin % 4 ile 10'unu temsil ettiği ve 20 saatlik kısa bir yarılanma ömrüne sahip olduğu bilinmektedir (Sica, Erreni, Allavena, & Porta, 2015; Wynn, Chawla, & Pollard, 2013).

Uzun yıllar boyunca, makrofajların sadece monositlerin farklılaşmasından kaynaklandığı düşünülse de son zamanlarda bu hücreler arasındaki morfolojik ve fonksiyonel açıdan bazı farklılıkların bulunduğu bildirilmiştir (Epelman ve ark., 2014).

Erişkin dokuda yerleşik makrofajların çoğu embriyonik gelişim sırasında yolk kesesinde üretilir, kendini yenileme kapasitesine sahiptir, monositlerden bağımsız olarak korunmuştur (Davies, Jenkins, Allen, & Taylor, 2013; Epelman ve ark., 2014; Hashimoto ve ark., 2013). Ek olarak, her organın embriyonik ve yetişkin kaynaklı makrofajlarının kendine özgü bir kombinasyonu vardır. Örneğin Monositopenisi bulunan hastalarda dokuda yerleşik olarak bulunan makrofajın büyük ölçüde bu hastalıktan etkilenmediği gösterilmiştir (Hashimoto ve ark., 2013). Benzer olarak embriyonik makrofajların doku yenilenmesine katkıda bulunduğu, yetişkinlerden türetilmiş makrofajların öncelikle konak savunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıkların yanı sıra, embriyonik ve yetişkin kaynaklı makrofajlar birçok farklı organda bir arada bulunabilir (Divangahi ve ark., 2015).

Dokuların farklılığına göre makrofajlar da özelleşmiş yapılar halinde bulunur. Monosit / Makrofaj, kemik iliğindeki progenitörlerden köken alır ve periferik kana girer (Epelman ve ark., 2014; Wynn ve ark., 2013). Anatomik konumlarına ve fonksiyonel fenotiplerine göre farklı dokularda farklı özelliklere sahip makrofajlar olarak fonksiyon görürler. Merkezi sinir sisteminde mikroglia, kemikte osteoklast, akciğerde alveoler makrofaj, dalakta histosit ve karaciğerdeki Kupffer hücreleri bunlara örnek olarak gösterilebilir (Davies ve ark., 2013; Varol, Mildner, & Jung, 2015).

Mikroorganizmaların kolonize olduğu mukozal dokularda makrofajların yabancı patojenik mikroorganizmalar ile etkileşime giren ilk hücreler olduğu tanımlanmaktadır (Pédrón & Sansonetti, 2008; Socransky ve ark., 1998; Tatakis & Kumar, 2005). Makrofajlar bağışıklık yanıtını tetiklemek için lenf düğümlerine enfeksiyon hakkında önemli bilgiler taşırlar. Makrofajların, çeşitli bakteriyel, viral ve fungal patojen ligandları dahil olmak üzere mikroorganizma ile ilişkili moleküler patenlerin farklı sınıflarını

tanıyan patern tanıma reseptörleri kullandıkları bildirilmektedir (Błach-Olszewska, 2005; Jotwani ve ark., 2001; Kopitar, Ihan Hren, & Ihan, 2006; Lauvau & Glaichenhaus, 2004; Nestle, Turka, & Nickoloff, 1994). Makrofajlar yabancı maddelerin tanınması ve hücre içerisine alınmasını, hücresel farklılaşmayı ve olgunlaşmayı arttıran seçilmiş sitokinlerin (IL-1 β ve TNF- α gibi) üretimini tetikleyerek, sağlar. Bu süreçler, aynı zamanda adaptif immünitede majör efektör hücreler olan B ve T hücreleri ile iletişimi sağlayan, sitokinler ve kemokinlerin artışı ile bağlantılı bulunmuştur (Guiney, Hasegawa, & Cole, 2003). Homeostaz ve enflamasyon sırasında, dolaşımdaki monositlerin kan akışını bırakıp dokulara taşındığı görülmektedir. Büyüme faktörlerine, proenflamatuvar sitokinlere ve mikroorganizmalara maruz kalan makrofajların da farklılaştıkları gösterilmektedir (Epelman ve ark., 2014).

Makrofajların; mikroorganizmaların, enfekte ve ölü hücrelerin fagositozu, MHC molekülleriyle bağlantılı olarak antijen sunumu, IL- 1, IL- 6, TNF- α ve benzeri farklı tip sitokinlerin üretimi gibi birçok farklı işlevleri bulunmaktadır (Nourshargh & Alon, 2014).

Makrofajların, enflamatuvar sinyalleri ortadan kaldırmak için enflamasyon veya yaralanma bölgelerine göç ettiği ve son olarak yara iyileşmesine ve doku onarımına katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Nourshargh & Alon, 2014; Shi & Pamer, 2011).

Bu süreçte makrofajların alımını, istilacı patojenlerden salınan patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler), dokudaki yerleşik T hücrelerinin antijenler tarafından aktivasyonu, çeşitli enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanması tetikleyebilmektedir (Fernando O Martinez ve ark., 2009; Nourshargh & Alon, 2014). Kemokinlerin, endotel yoluyla monosit göçü ve aktivasyonuna doğrudan katıldıkları

gösterilmiştir (Mantovani ve ark., 2004). Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), enflamasyonun başlangıcında yer alan monositler için güçlü bir kemoatraktan faktördür. Monositler üzerindeki membran CC kemokin reseptörü 2 (CCR2) ile etkileşerek monositlerin kemotaksisini ve göçünü tetikler. IL-8 veya CXC ligand-8 (CXCL-8) ile birlikte, MCP-1'in kan akış koşulları altında monositlerin vasküler endotele sıkıca yapışmasını tetiklediği gösterilmiştir (Melgarejo, Medina, Sánchez-Jiménez, & Urdiales, 2009; Panee, 2012). Makrofajların venül duvarına yapışmasını sağlayan, yapışma molekülleri dört aileye aittir: Selektinler, İntegrinler, Ig'ler ve Musin benzeri glikoproteinlerdir (Fernando O Martinez ve ark., 2009; Nourshargh & Alon, 2014). Monosit ve makrofaj akışının hastalık durumunu şiddetlendirdiği ileri sürülmüştür (Fenyo & Gafencu, 2013; Melgarejo ve ark., 2009; Panee, 2012).

Antijen sunumu makrofajların önemli bir görevidir Antijen sunan hücreler (APC'ler), özellikle makrofajlar, immün sistemin bağışıklık tepkisini başlatan ve düzenleyen nöbetçi hücreler olarak tanımlanmaktadır (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Makrofajların, çevre dokuları istila eden patojenleri izlerler. Bağışıklık sistemini, antijenleri işleyerek ve yüzeylerindeki insan lökosit antijen (HLA) moleküllerine bağlı peptit fragmanlarını sunarak uyarırlar. Antijen işlendikten sonra makrofajlar T hücrelerine doğru göç eder ve onları uyarırlar. (Fujiwara & Kobayashi, 2005; Wynn ve ark., 2013).

Makrofajların bir diğer önemli görevi fagositozudur. İnsanlar ve diğer hayvanlar sürekli olarak patojenik bakterilere maruz kalırlar ve bu mikroorganizmalara karşı direnç sağlamak zorundadırlar. Bu mikroorganizmaların ve yabancı partiküllerin yok edilmesi özel bir mekanizma olan fagositoz süreci ile gerçekleştirilir. Fagositozun, yabancı maddenin tanınması, bağlanması, hücre içerisine alınması ve son olarak yabancı

maddenin parçalanması aşamalarından oluştuğu tanımlanmıştır. Bağışıklık sisteminde üç sınıf fagositik hücre vardır: monositler / makrofajlar, nötrofilik granülositler ve dendritik hücrelerdir (Ernst, 2000; Groves, Dart, Covarelli, & Caron, 2008).

Makrofajlar nispeten uzun ömürlü hücrelerdir. Genellikle çöpçü fagositler olarak hareket ederler, böylece insan/hayvan vücudundaki patojenleri ve ölü hücreleri temizlerler. Bakteriyel patojenleri yutma ve öldürme yeteneği, makrofajların önemli bir işlevidir. Bu fagositik rolde makrofajların doğuştan gelen bağışıklık savunmasının ilk hattının bir parçası olduğu bildirilmiştir (Schumann, 2016).

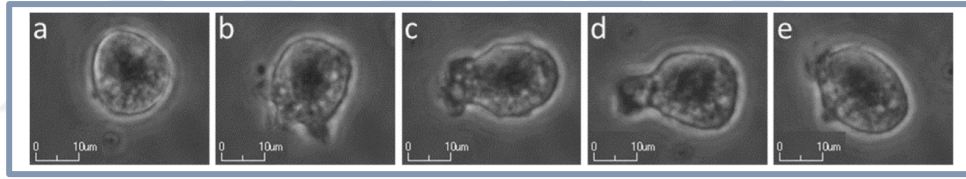
Monositler, kan dolaşımından dokulara olgun makrofajlara farklılaşarak çıkarlar (Schumann, 2016). Dağılan makrofajlar, istilacı patojenlerin çevresini verimli bir şekilde sarar. Bunu yapmak için, mannoz reseptörü, glukan reseptörü, çöpçü reseptörleri ve konakçının çeşitli bakteri bileşenlerini ayırt edebilen Toll benzeri reseptörler (Tablo 2.3) gibi çeşitli hücre yüzeyi reseptörlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir (Bryant & Fitzgerald, 2009). Bu tür reseptörlere ligand bağlanması fagositozu başlatır. Bu, bakteriyel antijenlerin sunumuyla lenfositlerin uyarılmasına ve ayrıca sinyal proteinlerinin (yani IL-1 β , IL6, TNF-a, CXCL8) salgılanmasıyla diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Schumann, 2016).

Reseptör tipi	Bilinen patojenle ilgili paternler
❖ C- tipi lektin reseptörleri (CLR); - Mannoz reseptörü, - glukan reseptörü ❖ Çöpçü reseptörler (SR); SR-AI, SR-AII ❖ Toll benzeri reseptörler (TLR); - TLR-2,4,5	❖ Patojenin hücre duvarındaki karbonhidratlar; mannoz, N-asetilglukozamin, β-glukanlar ❖ Modifiye lipoproteinler, negatif şarj molekülleri; LPS, lipoteikoik asit (LTA) ❖ Mikroorganizmaların karakteristik komponentleri; lipopeptidler, lipoproteinler, glikolipidler, zimojen, LPS, LTA, flagel

Tablo 2. 3:Fagositozda makrofaj yüzey reseptörleri (Schumann, 2016)

Karşılaşılan çoğu bakteriyel patojen, doğal bağışıklık savunma mekanizmaları tarafından dakikalar veya saatler içinde tespit edilir ve yok edilir. Epitelyal engelleri aşan ve konak dokuları içine giren mikroorganizma bu dokulara yakın bulunan makrofajlar tarafından tanınmaktadır. Bakterilerin makrofaj yüzey reseptörlerine bağlanmasının fagositozu aktive ettiği gösterilmiştir. Başlangıçta reseptöre bağlı mikroorganizma fagosit membranı ile çevrilidir. Membranın ve hücre iskeletinin aktif olarak yeniden şekillenmesi, membran-psödopodinin genişlemesine ve dolayısıyla bakterinin çevrelenmesine yol açar (Groves ve ark., 2008). Bunu, patojenin bir hücre içi veziküle, fagozom içine alınması takip eder. Fagozomun pH'ı düşer (pH değeri yaklaşık 5.5) ve lizozomlar ile kaynaşır ve patojenin lizozomal enzimlerle degradasyonunu sağlayan bir fagolizozom oluşturduğu gösterilmiştir (Haas, 2007).

Ek olarak, makrofaj aktivasyonunun, içeriye alınmış mikroorganizmaları öldürmeye yardımcı antimikrobiyal peptitlerin üretiminin yanı sıra reaktif oksijen ve azot ara ürünlerinin sentezini indüklediği gösterilmiştir. Nitrik oksit, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından oluşturulur. Makrofajlarda sıklıkla bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, enzim süperoksit dismutaz tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülen süperoksiti ($O_2^{\cdot-}$) sentezler. Hidrojen peroksitten, hidroksil radikali (OH), hipoklorit (OCl^-) ve hipobromit (OBr^-) gibi bir dizi toksik madde, kimyasal ve enzimatik reaksiyonlarla üretilir. Hidrolitik enzimler, asidik pH, membranda por oluşturan peptitler, radikal oksijen ve azot ara maddelerinin kombinasyonunun bakteriyel patojenlerin etkili bir şekilde fagositoz sağladığı gösterilmiştir (Pourova, Kottova, Voprsalova, & Pour, 2010; Robinson, 2009).



Şekil 2. 6.: Fagositoz sırasında makrofaj: (a) dinlenme makrofajı, (b) makrofaj plazma membranının tomurcuklanması, (c) mikroorganizmanın çevrelenmesi, (d) mikroorganizmanın içeri alınması ve (e) tomurcuklanan membranın içeri kıvrılması (Schumann, 2016). (Bu resim serisi, faz kontrast modunda BioStation IM-Q mikroskobu (Nikon, Düsseldorf, Almanya) kullanılarak canlı bakteri ve RAW264.7 makrofajlarının ortak kültürünün canlı hücre görüntülemesi ile elde edilmiştir.)

2.3.3. Makrofaj Plastitesi ve Polarizasyonu

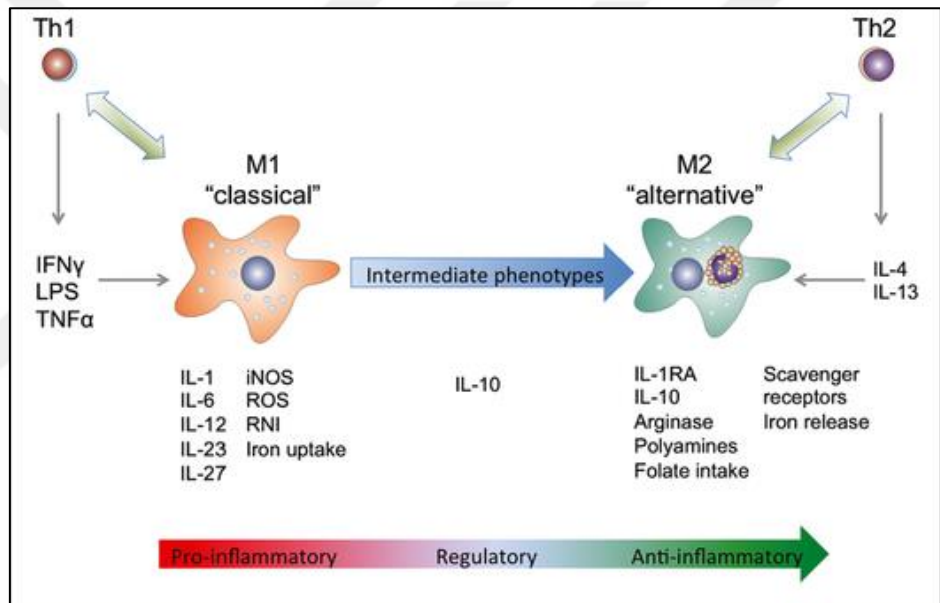
Makrofajlar, bir fenotipten diğere geçebilen hücrelerdir (Mantovani ve ark., 2004; Sica & Mantovani, 2012). Makrofaj polarizasyonu, makrofajların fenotipik olarak spesifik bir fenotip ve her bir spesifik dokuda karşılaşılan mikro çevresel uyarılara ve sinyallere fonksiyonel tepki verdiği bir süreç olarak tanımlanır (Sica & Mantovani, 2012). Makrofaj fenotiplerinin plastisitesi ve lokal dokulardaki doğal ve adaptif immünitede gerçekleştirdikleri işlevler açısından önemlidir. Bu makrofaj fenotiplerindeki çeşitlilik, lokal konak ortamı ve mikroorganizma çeşitleri tarafından düzenlenerek farklı bağışıklık hücre yanıtına neden olur (Biswas & Mantovani, 2012; Cassetta, Cassol, & Poli, 2011a).

Makrofajlar heterojendir, fenotipleri ve fonksiyonları, çevreleyen mikro ortam tarafından düzenlenir. Lokal sitokin çevresi makrofaj polarizasyonunu yönlendirebilir. Bu nedenle, insan ve farelerde, hücre yüzey biyobelirteçlerinin ekspresyonuna, spesifik faktörlerin üretilmesine ve biyolojik aktivitelere dayanarak birkaç makrofaj sınıfı tanımlanmıştır. Farklı fonksiyonlara sahip iki ana makrofaj alt popülasyonu, klasik olarak aktiveleştirilmiş veya enflamatuvar (M1) ve alternatif olarak aktiveleştirilmiş veya anti-enflamatuvar (M2) makrofajlar olarak tanımlanmıştır. M1 / M2 fenotipinin bu fenomeni “makrofaj polarizasyonu” olarak adlandırılır (Biswas & Mantovani, 2012; Cassetta, Cassol, & Poli, 2011b; Locati, Mantovani, & Sica, 2013; Murray ve ark., 2014; Sica ve ark., 2015)

M1 fenotipindeki makrofajlar LPS’ler tarafından tek başına veya IFN- γ , granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi yardımcı T hücre (Th1) sitokinleri ve IL-6, IL-12, IL-23 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinler ile bağlantılı

olarak polarize olan klasik olarak aktive edilmiş makrofajlardır (Shapouri- Moghaddam ve ark., 2018).

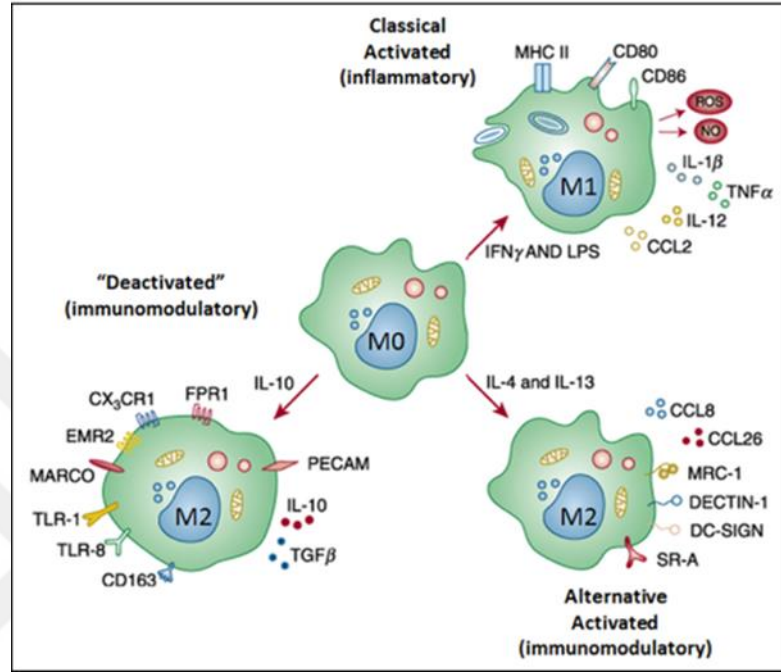
M2 fenotipindeki makrofajlar, IL-4 ve IL-13 gibi Th-2 sitokinleri tarafından antienflamatuvar, immüno-regulator ve polarize olan ve IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) gibi antienflamatuvar sitokinler üreten aktiveleştirilmiş makrofajlardır (Shapouri- Moghaddam ve ark., 2018).



Şekil 2. 7.: Makrofaj polarizasyon profilleri (Sima & Glogauer, 2013)

M1 ve M2 makrofajların farklı işlevleri ve transkripsiyonel profilleri vardır. M1/M2 makrofaj dengesi polarizasyonunun enflamasyonun yönünü yönettiği bilinmektedir. Enflamasyon, bir organı etkileyecek kadar şiddetli olduğunda, makrofajlar, uyarıcıya karşı TNF- α , IL-1, IL-12 ve IL-23'ü salgılamak için ilk önce M1 fenotipini gösterir. Ancak, eğer M1 fazı devam ederse, doku hasarına neden olabilir. Bu nedenle, M2 makrofajların, enflamasyonu baskılamak, doku tamirine, yeniden

şekillendirmeye, vaskülarizasyona katkıda bulunmak ve homeostazı korumak için yüksek miktarda IL-10 ve TGF- β salgıladığı gösterilmiştir (Shapouri- Moghaddam ve ark., 2018).



Şekil 2. 8.: Konak ve mikrobiyal uyarılarla ilgili makrofaj fonksiyonlarının plastisitesi ve polarizasyonu (Ebersole ve ark., 2017)

Makrofaj polarizasyonu konaktaki enflamatuvar ve antienflamatuvar reaksiyonları etkileyen önemli bir süreçtir. Periodontitis, gibi kronik enflamatuvar hastalıklarda da makrofaj polarizasyonu hastalık patogenezi etkileyebilmektedir. Periodontitis yumuşak doku bütünlüğünü bozan ve alveol kemik rezorpsiyonuyla ilerleyen, lokal konak dokularında subgingival biyofilmlerden etkilenen kronik bir immünoenflamatuvar lezyondur (Tatakis & Kumar, 2005). Lezyon, enfekte dokulara sızan enflamatuvar hücreler, sitokinler, kemokinler, yerleşik diş eti hücreleri, enflamatuvar hücreler tarafından üretilen mediyatörler ve kompleks doku yanıtının bir sonucudur (Kantarci & Van Dyke, 2005; Kornman ve ark., 1997; Salvi & Lang, 2005;

Tatakis & Kumar, 2005; Trombelli, Scapoli, Tatakis, & Minenna, 2006). Bu hücrelerin fenotipik tanımlarını sağlayan, ilerleyen periodontal hastalığı olan bu hücre popülasyonlarındaki değişiklikleri tespit eden ve bu makrofajların antijen sunumunda kritik olarak işlev görebileceğini *in vitro* olarak gösteren veriler ile periodonsiyumda bir dizi makrofaj tanımlanmıştır (Fernando Oneissi Martinez, Sica, Mantovani, & Locati, 2008).

Periodontitisin kronik enflamatuvar lezyonlarına katkıda bulunan oral bir patojen olan *P. gingivalis*, öncelikle M1 polarize makrofaj popülasyonunu indükler. M1 hücrelerinin indüklenmesi, özellikle TLR'lerin birleşmesiyle, NFκ-B yoluyla sinyal vermesi ve bir dizi proenflamatuvar mediatör aracılığıyla gerçekleşir (Fernando Oneissi Martinez ve ark., 2008). Bu mediatörlerin yüksek seviyeleri, epitel bütünlüğünün bozulması, bağ dokusu matrisinin enzimatik olarak parçalanması ve fibroblast fonksiyonunun/canlılığının kaybı, alveol kemik rezorpsiyonuna yol açan osteoklastogenezin aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Fernando Oneissi Martinez ve ark., 2008). Makrofajlar, *P. gingivalis* bağlı enflamasyonun yol açtığı alveol kemik rezorpsiyonunda önemlidir, periodontal enflamasyonda dokulara infiltre olan makrofajlar baskın olarak M1 tipi hücreler olarak bildirilmiştir (Lam ve ark., 2014). Ek olarak *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ın, M1 hücre olgunlaşması ve polarizasyon sürecine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Könönen & Müller, 2014).

M1 makrofajları tipik olarak IFN-γ ve TNF-α gibi Th1 sitokinleri veya bakteriyel LPS tanıma ile indüklenir. Bu makrofajlar yüksek seviyelerde proenflamatuvar sitokinler TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve düşük seviyelerde IL-10 üretir (Bashir, Sharma, Elahi, & Khan, 2016). Fonksiyonel olarak, M1 makrofajları, NADPH oksidaz sisteminin aktivasyonu ve ardından reaktif oksijen türlerinin (ROS)

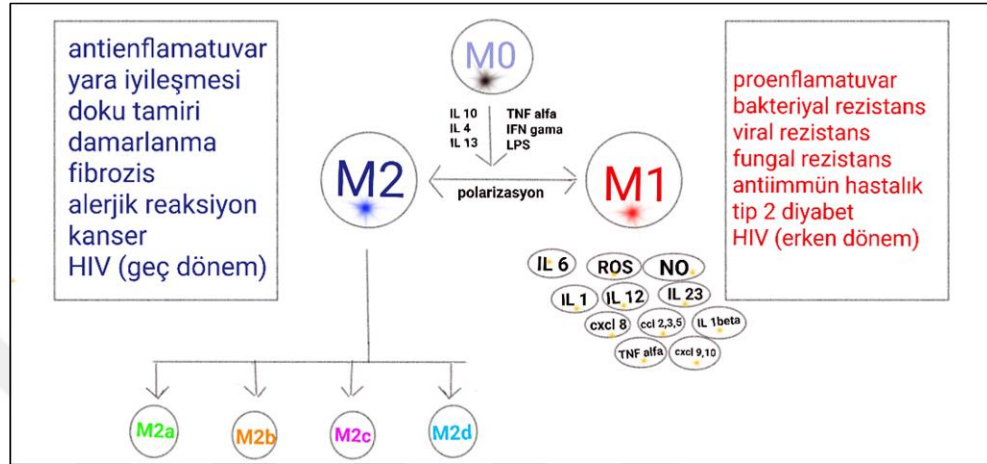
üretilmesi yoluyla enfeksiyon sırasında patojenlerin uzaklaştırılmasına katılır. Bu nedenle M1 makrofajın güçlü anti-mikrobiyal ve anti-tümör aktivitesine sahip olduğu, ROS kaynaklı doku hasarına aracılık ettiği ve doku rejenerasyonunu ve yara iyileşmesini bozduğu gösterilmiştir (Murray ve ark., 2014). M2 makrofajların antienflamatuvar fonksiyonunun dokuyu bu tür hasarlardan koruduğu gösterilmiştir (Bashir ve ark., 2016; Biswas, Chittechath, Shalova, & Lim, 2012; Cassetta ve ark., 2011b; Locati ve ark., 2013; Mantovani, Biswas, Galdiero, Sica, & Locati, 2013; Mantovani ve ark., 2004; Murray & Wynn, 2011; N. Wang, Liang, & Zen, 2014).

Antienflamatuvar olan M2 makrofajlar, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) 6'yı IL-4 reseptörü alfa (IL-4R α) boyunca aktif hale getirerek Th-2 sitokinleri IL-4 ve IL-13 ile polarize olur. IL-4 ve IL-13'ün yanı sıra IL-10 gibi diğer sitokinlerin, STAT 3 ile IL-10 reseptörünü (IL-10R) aktif hale getirerek M2 polarizasyonunu yönetebildiği bildirilmiştir (Porta, Riboldi, Ippolito, & Sica, 2015; N. Wang ve ark., 2014). IL-33, Th-2 ile ilişkili IL-1 ailesinin bir sitokinidir ve M2 polarizasyonunu uyarabilmektedir. IL-33'ün, IL-13 ile indüklenmiş M2 fenotipinin polarizasyonunu güçlendirdiği bildirilmiştir (Kurowska-Stolarska ve ark., 2009). IL-21, M2 polarizasyonuna neden olan bir başka Th2 ilişkili sitokindir. M2 makrofajları, düşük IL-12 üretimi ve yüksek IL-10 ve TGF- β üretimi ile karakterize bir antienflamatuvar sitokin profiline sahiptir. İşlevsel olarak, M2 makrofajlar, güçlü fagositoz kapasitesine sahiptir, apoptotik hücreleri temizler, doku onarımı ve yara iyileşmesini destekler ve koruyucu fibrotik özelliklere sahiptirler (Braga, Agudelo, & Camara, 2015; Jetten ve ark., 2014; Kurowska-Stolarska ve ark., 2009; Sica & Mantovani, 2012; N. Wang ve ark., 2014). Bu nedenle, genel olarak M2 hücreleri Th2 yanıtında, enflamasyonun azaltılması, doku yapımının teşviki, anjiyogenez, immünoregülasyon ve parazitlerin yok edilmesinde

yer alır (Belgiovine, D'Incalci, Allavena, & Frapolli, 2016; Beschin, De Baetselier, & Van Ginderachter, 2013; Chua, Brown, Hamilton, Rogerson, & Boeuf, 2013; Hinz ve ark., 2012; Mantovani ve ark., 2013; Porta ve ark., 2015; Qian & Pollard, 2010; Ruffell, Affara, & Coussens, 2012; Schultze & Schmidt, 2015).

M2 makrofajlar aktive edici uyarana bağı olarak, M2a, M2b, M2c ve M2d'den oluşan dört farklı alt gruba ayrılabilir. M2a makrofaj alt kümesi, IL-4 ve IL-13 tarafından indüklenebilir ve yüksek seviyelerde CD206, IL-1 reseptörü RII (IL-RII) ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) ile ilişkili bulunmuştur. M2b alt kümesi, bağışıklık kompleksleri (IC'ler) ve TLR agonistleri veya IL-1 reseptör ligandları ile uyarılarak indüklenebilir (Chistiakov ve ark., 2015). M2b makrofajları hem antienflamatuvar hem de proenflamatuvar sitokinler olan IL-10, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α üretir. M2c alt grubu, glukokortikoidler ve IL-10 tarafından indüklenir ve yüksek miktarda IL-10 serbest bırakarak apoptotik hücrelere karşı antienflamatuvar aktiviteler sergilediği gösterilmiştir (Zizzo, Hilliard, Monestier, & Cohen, 2012). Son olarak, M2d alt grubu, adenosin reseptörü yoluyla TLR agonistleri tarafından uyarılır (Chistiakov ve ark., 2015). Adenosin reseptörünün aktivasyonunu proenflamatuvar sitokinlerin üretiminin baskılanması ve antienflamatuvar sitokinlerin salgılanmasının ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılanmasının uyarılması ve böylece proanjiyojenik özellikler sağlaması takip etmektedir (Chistiakov ve ark., 2015; Ferrante, 2013; Haskó, Pacher, Deitch, & Vizi, 2007; Pinhal-Enfield ve ark., 2003). M2 makrofajlarının, farklılaşmış makrofajların "yeniden polarizasyonunu" veya "yeniden programlanmasını" tetikleyen M1 sinyallerine veya tam tersine maruz bırakılması, terapötik amaçlar için potansiyel olarak araştırılabilecek olan yüksek fonksiyonel plastisitelerinin bir başka kanıtıdır. M1 ve M2 makrofajın farklı fenotip ve alt sınıfları, sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer

salgılanan faktörlerin salgılanması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018).



Şekil 2. 9.: M1 ve M2 makrofajının farklı fenotip ve alt sınıfları (Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018)

İnterlökinler, tümör invazyonu ve anjiyogeneze rol oynayan, adezyon moleküllerinin, MMP'nin, NF-kB sinyal yollarının ve STAT' ların indüklenmesinde rol oynayan bir grup sitokinler olarak tanımlanmıştır (Fujiwara & Kobayashi, 2005). M1 makrofaj aktivasyonunun, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 ve IL-23 dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indüklediği; nitrik oksit (NO), ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) üretimini indüklediği; antijen sunumu; CC kemokin reseptörlerinin CCR1 ve CCR5'in ekspresyonunu; patojen öldürme için etkili bir mekanizma sağlayan Th1 ve Th17 yanıtını artırdığı bildirilmiştir (Fujiwara & Kobayashi, 2005; Porta ve ark., 2015; Schultze, Freeman, Hume, & Latz, 2015; Schultze & Schmidt, 2015).

M1 ve M2 makrofajlarının farklı kemokin profilleri bulunurken, CXCL9 ve CXCL10 gibi kemokinleri çeken Th1 hücrelerini eksprese eden M1 makrofajların, CCL17, CCL18, CCL22 ve CCL24 gibi kemokinleri eksprese ettiği gösterilmiştir (Mantovani ve ark., 2004). M1 makrofajları TNF- α , IL-1 β , IL-6 enflamatuvar sitokinlerini eksprese eder ve MHC sınıf II moleküllerini CD40, CD80, CD86 ile birlikte yukarı yönde regüle ederek sitotoksik adaptif bağışıklığı destekler. Ayrıca, M1 makrofajların Th1 ve Th17 polarize edici sitokinleri IL-12, IL-23, IL-27 ve Th1'i toplayan kemokinler CXCL9, CXCL10, CXCL11'i eksprese ettiği bildirilmiştir. Aksine M2 makrofajların, gen ekspresyonunu IL-10, TGF- β , IL-1R tip II, IL-1Ra gibi antienflamatuvar moleküllere çevirerek enflamasyonun çözülmesini desteklediği gösterilmiştir. M2 makrofajları ayrıca, çöpçü reseptörleri CD163, Stabilin-1 ve c-tipi lektin reseptörleri CD206, CD301, dectin-1 ve CD209 dahil olmak üzere yüksek seviyelerde endositik reseptörleri eksprese eder. Ayrıca M2 makrofajların, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 kemokinlerin salgılanmasıyla Th2, düzenleyici T hücreleri (Tregler), eozinofiller ve bazofilleri topladığı gösterilmiştir (Mantovani ve ark., 2004; Porta ve ark., 2015; Schultze ve ark., 2015; Schultze & Schmidt, 2015).

Fenotip	Uyaranlar	Hücreden eksprese edilen biyobelirteçler	Sitokinler, kemokinler ve diğer salınan mediatörler	Fonksiyonlar
M1	IFN- γ , TNF- α , LPS	CD80, CD86, CD68, MHC- II, IL-1R, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 low, IL- 12 high	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL- 23, IL-27, CXCL9,10,11,16, CCL5, Arg-2 (fare), İnos (fare), ROS	Proenflamatuvar, Th1 yanıtlayıcı, tümör rezistansı
M2a	IL-4, IL-13	İnsan; CD206, IL- 1Ra, IL-1RII Fare; Arg-1	IL-10, TGF- β , CCL-17,18,22,24	Anti- enflamatuvar, doku remodelingi
M2b	İmmün kompleksler, TLR ligandları, IL-1 β	IL-10 low, IL-12 high, CD86	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL1	Th2 aktivasyonu, immünregülatör
M2c	IL-10, TGF- β , glukokortikoidler	İnsan; CD206, TLR- 1,8 Fare;	IL-10, TGF- β , CCL-16,18, CXCL13	Apoptotik hücrelerde fagositöz

		Arg-1		
M2d	TLR ligand, adenozin reseptör ligandları	IL-10 high, IL-12 low, TNF- α low, VEGF	VEGF, IL-10	Anjiyogenezis, tümör ilerlemesi

Tablo 2. 4: İnsan ve farelerde M1 ve M2 fenotipleri (Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018)

(Arg-1; arjinaz 1, LPS; lipopolisakkarit, ROS; reaktif oksijen türleri, IL-1Ra; interlökin 1 reseptör antagonisti, TGF- β ; transforme edici büyüme faktörü beta, TNF- α ; tümör nekro nekroz faktörü alfa, TLR; toll benzeri reseptör, MMR/CD206; makrofaj mannoz reseptör, iNOS; indüklenabilir nitrit oksit sentaz, VEGF; vasküler endotelial büyüme faktörü)

2.4. Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi, periodontitisli bireylerde, farklı periodontitis tiplerinde makrofaj polarizasyonunun etkileneceği yönündedir.

2.5. Amaç

Bu tez çalışmasının amacı aynı evre ama farklı derecelerdeki periodontitis vakalarında makrofaj polarizasyonunu gösteren biyobelirteçlerin araştırılmasıdır. Bu amaçla aşağıdakiler hedeflenmiştir:

1. Sağlıklı ve hastalıklı diş eti dokularında RT-PZR ile IL-10, IL-12, IL-23, Arg-1 biyobelirteçlerinin araştırılması

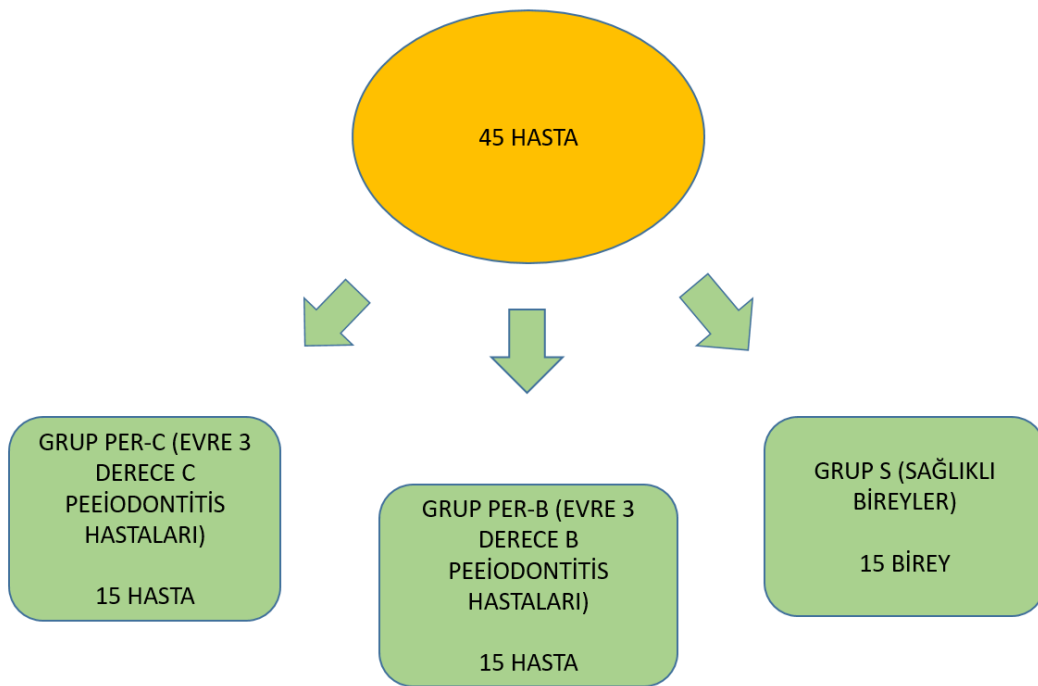
2. Sağlıklı ve hastalıklı diş eti dokularında imm nohistoimya analizi ile CD206, CD163, CCR7 biyobelirteçlerinin araştırılması



3. MATERYAL VE METOT

Çalışmaya; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, TOGÜ KAEK 2019/029 karar numaralı ve 19.02.2019 tarihli onayını takiben başlanmıştır (EK-1).

3.1. Çalışma Grupları



1-) Grup Periodontitis-C (PER-C): Grup PER C Evre 3 Derece C periodontitisli 15 hastadan oluşmaktadır. Bu grupta yer alan hastalar en az 5 yıllık süreçte fakültemizde takip ve tedavi gören bireyler arasından seçilmiştir. Son 5 yılda klinik ataçman seviyesi 2 mm ve üzerinde kayıp gösteren, mevcut biyofilme oranla kemik yıkımının fazla görüldüğü bireyler Derece C periodontitis grubuna dahil edilmiştir. Hastaların detertraj ve subgingival küretaj işlemini içeren periodontal tedavileri ve derin periodontal ceplerin

cerrahi tedavileri (flep ve subgingival küretaj) esnasında 2x2mm diş eti örnekleri elde edildi. Diş eti örnekleri her hastada hastalıktan etkilenmiş bölgelerden iki adet, toplamda ise 15 hastadan 30 adet örnek olacak şekilde alındı. Örnekler PZR ve immünohistokimya analizlerinde kullanıldı.

2-) Grup Periodontitis-B (PER-B): Grup PER-B Evre 3 Derece B periodontitisli 15 hastadan oluşmaktadır. Bu grupta yer alan hastalar en az 5 yıllık süreçte fakültemizde takip ve tedavi gören bireyler arasından seçilmiştir. Son 5 yılda klinik ataçman seviyesi 2 mm' den daha az kayıp gösteren, mevcut biyofilmle kemik yıkımının uyumlu olduğu bireyler Derece B periodontitis grubuna dahil edilmiştir. Hastaların detertraj ve subgingival küretaj işlemini içeren periodontal tedavileri ve derin periodontal ceplerin cerrahi tedavileri (flep ve subgingival küretaj) esnasında 2x2mm diş eti örnekleri elde edildi. Diş eti örnekleri her hastada hastalıktan etkilenmiş bölgelerden iki adet, toplamda ise 15 hastadan 30 adet örnek olacak şekilde alındı. Örnekler PZR ve immünohistokimya analizlerinde kullanıldı.

3-) Grup Sağlıklı (S): 15 sağlıklı bireyin çekim endikasyonu konulmuş 20 yaş diş bölgesindeki diş etinden veya preprotetik olarak kron boyu uzatma operasyonu ihtiyacı olan alanlardan eksize edilen 2x2mm diş eti örnekleri elde edildi. Her hastadan iki örnek alınarak toplamda 30 diş eti örneği elde edilecek şekilde alındı. Örnekler PZR ve immünohistokimya analizlerinde kullanıldı.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışmanın Tokat Gaziosmanpaşa Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalına tedavi olmak üzere gelen medikal anamnezinde çekim endikasyonu

konulmuş 20 yaş dişi, kron boyu uzatma veya gingivektomi endikasyonu konulmuş olan toplam 45 hasta ile yürütülmesi planlanmaktadır. Aydınlatılmış onam formunu imzalayan sağlıklı ve hastalıklı bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Bireylerin sistemik olarak sağlıklı olması
- Son 6 ay içinde diş taşı temizliği ve kök yüzeyi düzlemesi tedavisi görmemiş ve antibiyotik kullanmamış olması
- Sigara kullanmaması
- Ağız içerisinde en az 20 diş sahip olması
- 18-50 yaş arası rutin klinik ve radyografik muayenelerde periodontitis teşhisi konulması (sağlıklı grup hariç)

Dahil edilmeme kriterleri:

- Sigara içme, tütün çiğneme, alkol kullanma alışkanlığı bulunanlar
- Kooperasyonu iyi olmayanlar
- Hamileler ve laktasyon periyodunda olanlar
- Çalışmaya katılma onamı vermeyenler
- Sistemik hastalığı olanlar

3.3. Klinik Periodontal Ölçümler

Tüm hasta gruplarında tedavi öncesinde rutin muayenede kullanılan periodontal cep ölçümü, sondlamada kanama, klinik ataşman kaybı ve diş eti çekilmesi gibi periodontal klinik ölçümler her dişin 6 yüzeyinden yapılarak ve plak indeksi ile gingival indeks skorları kaydedildi. Daha sonra hastaların rutin periodontal tedavilerine (detertraj ve subgingival küretaj) başlandı.

3.3.1. Plak İndeksi (PI)

Ağızdaki plağın derecesini ölçmek için Silness-Löe plak indeksi (PI) kullanılmıştır. Bu indeks alınırken, periodontal sond diş eti kenarındaki diş yüzeyine paralel olarak hareket ettirildiğinde biriken plak miktarına göre değerlendirme yapılır.

0-Serbest diş eti kenarında plak yok,

1-Serbest diş eti kenarı ve komşu diş yüzeyine tutunmuş, film şeklinde ve sonda yardımıyla görülen plak,

2-Diş eti cebi içerisinde ve komşu diş yüzeyinde çıplak gözle izlenebilen orta derecede plak varlığı

3-Diş eti cebi ve komşu diş yüzeyinde yoğun şekilde plak varlığı (Silness & Löe, 1964)

3.3.2. Gingival İndeks (Gİ)

Diş eti enflamasyonunun teşhisi için Löe-Silness gingival indeksi (Gİ) kullanılmıştır. Bu indeks alınırken, periodontal sond dişin uzun aksına dik olacak şekilde diş eti kenarındaki diş yüzeyinde hareket ettirilerek oluşan kanama ve diş eti yüzey özelliklerine göre değerlendirme yapılır.

0-Normal, sağlıklı diş eti,

1-Hafif enflamasyon, sondalamada kanama yok, diş etinde hafif renk değişikliği

2-Orta derecede enflamasyon, sondalamada kanama varlığı, diş eti renginde kızarıklık

3-Şiddetli enflamasyon, spontan kanama varlığı, diş eti renginde belirgin ve yoğun kızarıklık (Löe & Silness, 1963)

3.3.3. Sondlama Cep Derinliği (CD)

Cep derinliği ölçümü için klinikte rutin olarak kullanılan periodontal sond diş eti içinde dişin uzun aksına paralel olarak yerleştirilerek ilk direncin hissedildiği yerde durulur ve diş eti kenarı ile cep tabanı arasındaki mesafe ölçülür.

3.3.4. Sondlamada Kanama

Sondlamada kanama diş eti oluşunun veya periodontal cebin uyarana, kısacası sondlamaya karşı verdiği yanıtı göre değerlendirilir. Sondlamada kanama değerlendirmesi iki ölçüt içermektedir. Diş eti oluşunun veya periodontal cebin tabanının uyarana karşı verdiği yanıt kanama var veya kanama yok şeklinde değerlendirilir. Periodontal sondun serbest diş eti oluşuna veya periodontal cep içerisine yerleştirildiği

zaman kanamanın olup olmaması bu değerlendirme için temel kıstas olarak bildirilmiştir (Demirel, DİŞÇİ, & MERİÇ, 1996).

3.4. İmmünohistokimya Analizi

İmmünohistokimya tekniği, bir hücre ya da dokuda özel bir antijeni (proteini) ya da hücreyi arama tekniğidir. İmmünohistokimya yönteminde, bir doku içerisindeki aranan antijenler; antikor uygulanması ve antikorun antijene spesifik bir şekilde bağlanması sonucu tanımlanabilir (De Matos, Trufelli, De Matos, & da Silva Pinhal, 2010; Glynn & McAllister, 2006).

Diş eti dokusundaki M1 makrofaj yüzey reseptörü CCR7 ve M2 makrofaj yüzey reseptörleri CD206, CD163 ekspresyonları immünohistokimya analizi ile tespit edilmiştir.

Elde edilen diş eti dokuları histolojik inceleme için tamponlanmış nötral formaldehitte fikse edildi. Formaldehitte fikse edilen diş eti örnekleri parafine gömülerek incelenecek doku kesitleri elde edildi. Doku kesitleri lam üzerine yerleştirildi. Lam üzerindeki örneklere primer, sekonder antikor uygulamasının ardından mikroskopta görüntü alabilmek için, streptavidin-biotin kompleksi kullanıldı. Lamdaki örneklerin üzeri kapatıldıktan sonra mikroskopta inceleme yapıldı.

Mikroskopta hücrelerin sayımı aynı kişi tarafından kör olarak yapıldı.

3.5. RT-PZR Yöntemi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), deoksiribo nükleik asit (DNA) içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimeler bütününe verilen isimdir (Zambon & Haraszthy, 1995). PZR yöntemi bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA veya RNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanır (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls, & Savelkoul, 2005). PZR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) sentetik oligo nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu) sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına ile gerçekleşir. Bu üç adım (denatürasyon/hibridizasyon/polimerizasyon) bir PZR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (Loomer, 2004; Zambon & Haraszthy, 1995).

PZR uygulamalarında en çok Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır (Haffajee, Yaskell, Torresyap, Teles, & Socransky, 2009). DNA sarmalının tek ipliği DNA polimeraz enzimi aracılığıyla şablon olarak kullanılır. Bu enzim reaksiyonda bulunan nükleotidlerin şablona bağlanmasını sağlar. İşlemin yapılabilmesi için enzime bir başlangıç noktası gereklidir. Başlangıç noktası kendini şablon olarak kullanılan tek DNA ipliğine bağlayabilen bir oligonükleotid tarafından üretilir. Bu oligonükleotide primer denilir (Santos, Sakai, Machado, Schippers, & Greene, 2004). DNA sarmalının her ipliğine uygun primer sağlandığında iki iplik de şablon olarak kullanılabilir. Primerler şablon ipliklere bağlanarak çoğaltılacak DNA parçasını sonlandırırlar. Yani sentezlenecek DNA bölgesi primerler tarafından belirlenir (Kim, Flynn, Donoff, Wong, & Todd, 2002). Daha sonra diğer aşamalara geçilir.

PZR üç aşamadan oluşur:

- Çift sarmal DNA'nın denatürasyonu
- Primerlerin bağlanması
- Primerlerin uzaması

Denatürasyon aşaması: Bu aşamada çoğaltılması planlanan DNA sarmalı, iplikleri bir arada tutan hidrojen bağlarının sıcaklığın 95-100 °C'a çıkarılması ile koparılır ve iki parçaya ayrılır. Böylece tek sarmal elde edilir. Eğer çoğaltılması istenen nükleotid dizisi DNA değil ribo nükleik asit (RNA) ise; ilk önce revers transkriptaz enzimi ile DNA kopyası elde edilir. PZR işlemi daha sonra uygulanır (Santos ve ark., 2004).

Primerlerin bağlanması: Bu aşamada minimum 17-19 baz uzunluğunda olması istenen primerler denatüre haldeki DNA sarmalı üzerindeki kendilerine özgü bölgelere bağlanırlar. Bu işlem için en uygun sıcaklık 40-60 °C'dır. Bir çift olacak şekilde hazırlanan primerlerin uzunluğu arttıkça özgünlüğü artar. Ancak DNA'ya bağlanması da güçleşir. Çiftler halinde ortama eklenen primerler çoğaltılacak DNA'nın her bir sarmalına 5'→3' yönünde ters yönlerde bağlanırlar. Böylece DNA molekülünün her iki zinciri de sentezlenmiş olur (Santos ve ark., 2004).

Primerlerin uzaması: Bu aşamada ise istenilen DNA parçasının tamamlanması için nükleotidler primerlere bağlanır. Nükleotidlerin primerlere bağlanması için Taq Polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim *Thermus aquaticus* isimli bakteri türünden elde edilir. Uygun sıcaklık 70-75 °C'dır (Santos ve ark., 2004).

Her üç aşama tek bir döngü kabul edilir ve yaklaşık 3-5 dakika sürer. PZR işlemi 20-40 döngüden oluşur. Her döngü sonrası bir önceki döngüdekinin 2 katı DNA elde edilir (Santos ve ark., 2004).

Farklı nükleik asit yöntemleri karşılaştırıldığında PZR hassasiyet sınırlarının genişliği açısından en iyi yöntemdir (Shaddox ve ark., 2007).

Çalışmaya dahil edilen hastalardan diş eti büyümesi veya yetersiz kron boyu yüksekliğinin tedavisinde rutin tedavi yöntemlerinden biri olan gingivektomi yöntemiyle diş eti örnekleri toplanmıştır. Toplanan diş eti biyopsilerinin en az 2x2mm boyutunda olmasına dikkat edilmiştir. Diş eti örnekleri analiz gününe kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Alınan diş eti dokularının bir kısmı sıvı nitrojende dondurularak bir homojenizatör yardımıyla homojenize edilecek ve sonrasında ultrasonikasyon uygulanmıştır. Son olarak 25000g'de 16 dakika santrifüj edilerek homojenatlar elde edilmiştir. Homojenatlarda IL-10, IL-12, IL-23, Arg-1 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile analiz edilmiştir.

İlk olarak mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir, mRNA izolasyonu daha önce Cacac ve ark.'larının (2014) tarif ettiği gibi Trizol RNA ekstraksiyon reaktifi kullanılarak elde edilmiştir. Kısaca, hücreler Trizol içinde lizis edilerek 5 dakika süreyle bir çalkalayıcıda rotasyonda bırakılmıştır. Daha sonra kloroform ilave edilip 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra numuneler santrifüj edilip sulu faz bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Sulu faza izopropanol eklenip ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilip tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeyi takiben, dipte biriken pelet kısmı % 75 lik soğuk etanol ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edilmiş ve RNase içermeyen steril saf su içinde süspanse edilmiştir. Elde edilen mRNA nın miktarı bir nanodrop yardımıyla belirlenmiştir. Daha sonra one step real time (Thermo AB4104C) qRT-PZR kiti kullanılarak, 1 mg mRNA ilgili geni hedefleyen spesifik primerler yardımıyla IL-12 forward: 5-ATCTGGCGTCTACACTGCTG-3 reverse: 5-TTGAACGCTGACCATAGAG-3, IL23 forward: 5-AGCTTCATGCCTCCCTACTG-

3 reverse: 5-CTGCTGAGTCTCCCAGTGGT-3, IL-10 forward: 5-CGCTGTCATCGATTTCTCC-3 reverse: 5-ACACCTTGGTCTTGGAGCTT-3, Arg-1, forward: 5-TTTTCCAGCAGACCAGCTT-3 reverse: 5-AGAGATTATCGGAGCGCCTT-3. mRNA ifadesi gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) mRNA düzeylerine normalleştirilmiş GAPDH forward primer: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', GAPDH reverse primer: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'). Döngü koşulları aşağıdaki gibi seçilmiştir: Ters transkripsiyon (50 ° C, 30 dk), Denatürasyon (95 ° C, 10 dk), Amplifikasyon (15 sn için 95 ° C, 30 sn için 55 ° C, 35 sn için 72 ° C) ve Soğutma (37) C, 30 saniye. İlgili gen ekspresyonu ölçülmüş, 3 replikasyon yapılmıştır ve $2^{-\Delta\Delta ct}$ yöntemi ile GAPDH' ye normalleştirilmiştir ($2^{-\Delta ct}$ - (CP - GAPDH_CP)) (Berkel & Cacan, 2020). RT-PZR yöntemi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında Dr. Öğretim Üyesi Ercan ÇAÇAN ve Arş. Gör. Hayrunnisa KASAP tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda Minitab 16 programı kullanılarak yapılan güç analizi sonucuna göre örneklem sayısı ve denek sayısı belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (SPSS inc, Chicago, IL.).

Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları One Sample Kolmogorov Smirnov testi normalite testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası yaş ve CD206 verilerin değerlendirilmesinde Oneway ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır. Gruplar arası Pİ, Gİ, Cepb, ataçman, cinsiyet, IL-10, IL-12, IL-23, Arg-1, CD163, CCR7'nin değerlendirilmesinde ise Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır.

Sonuçların istatistiksel olarak anlamlılığının değerlendirmesinde % 95 güven aralığı ve 0,05 anlamlılık seviyesi baz alınmıştır.



4.BULGULAR

Çalışmamıza katılan tüm katılımcılardan başarılı bir şekilde ölçümler yapılmış ve örnekler alınmıştır. Çalışma verilerinin istatistiksel analiz sonuçları aşağıda sunulmuştur.

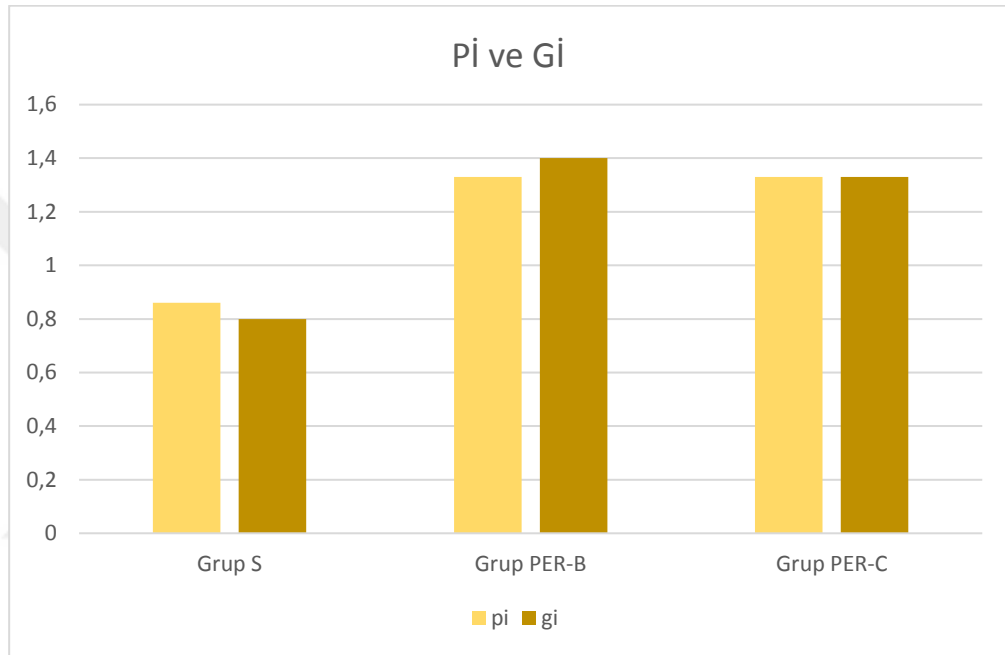
4.1. Klinik Bulgular

Araştırma sonuçlarının demografik verileri ve klinik ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

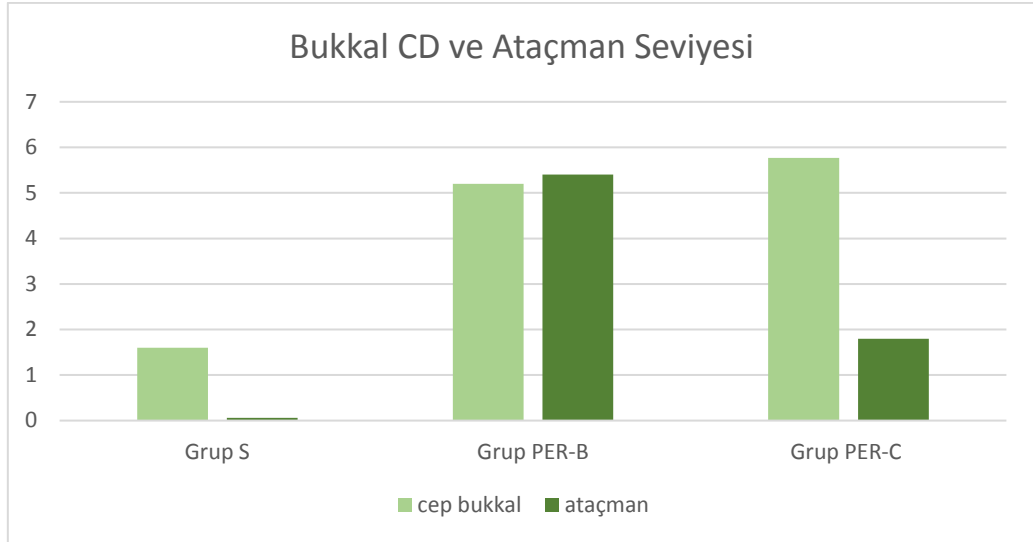
Gruplar/ Parametreler	Grup S	Grup PER-B	Grup PER-C
yaş	28,80±5,15	30,33±4,01	28,93±4,93
Pİ	0,86± 0,35 Maks: 1,00 Min: ,00 Medyan: 1,00	1,33±0,45 ^a Maks: 2,00 Min: 1,00 Medyan: 2,00	1,33±0,48 ^a Maks: 2,00 Min: 1,00 Medyan: 1,00
Gİ	0,80±0,56 Maks: 2,00 Min: ,00 Medyan: 1,00	1,40±0,50 ^a Maks: 2,00 Min: 1,00 Medyan: 2,00	1,33±0,35 ^a Maks: 2,00 Min: 1,00 Medyan: 1,00
CD bukkal	1,60±0,46 Maks: 2,30 Min: 1,00 Medyan: 2,00	5,20±0,37 ^a Maks: 5,80 Min: 2,30 Medyan: 5,00	5,77±0,86 ^a Maks: 10,50 Min: 4,50 Medyan: 7,00
Ataçman seviyesi	0,06±0,25 Maks: 1,00 Min: ,00 Medyan: ,00	5,40±0,45 ^a Maks: 6,00 Min: 4,00 Medyan: 5,00	6,00±1,13 ^a Maks: 11,00 Min: 4,00 Medyan: 6,00
Cinsiyet	1,46±0,51	1,46±0,51	1,46±0,51

Tablo 4. 1.: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler ($p < 0,05$ Grup S’den farklılığı ifade etmektedir.)

Grup S'ye dâhil edilen hastaların yaş ortalaması $28,80 \pm 5,15$, Grup PER-B' ye dâhil edilen hastaların yaş ortalaması $30,33 \pm 4,01$ ve Grup PER-C' ye dâhil edilen hastaların yaş ortalaması $28,93 \pm 4,93$ bulunmuştur. Gruplar arasında yaş ve cinsiyette istatistiksel olarak fark yoktur ($p > 0,05$) (Tablo 4.1).



Şekil 4. 1.: Gruplar arası plak indeksi ve gingival indeks

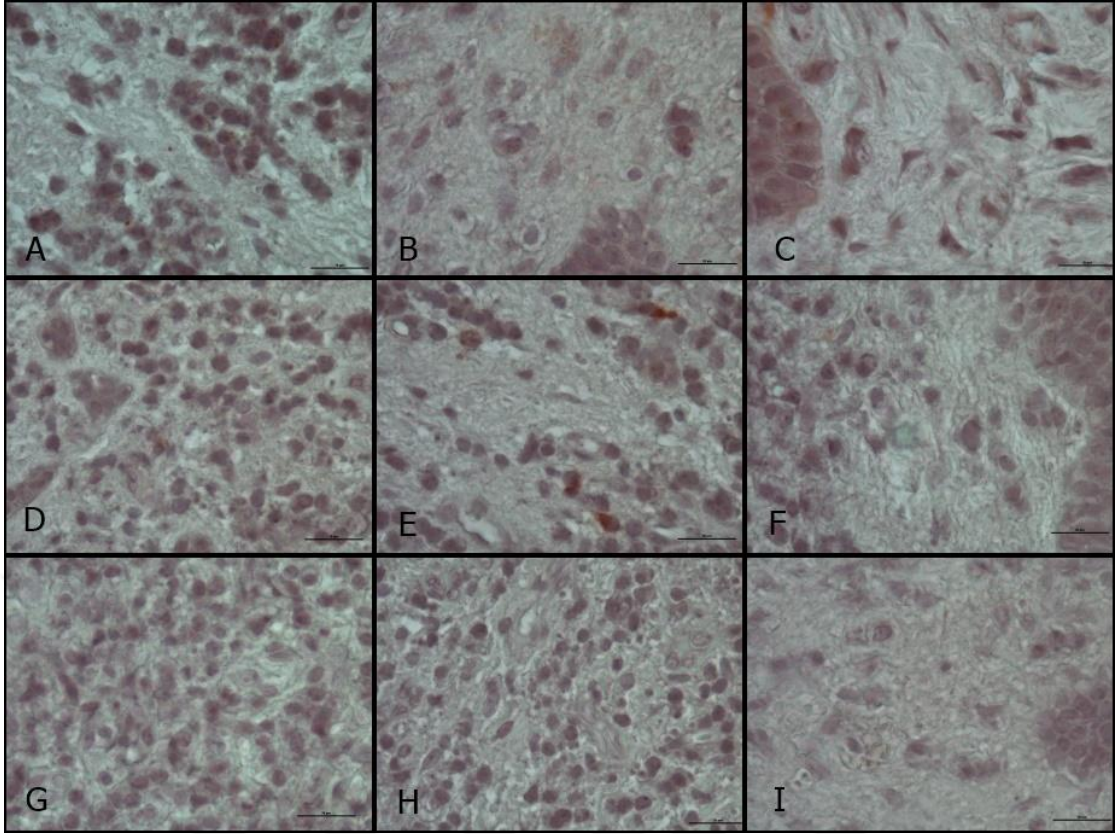


Şekil 4. 2.: Gruplar arası Bukkal Cep derinliği ve Ataçman Seviyesi

PI, GI, bukkal cep derinliği, ataçman seviyesi değerlendirildiğinde Grup PER –B ve Grup PER-C’ de Grup S’e göre anlamlı derecede yüksek değerler bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.1, Şekil 4. 2). Grup PER-C ve Grup PER-B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

4.2. İmmünohistokimya Bulguları

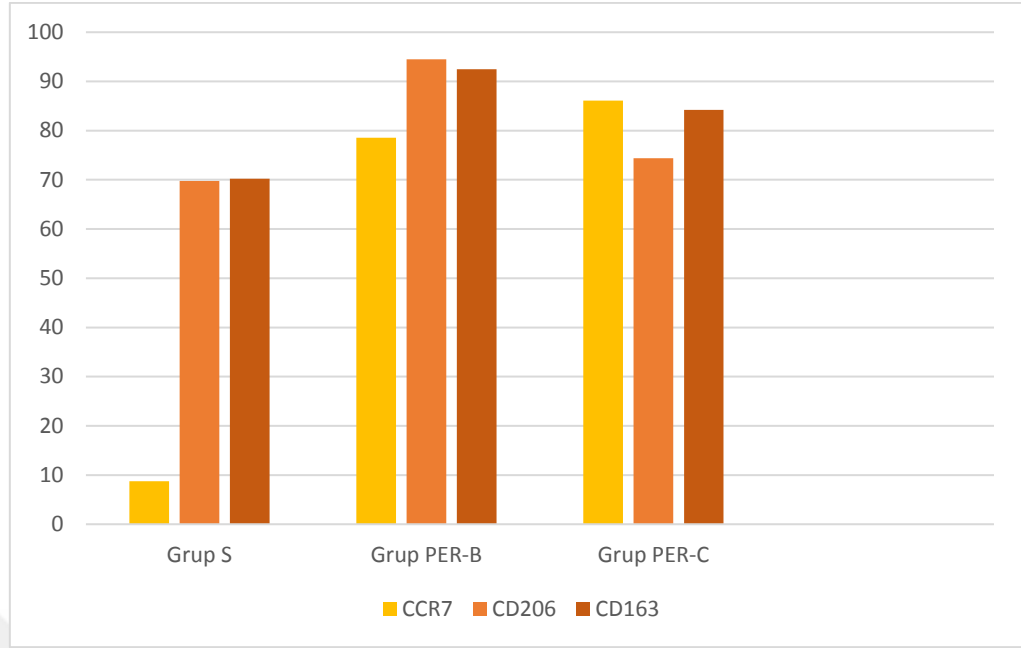
İmmünohistokimya tekniği, bir hücre ya da dokuda özel bir antijeni (proteini) ya da hücreyi arama tekniğidir (De Matos ve ark., 2010; Glynn & McAllister, 2006). Çalışmamızda M1 biyobelirteci olan CCR7, M2 biyobelirteçleri olan CD206 ve CD163 immünohistokimya tekniği ile analiz edilmiştir.



Şekil 4. 3.: İmmünohistokimya Görüntüleri: Derece C periodontitisli bireylerde CCR7 (**A**), CD163 (**D**), CD206 (**G**). Derece B periodontitisli bireylerde CCR7 (**B**), CD163 (**E**), CD206 (**H**). Sağlıklı bireylerde CCR7 (**C**), CD163 (**F**), CD206 (**I**).

Gruplar/ Parametreler	Grup S	Grup PER-B	Grup PER-C
CCR7	8,71±12,28 Maks: 35,38 Min: ,00 Medyan: ,64	78,54±33,54 ^a Maks: 127,78 Min: 17,78 Medyan: 80,0	86,10±23,80 ^a Maks: 120,00 Min: 46,67 Medyan: 85,71
CD206	69,80±33,27 Maks: 100,00 Min: ,55	94,50±19,26 Maks: 125,81 Min: 70,00	74,38±28,47 Maks: 121,74 Min: 30,77
CD163	70,25±40,74 Maks: 110,00 Min: 5,00	92,45±13,73 Maks: 112,55 Min: 74,56	84,20±24,00 Maks: 126,92 Min: 52,57

Tablo 4. 2: Çalışmanın immünohistokimyasal verileri (ap<0,05 Grup S'den farklılığı ifade etmektedir.)



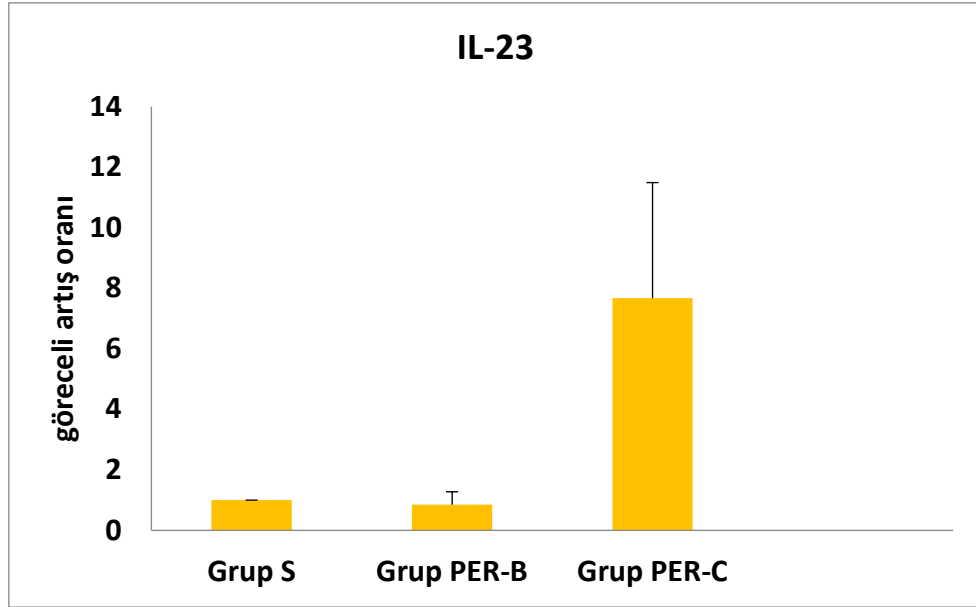
Şekil 4. 4.: İmmünohistokimya verileri

Gruplar arası CD206 ve CD163 biyobelirteçleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).

CCR7 seviyesi değerlendirildiğinde Grup PER-B ve Grup PER-C' de Grup S'ye göre anlamlı derecede yüksek değerler bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.4). Grup PER-B ve Grup PER-C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.4).

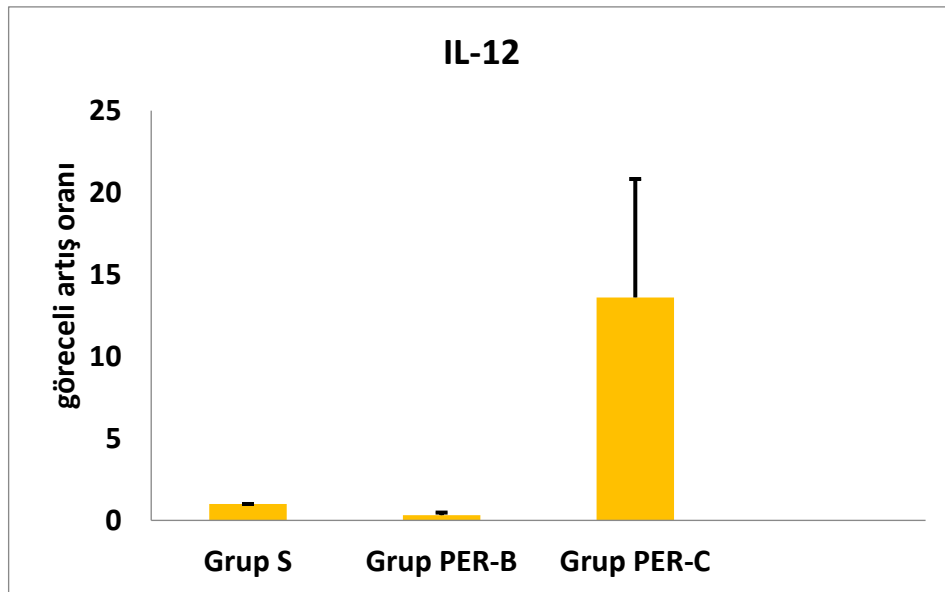
4.3. RT-PZR Bulguları

PZR yöntemi bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA veya RNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanır (Boutaga ve ark., 2005). Çalışmamızda kullandığımız IL-23, IL-12, IL-10 ve Arg-1 oranları PZR yöntemi ile tespit edilmiştir.



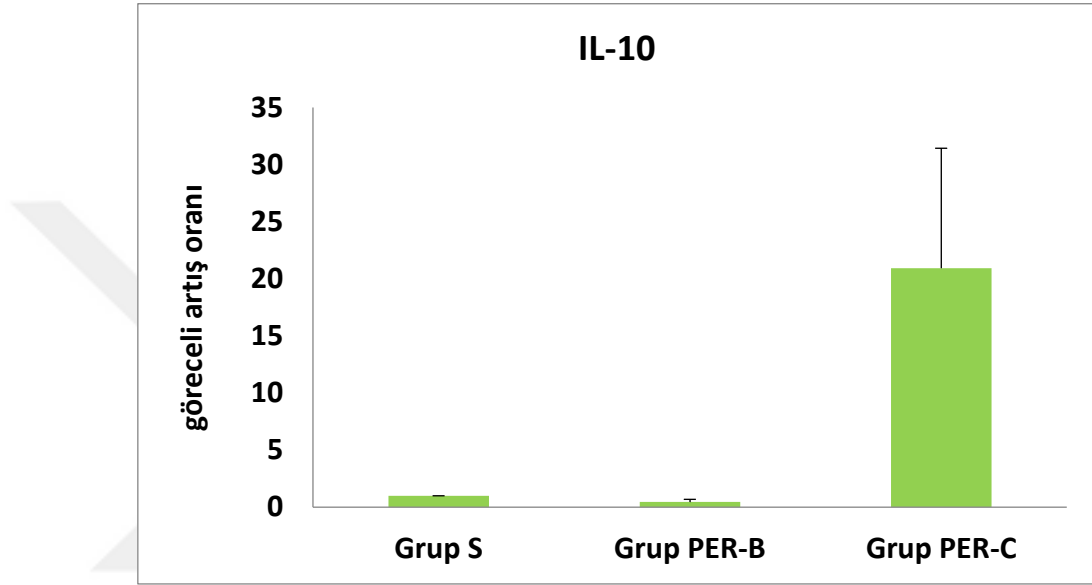
Şekil 4. 5.: IL-23 PZR sonuçları

PZR verilerine göre IL-23 değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.5). Eksprese edilen IL-23 miktarı Grup S'ye oranla Grup PER-B'de yaklaşık 0,2 kat daha az bulunmuştur. Grup S'ye göre Grup PER-C' de yaklaşık 4 kat fazla bulunmuştur.



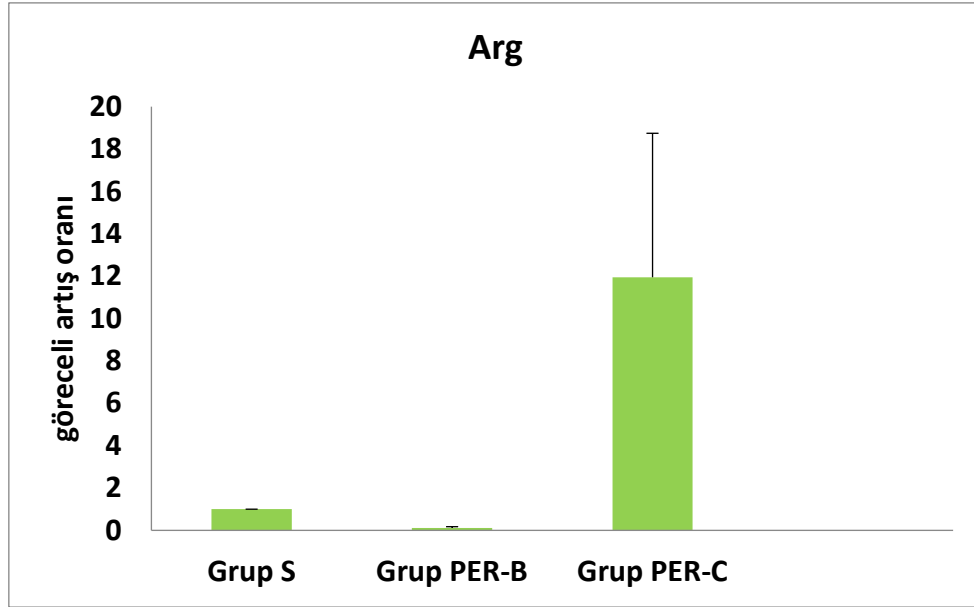
Şekil 4. 6.: IL-12 PZR sonuçları

IL-12 değeriendirildiğinde istatiksels olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.6). Eksprese edilen IL-12 miktarı Grup S'ye oranla grup PER-B' de yaklaşık 0,5 kat daha az bulunmuştur. Grup S' ye göre Grup PER-C' de yaklaşık 7 kat fazla bulunmuştur.



Şekil 4. 7.: IL-10 PZR sonuçları

IL-10 değeriendirildiğinde istatiksels olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.7). Eksprese edilen IL-10 miktarı Grup S'ye oranla grup PER-B' de yaklaşık 0,5 kat daha az bulunmuştur. Grup S' ye göre Grup PER-C' de yaklaşık 20 kat fazla bulunmuştur.



Şekil 4. 8.: Arg-1 PZR sonuçları

Arg-1 değerlendirildiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.8). Eksprese edilen Arg-1 miktarı Grup S'ye oranla grup PER-B' de yaklaşık 4 kat daha az bulunmuştur. Grup S' ye göre Grup PER-C' de yaklaşık 6 kat fazla bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

M1 makrofajları enflamasyonda artışa sebep olan "öldürücü" tip makrofajlar, M2 makrofajları ise rutin olarak onaran "iyileştirici" tip makrofajlar olarak tanımlanır (Williams ve ark., 2016). Bu M1 ve M2 makrofaj fenotip farkı makrofaj polarizasyonu olarak ifade edilir. Periodontitis gibi enflamatuvar hastalıkların patogeneğinde bu polarizasyonun anlaşılması hastalık sürecinin anlaşılmasında önemli olabilir. Bu çalışmada kullanılan biyobelirteçler M1 (CCR7, IL-12, IL-23) ve M2 (CD206, CD163, IL-10, Arg-1) belirleyicisi olarak bilinmektedir, bu sebeple sırasıyla M1 ve M2 makrofaj fenotipleri enflamatuvar ve antienflamatuvar durumu yansıtmaktadırlar (Yang ve ark., 2018).

Makrofaj polarizasyonu ve dokulardaki M1-M2 makrofaj oranı periodontal hastalığın seyri, yapılan periodontal tedavinin etkinliği ve hastalığın prognozu açısından oldukça önemlidir. Yang ve ark.'ları (2018) periodontal enflamasyonu olan bireylerde M1 makrofaj fenotipinde artış bildirmişlerdir (Yang ve ark., 2018). Benzer şekilde bakteri ve bakteriyel virölans faktörlerine maruz kalan makrofaj öncülü hücrelerin M1 makrofaja dönüşme oranlarının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Yang ve ark., 2018). Ayrıca Yu ve ark.'ları (2016) periodontal enflamasyonlu bireylerde M2 makrofaj fenotipinde, M1 fenotipine oranla çok daha az olmakla birlikte artış olduğunu bildirmişlerdir. Enflamasyonun baskın olduğu periodontitis gibi kronik seyirli hastalıklarda makrofaj polarizasyonu hastalığın tüm evrelerinde önemli bir role sahiptir (Yu ve ark., 2016).

En önemli M1 makrofaj biyobelirteçlerinden olan CCR7'nin periodontal enflamasyonda anlamlı derecede yükseldiği, M2 makrofaj biyobelirteçlerinden olan CD206 ve CD163 seviyelerinin değişmediği tespit edilmiştir. CCR7 M1 polarizasyonu,

CD206 ve CD163 (M2) polarizasyonu için spesifik olarak araştırılan biyobelirteçlerdir ve dokudaki varlıkları enflamatuvar ve antienflamatuvar durumu yansıtır (Yang ve ark., 2018). Yang ve ark.'ları (2018) çalışmalarında periodontitis grubunda CCR7, iNOS/CD206, CD163 oranını gingivitis grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuştur (Yang ve ark., 2018). Yine benzer bir çalışma olan Yu ve ark.'ları (2016) deneysel periodontitis oluşturarak yaptıkları çalışmada periodontitisli diş etinde artmış iNOS / CD206 oranı tespit etmişlerdir (Yu ve ark., 2016). Bu sonuçlar periodontitisli dokularda M2'nin M1'e (M1 polarizasyonu) fenotipik geçişini göstermektedir. Maymunlar üzerinde deneysel periodontitis oluşturularak yapılan bir çalışmada CCR7 gen ekspresyonunun yaşlanma ve periodontitis ile anlamlı derecede artış gösterdiği bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 2015). Farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada yabancı maddeye maruz kalan enflamasyonlu dokularda CCR7 artışına bağlı olarak M1 makrofaj fenotipinde artış tespit edilmiştir (X. Wang, Li, Feng, Cheng, & Li, 2019). Miyajima ve ark.'ları (2014) deneysel periodontitis oluşturdukları hayvanların dolaşım sisteminde M1 makrofaj fenotipinde artış tespit etmişlerdir (Miyajima ve ark., 2014). Benzer şekilde Lam ve ark.'ları da (2016) *P. gingivalis* kullanarak oluşturdukları deneysel periodontitisli dokularda M1 fenotipinde M2'ye oranla yüksek derecelerde artış olduğunu bildirmişlerdir (Lam ve ark., 2016). Veloso ve ark.'larının (2020) yaptıkları bir çalışmada enflamasyonlu dokularda CD163 seviyesinde önemli derecede düşüş gözlenmiştir (Veloso ve ark., 2020). Bu sonuç enflamasyonlu dokularda M2 fenotipine göre baskın bir M1 fenotipi olduğunu doğrulamaktadır. Detzen ve ark.'larının (2017) yaptığı benzer bir çalışmada periodontitisli hastaların serum, tükürük ve dişeti dokularında CD163 düzeyleri periodontal olarak sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Detzen, Chen, Cheng, Papapanou, & Lalla, 2017). M2 makrofaj fenotipini yansıtan CD163'teki

artış enflamasyonlu dokularda makrofaj miktarının fenotipe bağlı olmaksızın artışını yansıtır olabilir. Viniegra ve ark.'larının (2018) deneysel periodontitis çalışmalarında ise periodontitisin erken enflamatuvar sürecinde M1 makrofaj miktarında artış gözlenmiş ve iyileşme gözlenen ilerleyen dönemde CD206' da artış tespit edilmiştir (Viniegra ve ark., 2018). Bu sonuçlar iyileşen dokularda antienflamatuvar özellikteki M2 makrofaj fenotipinin arttığını gösterebilir. Garaicoa-Pazmino ve ark.'ları (2019) çalışmalarında M1 ve M2 makrofaj fenotipinin gingivitisli bireylerde sağlıklı ve periodontitisli bireylere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sağlıklı ve periodontitisli bireyler M1 ve M2 makrofaj fenotip seviyeleri benzer bulunmuştur (Garaicoa-Pazmino ve ark., 2019). Zhou ve ark.'ları (2019) M1 makrofaj fenotipinin (CD80/iNOS, IL-12, IL-6, TNF alfa) gingivitisli bireylerde yüksek olduğunu ancak periodontitisli bireylerde sağlıklı gruba benzer olduğunu bildirmişlerdir (L. N. Zhou ve ark., 2019). M2 makrofaj fenotipinin (CD80/206, IL-10, IL-4) gingivitisli grupta diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu periodontitisli grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (L. N. Zhou ve ark., 2019). Yine benzer sonuçlar bildiren Ballini ve ark.'ları sağlıklı bireylerin kan örneklerindeki M1(CD86) ve M2(CD163,CD206) makrofaj miktarının periodontitisli bireylerden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Ballini ve ark., 2020).

Garaicoa-Pazmino ve ark. (2019), Zhou ve ark. (2019) ve Ballini ve ark.'larının (2020) bulgularının aksine literatürdeki bu çalışmaların verileri (Yang ve ark., 2018; Yu ve ark., 2016; Gonzalez ve ark., 2015; X. Wang ve ark., 2019; Miyajima ve ark., 2014; Lam ve ark., 2016 ; Veloso ve ark., 2020; Detzen ve ark., 2017; Viniegra ve ark., 2018), bu tez çalışmasını destekler nitelikte makrofajların hem M1 hem de M2 fenotiplerinin periodontitiste artış gösterdiğini ancak fenotipik değişimin yüksek oranda M1

makrofajlarına doğru olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın bulgularında en önemli M1 makrofaj yüzey reseptörü olan CCR7 miktarının sağlıklı grupta periodontitisli gruplara göre daha az olduğu, Grup PER-C’de ise Grup PER-B’ye göre hafif artış gösterdiği tespit edildi. CD206 ve CD163 miktarları ise periodontitisli gruplarda sağlıklı gruplara göre hafif bir artış göstermiştir bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Dokularda M1 makrofaj fenotip artışı proenflamatuvar bir duruma neden olarak IL-12, IL-23 salınımını uyarır M2 makrofaj fenotip artışı ise enflamasyonu baskılayarak IL-10, Arg-1 salınımını uyarır (Veloso ve ark., 2020;Liu ve ark., 2019). Veloso ve ark.’larının (2020) yaptıkları bir çalışmada enflamasyonlu dokularda IL-12, IL-23, IL-10 sitokinlerinde önemli derecede artış gözlenirken, CD163 seviyesinde önemli derecede azalma gözlenmiştir (Veloso ve ark., 2020). Zhou ve ark.’larının (2019) gingivitis ve periodontitisli dokularda makrofaj fenotipini araştırdıkları çalışmalarında, IL-12 seviyeleri periodontitisli ve gingivitisli gruplarda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, IL-10 miktarında gruplar arasında fark bulunmamıştır (L. N. Zhou ve ark., 2019). Liu ve ark.’ları (2019) yaptıkları bir çalışmada periodontal ligament (PDL) kök hücrelerinin rejeneratif periodontal tedavide kullanımı sırasında makrofajların M1 / M2 polarizasyonunun doku homeostazına ve yara iyileşmesine katılıp katılmadığını araştırmışlardır. Periodontal rejenerasyon gözlenen dokularda CD163, IL-10 ve Arg-1 seviyesinde artış gözlenmiştir (Liu ve ark., 2019). Viniegra ve ark.’larının (2018) deneysel periodontitis çalışmalarında periodontitisin erken enflamatuvar sürecinde M1 makrofaj miktarında artış bildirilmiştir. İyileşme gözlenen ilerleyen dönemde IL-10, CD206, Arg-1 gibi M2 biyobelirteçlerinde artış tespit edilmiştir (Viniegra ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında M1 polarizasyonuna işaret eden IL-12 ve IL-23 sitokinlerinde Derece C periodontitisli hastalarda artış gözlenmiştir. M2 makrofaj yüzey reseptörleri (CD163,

CD206) gruplar arasında benzer bulunurken, Arg-1 ve IL-10 sitokinleri Derece C periodontitisli hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup Derece B periodontitisli örneklerde ise azalma gözlenmiştir. M1 makrofajlar yüksek seviyelerde IL-12, IL-23 düşük seviyelerde IL-10 üretir (Sima & Glogauer, 2013). M1 biyobelirteci olan IL-12 ve IL-23' teki artış proenflamatuvar durumu yansıtırken, M2 biyobelirteci olan IL-10 ve Arg-1' deki artış proenflamatuvar yanıtı karşı oluşan antienflamatuvar yanıtı yansıtmaktadır. Bu sonuçlar makrofajların işlevsel olarak daha yüksek proenflamatuvar ve daha düşük antienflamatuvar sitokin profilleri oluşturmalarından ziyade özellikle enflamasyonlu dokularda M2 fenotipine göre baskın bir M1 fenotipi olduğunu doğrulamaktadır.

Periodontal dokularda deneysel olarak M2 makrofaj fenotipinin artırılmasının M1 makrofaj fenotipini baskıladığı ve buna bağlı olarak M1 makrofajların proenflamatuvar sitokin üretiminin azaldığı, M2 makrofajların ise antienflamatuvar sitokin üretiminin arttığı varsayılmaktadır (Zhuang ve ark., 2019). Bu sonuçları Sima ve Glogauer'ın (2013) makalelerindeki bilgilerde desteklemektedir. Periodontal hastalıkların da içinde bulunduğu kronik osteolitik hastalıklarda, kemik yıkım bölgelerinde yüksek miktarda M1 makrofaj kaynaklı IL-1 β ve TNF- α bulunur ve bu biyobelirteçlerdeki artış osteoklastogeneze aracılık eder. Bununla birlikte, M2 makrofajları, osteoklast aktivitesi ve osteoblast işlevleri için kritik sinyaller sağlayabilir ancak kemik homeostazı üzerindeki etkisi hala tam olarak anlaşılmamıştır (Sima & Glogauer, 2013).

M1 polarizasyonunun periodontal dokularda enflamasyon şiddetiyle paralel artış gösterdiği Feratvurs ve ark.'ları (2020) tarafından bildirilmiştir. Şiddetli enflamatuvar durumlarda artmış M1 polarizasyonu enflamasyonda ve doku yıkımında artışı

düşündürmektedir. M1 polarizasyonu enflamasyon şiddetiyle güçlü bir ilişki içindeyken dokulardaki M2 makrofaj polarizasyonu ile ortamdaki enflamatuvar durum arasında güçlü bir ilişki bulunmamıştır (Fretwurst ve ark., 2020). Miao ve ark.'ları (2020) IL-4, IL-13 ve IL-10 kombinasyonu ile M2 polarizasyonunu indüklemişlerdir. İndüklenmiş M2 makrofajların periodontal dokularda enflamatuvar süreci baskılayarak osteoklast farklılaşmasını önlediğini ve periodontitis semptomlarını gidermede etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Miao, He, Qi, & Lin, 2020). Periodontitis başlıca *P. gingivalis* olmak üzere birçok patojenik bakterinin katkıda bulunduğu enflamatuvar olaylar sonucunda gelişir. *P. gingivalis*'in en önemli virülans faktörlerinden olan *P. gingivalis* polisakakritleri ve gingipainlerin M1 polarizasyon göstergeleri olan IL-12, IL-23, iNOS, TNF- α ve IL-1 β ' yı önemli düzeyde artırdığı gösterilmiştir. IL-10 seviyeleri ise proenflamatuvar sitokinlerden farklı olarak *P. gingivalis* polisakakritleri ve gingipainlerin sonuçlarından etkilenmemiştir (Hou ve ark., 2017). Hee ve ark.'ları (2015) periodontal dokularda artan enflamasyonla birlikte M1/M2 oranında artış gözlemişlerdir. M1/M2 oranındaki artışın dokularda enflamasyon ve kemik yıkımına sebep olduğunu, M1/M2 oranındaki azalmanın ise bu durumu tersine çevirdiğini bildirmişlerdir (He ve ark., 2015).

Wolf ve ark.'ları (2014) Hasar görmüş insan periodontal ligament hücrelerinin CD163 seviyelerini ve M2 polarizasyonunu artırdığını ve makrofajların osteoklastik farklılaşma ve göçlerini azaltarak periodontal doku tamirine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Wolf, Lossdörfer, Craveiro, & Jäger, 2014). Benzer şekilde Yamamichi ve ark.' larıda (2017) periodontal dokularda doku rejenerasyonunun M2 makrofaj polarizasyonu ve artmış CD163, CD206 seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Yamamichi ve ark., 2017). Wang ve ark.' larıda (2019) enflamasyon varlığında M1

makrofajların baskın olduğunu ve sağlıklı dokularda M2 makrofajların baskın olduğunu göstermiştir (X. Wang ve ark., 2019).

Literatürde yapılan çalışmaların birçoğu M1 makrofaj polarizasyonunu araştırmış ve periodontitiste M1 fenotipinde artış olduğunu belirtmiştir (Gheren, Cortelli, Rodrigues, Holzhausen, & Saad, 2008; Górska ve ark., 2003; Güllü, Ozmeric, Tokman, Elgün, & Balos, 2005). Bununla birlikte M2 makrofaj fenotipinin arttığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Gheren ve ark., 2008; Navarrete ve ark., 2014). Ancak bunun aksine literatürde periodontitis lezyonlarında bulunan M2 fenotipinde azalma gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Güllü ve ark., 2005; Lam ve ark., 2014). Bu çalışmanın bulguları ise yıkım ilerleme hızını gösteren periodontitis derecesinden bağımsız olarak periodontitisli örneklerde M1 (CCR7) polarizasyonunda anlamlı bir artış göstermiştir, M2 (CD206, CD163) makrofaj polarizasyonu ise sağlıklı ve periodontitisli bireylerde benzer bulunmuştur. Ek olarak M1 polarizasyonuna işaret eden sitokinler olan IL-12, IL-23 seviyeleri M1 yüzey reseptörü olan CCR7 ile paralellik göstermiştir. Bununla birlikte M2 polarizasyonuna işaret eden göstergeler olan IL-10 ve Arg-1 seviyeleri ise gruplarda farklılık göstermeyen M2 yüzey reseptörlerinin aksine Derece C periodontitisli bireylerde artış göstermiştir.

Bu tez çalışmasına 18-50 yaş arasında sistemik olarak sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Yaş periodonsiyumun yapısal özelliklerine, periodontitise karşı verilen bağışıklık yanıtına ve bireylerin günlük oral hijyen alışkanlıklarına etki eden önemli bir faktördür. Çalışma gruplarında bireyler arasında yaşta fark bulunmamıştır. Bu sayede; periodonsiyumun yapısal özelliklerinde, periodontitise karşı immün yanıtta ve gündelik oral hijyen gereksinimlerinin yerine getirilebilme seviyelerinde bir değişken olan yaş ve sistemik durum faktörlerinin elimine edilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, klinik verilerin değerlendirilmesinde, periodontal sağlık durumlarının belirlenmesinde Silness-Löe plak indeksi ve Löe-Silness gingival indeksleri kullanılmıştır (Harks ve ark., 2016; Kinane ve ark., 2015; Löe & Silness, 1963; Silness & Löe, 1966; Toiviainen ve ark., 2015). Tüm bireylerin periodontal sağlık durumunu gösteren klinik periodontal parametreleri (Pİ, Gİ, CD) ölçülmüştür. Sağlıklı bireylerde Pİ, Gİ ve cep derinliği periodontitisli bireylere oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Periodontitisli gruplar arasında fark bulunmamıştır. Gruplar arasındaki fark periodontitis ve sağlıklı gruplar arasındaki klinik farkı yansıtmaktadır. Çalışma grupları; hastaların klinik olarak sağlıklı olmalarına ve periodontitis hastalarında periodontitis derecelerine göre oluşturulmuştur.

İmmunohistokimya tekniği, bir hücre ya da dokuda özel bir antijeni (proteini) ya da hücreyi arama tekniğidir (De Matos ve ark., 2010; Glynn & McAllister, 2006). Çalışmamızda M1 biyobelirteci olan CCR7, M2 biyobelirteçleri olan CD206 ve CD163 immünohistokimya tekniği ile analiz edilmiştir.

PZR yöntemi bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA veya RNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanır (Boutaga ve ark., 2005). Çalışmamızda kullandığımız IL-23, IL-12, IL-10 ve Arg-1 oranları PZR yöntemi ile tespit edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde enflamatuvar hastalıklarla makrofaj polarizasyon ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu tez çalışması farklı periodontitis derecelerinde makrofaj fenotiplerini karşılaştıran ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasında sağlıklı, Derece C ve Derece B periodontitisli bireylerde diş çevresi bağ dokularında M1 ve M2 makrofaj fenotipleri karşılaştırılmıştır.

1. CCR7'nin immünohistokimya bulgularında, sağlıklı gruptaki CCR7 seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı düzey ve ölçüde düşük bulunmuştur. Periodontitisli gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.
2. CD163 ve CD206'nın immünohistokimya bulgularında, gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.
3. Yapılan PZR analizleri sonucunda IL-12 ve IL-23 ekspresyon seviyesi; Derece C periodontitis grubunda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Derece B periodontitis grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur.
4. Yapılan PZR analizleri sonucunda IL-10 ve Arg-1 ekspresyon seviyesi; Derece C periodontitis grubunda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Derece B periodontitis grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre enflamasyonlu dokularda M1 fenotip polarizasyonunda artış gözlenmektedir. Derece C periodontitisli örneklerde, Derece B periodontitisli örneklere göre M1 ve M2 makrofaj fenotipinde hafif bir artış tespit edilmiştir. Derece C

periodontitiste enflamasyonun hızlı ilerlemesi makrofaj üretimindeki bir miktar artışı yansıtır olabilir.



KAYNAKÇA

- Abe, T., Hara, Y., & Aono, M. (1991). Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. *J. Periodontal Res.*, 26(5), 429-439.
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., . . . Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016-1025.
- Albandar, J. M., Susin, C., & Hughes, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J. Clin. Periodontol.*, 45, S171-S189.
- Armitage, G., Dickinson, W., Jenderseck, R., Levine, S., & Chambers, D. (1982). Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J. Periodontol.*, 53(9), 550-556.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S., & Graves, D. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol. Res.*, 160(1), 403-409.
- Ballini, A., Dipalma, G., Isacco, C. G., Boccellino, M., Di Domenico, M., Santacroce, L., . . . Boddi, A. (2020). Oral microbiota and immune system crosstalk: A translational research. *Biology*, 9(6), 131.
- Bashir, S., Sharma, Y., Elahi, A., & Khan, F. (2016). Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *J. Inflamm. Res.*, 65(1), 1-11.

- Belgiovine, C., D'Incalci, M., Allavena, P., & Frapolli, R. (2016). Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73(13), 2411-2424.
- Berkel, C., & Cacan, E. (2020). In silico analysis of DYNLL1 expression in ovarian cancer chemoresistance. *Cell Biol. Int.*
- Beschin, A., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2013). Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. *J. Pathol.*, 229(2), 186-197.
- Biswas, S. K., Chittezhath, M., Shalova, I. N., & Lim, J.-Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.*, 53(1-3), 11-24.
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.*, 15(4), 432-437.
- Błach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 53(3), 245-253.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Microbiol Immunol*, 45(2), 191-199.
- Braga, T. T., Agudelo, J. S. H., & Camara, N. O. S. (2015). Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front. immunol.*, 6, 602.
- Bryant, C., & Fitzgerald, K. A. (2009). Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol*, 19(9), 455-464.
- Cassetta, L., Cassol, E., & Poli, G. (2011a). Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.*, 11.
- Cassetta, L., Cassol, E., & Poli, G. (2011b). Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World J.*, 11, 2391-2402.

- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L., Jepsen, S., Kornman, K. S., . . . Tonetti, M. S. (2018a). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Periodontol.*, 89, S1-S8.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L., Jepsen, S., Kornman, K. S., . . . Tonetti, M. S. (2018b). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification: Wiley Online Library.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.* 2000 64(1), 57-80.
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Nikiforov, N. G., Elizova, N. V., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2015). Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: the associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. *Int. J. Cardiol.*, 184, 436-445.
- Chua, C. L. L., Brown, G., Hamilton, J. A., Rogerson, S., & Boeuf, P. (2013). Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol.*, 29(1), 26-34.
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol.* 2000, 83(1), 14-25.
- Curtis, M. A., Zenobia, C., & Darveau, R. P. (2011). The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe*, 10(4), 302-306.
- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(7), 481-490.

- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.*, 14(10), 986.
- De Matos, L. L., Trufelli, D. C., De Matos, M. G. L., & da Silva Pinhal, M. A. (2010). Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark. Insights*, 5, BMI. S2185.
- Demirel, K., DİŞÇİ, R., & MERİÇ, H. (1996). PERIODONTAL YIKIM GÖRÜLMİYEN BÖLGELERDE GİNGİVAL İNDEKS VE SONDALAMADA KANAMA DEĞERLENDİRMELERİNİN İLİŞKİSİ THE RELATIONSHIP OF BLEEDING ON PROBING AND GINGIVAL INDEX AT SITES WITHOUT PERIODONTAL BREAKDOWN. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 30(1), 12-16.
- Dennison, D. K., & VAN DYKE, T. E. (1997). The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol.* 2000, 14(1), 54-78.
- Detzen, L., Chen, S. C., Cheng, B., Papapanou, P. N., & Lalla, E. (2017). Increased levels of soluble CD 163 in periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, 44(6), 585-590.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W.-H., . . . Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *J. Bacteriol. Res.* 192(19), 5002-5017.
- Divangahi, M., King, I. L., & Pernet, E. (2015). Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol.*, 36(5), 307-314.
- Divaris, K., Monda, K. L., North, K. E., Olshan, A. F., Reynolds, L. M., Hsueh, W.-C., . . . Weyant, R. J. (2013). Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum. Mol. Genet.* 22(11), 2312-2324.

- Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *The ISME journal*, 8(8), 1659-1672.
- Ebersole, J. L., Dawson III, D., Emecen-Huja, P., Nagarajan, R., Howard, K., Grady, M. E., . . . Lethbridge, K. (2017). The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontol.* 2000, 75(1), 52-115.
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35.
- Ernst, J. D. (2000). Bacterial inhibition of phagocytosis: Microreview. *Cell. Microbiol.*, 2(5), 379-386.
- Eskan, M. A., Jotwani, R., Abe, T., Chmelar, J., Lim, J.-H., Liang, S., . . . Rauner, M. (2012). The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat. Immunol.*, 13(5), 465.
- Fenyo, I. M., & Gafencu, A. V. (2013). The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology*, 218(11), 1376-1384.
- Ferrante, A. W. (2013). Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *J. Clin. Investig.*, 123(12), 4992-4993.
- Fiorellini, J., Ishikawa, S., & Kim, D. (2006). Gingival inflammation. *J. Clin. Periodontol.*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 355-361.
- Fretwurst, T., Garaicoa-Pazmino, C., Nelson, K., Giannobile, W. V., Squarize, C. H., Larsson, L., & Castilho, R. M. (2020). Characterization of macrophages infiltrating peri-implantitis lesions. *Clin. Oral Implants Res.*, 31(3), 274-281.

- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 281-286.
- Gainet, J., Chollet-Martin, S., Brion, M., Hakim, J., Gougerot-Pocidallo, M.-A., & Elbim, C. (1998). Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab. Invest. a journal of technical methods and pathology*, 78(6), 755.
- Garaicoa-Pazmino, C., Fretwurst, T., Squarize, C. H., Berglundh, T., Giannobile, W. V., Larsson, L., & Castilho, R. M. (2019). Characterization of macrophage polarization in periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 46(8), 830-839.
- Gheren, L., Cortelli, J. R., Rodrigues, E., Holzhausen, M., & Saad, W. A. (2008). Periodontal therapy reduces arginase activity in saliva of patients with chronic periodontitis. *Clin. oral invest.*, 12(1), 67-72.
- Glynn, M. W., & McAllister, A. K. (2006). Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. *Nat. Protoc.*, 1(3), 1287.
- Gonzalez, O. A., Novak, M. J., Kirakodu, S., Stromberg, A., Nagarajan, R., Huang, C. B., . . . Ebersole, J. L. (2015). Differential gene expression profiles reflecting macrophage polarization in aging and periodontitis gingival tissues. *Immunological investigations*, 44(7), 643-664.
- Górska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M., & Madaliński, K. (2003). Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 30(12), 1046-1052.

- Groves, E., Dart, A., Covarelli, V., & Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci*65(13), 1957-1976.
- Guiney, D. G., Hasegawa, P., & Cole, S. P. (2003). *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect. Immun.*, 71(7), 4163-4166.
- Güllü, C., Ozmeric, N., Tokman, B., Elgün, S., & Balos, K. (2005). Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Res* 40(2), 168-175.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, 8(4), 311-330.
- Haffajee, A. D., Yaskell, T., Torresyap, G., Teles, R., & Socransky, S. S. (2009). Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 36(8), 642-649.
- Hajishengallis, G. (2014). Aging and its impact on innate immunity and inflammation: implications for periodontitis. *Journal of oral biosciences*, 56(1), 30-37.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10(10), 717-725.
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.*, 27(6), 409-419.

- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2014). Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *European journal of immunology*, 44(2), 328-338.
- Harks, I., Jockel-Schneider, Y., Schlagenhaut, U., May, T. W., Gravemeier, M., Prior, K., . . . Ehmke, B. (2016). Impact of the daily use of a microcrystal hydroxyapatite dentifrice on de novo plaque formation and clinical/microbiological parameters of periodontal health. A randomized trial. *PloS one*, 11(7), e0160142.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., . . . Lucas, D. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792-804.
- Haskó, G., Pacher, P., Deitch, E. A., & Vizi, E. S. (2007). Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol. Ther.* 113(2), 264-275.
- He, D., Kou, X., Luo, Q., Yang, R., Liu, D., Wang, X., . . . Gan, Y. (2015). Enhanced M1/M2 macrophage ratio promotes orthodontic root resorption. *J. Dent. Res*, 94(1), 129-139.
- Herrera, D., Retamal-Valdes, B., Alonso, B., & Feres, M. (2018). Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol*, 45, S78-S94.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., . . . Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.*, 180(4), 1340-1355.

- Hou, Y., Yu, H., Liu, X., Li, G., Pan, J., Zheng, C., & Yu, W. (2017). Gingipain of *Porphyromonas gingivalis* manipulates M1 macrophage polarization through C5a pathway. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 53(7), 593-603.
- Jaradat, S., Ababneh, K., Jaradat, S., Abbadi, M., Taha, A., Karasneh, J., & Haddad, H. (2012). Association of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis. *Oral Diseases*, 18(3), 271-279.
- Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M. J., Post, M. J., De Winther, M. P., & Donners, M. M. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*, 17(1), 109-118.
- Jotwani, R., Palucka, A. K., Al-Quotub, M., Nouri-Shirazi, M., Kim, J., Bell, D., . . . Cutler, C. W. (2001). Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J. Immunol. Res.*, 167(8), 4693-4700.
- Kantarci, A., & Van Dyke, T. E. (2005). Resolution of inflammation in periodontitis. *J. Periodontol.* 76, 2168-2174.
- Kim, Y., Flynn, T. R., Donoff, R. B., Wong, D. T., & Todd, R. (2002). The gene: the polymerase chain reaction and its clinical application. *J Oral Maxillofac Surg.*, 60(7), 808-815.
- Kinane, D., Zhang, P., Benakanakere, M., Singleton, J., Biesbrock, A., Nonnenmacher, C., & He, T. (2015). Experimental gingivitis, bacteremia and systemic biomarkers: a randomized clinical trial. *J. Periodontal Res.* 50(6), 864-869.
- Kopitar, A. N., Ihan Hren, N., & Ihan, A. (2006). Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. *Oral Microbiol Immunol* 21(1), 1-5.

- Kornman, K. S., Page, R. C., & Tonetti, M. S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol.* 2000, 14(1), 33-53.
- Könönen, E., & Müller, H. P. (2014). Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol.* 2000, 65(1), 46-78.
- Kumar, P. S., Leys, E. J., Bryk, J. M., Martinez, F. J., Moeschberger, M. L., & Griffen, A. L. (2006). Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 44(10), 3665-3673.
- Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S., . . . van Rooijen, N. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol. Res.*, 183(10), 6469-6477.
- Laine, M. L., Crielaard, W., & Loos, B. G. (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol.* 2000, 58(1), 37-68.
- Lam, R. S., O'Brien-Simpson, N. M., Holden, J. A., Lenzo, J. C., Fong, S. B., & Reynolds, E. C. (2016). Unprimed, M1 and M2 macrophages differentially interact with *Porphyromonas gingivalis*. *PloS one*, 11(7), e0158629.
- Lam, R. S., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., Holden, J. A., Brammar, G. C., Walsh, K. A., . . . Reynolds, E. C. (2014). Macrophage depletion abates *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone resorption in mice. *J. Immunol. Res.*, 193(5), 2349-2362.
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 16(12), 745-759.

- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *J Periodontal Implant Sci*, 2 Volume Set: John Wiley & Sons.
- Lauvau, G., & Glaichenhaus, N. (2004). Mini-review: Presentation of pathogen-derived antigens in vivo. *Eur J Immunol*, 34(4), 913-920.
- Lindroth, A. M., & Park, Y. J. (2013). Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis. *J Periodontal Implant Sci* 43(3), 111-120.
- Liu, J., Chen, B., Bao, J., Zhang, Y., Lei, L., & Yan, F. (2019). Macrophage polarization in periodontal ligament stem cells enhanced periodontal regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-11.
- Locati, M., Mantovani, A., & Sica, A. (2013). Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity *Advances in immunology* (Vol. 120, pp. 163-184): Elsevier.
- Loomer, P. M. (2004). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000, 34(1), 49-56.
- Löe, H., & Silness, J. (1963). Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta odontologica scandinavica*, 21(6), 533-551.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol*, 229(2), 176-185.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677-686.
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(2), 279-294.

- Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol*, 27, 451-483.
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13(1), 453-461.
- Melgarejo, E., Medina, M. Á., Sánchez-Jiménez, F., & Urdiales, J. L. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41(5), 998-1001.
- Miao, Y., He, L., Qi, X., & Lin, X. (2020). Injecting Immunosuppressive M2 Macrophages Alleviates the Symptoms of Periodontitis in Mice. *Frontiers in molecular biosciences*, 7.
- Miyajima, S.-i., Naruse, K., Kobayashi, Y., Nakamura, N., Nishikawa, T., Adachi, K., . . . Mizutani, M. (2014). Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation. *Scientific reports*, 4(1), 1-9.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., . . . Lawrence, T. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.*, 89(4), 557-563.
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol.* 2000, 40(1), 11-28.
- Navarrete, M., García, J., Dutzan, N., Henríquez, L., Puente, J., Carvajal, P., . . . Gamonal, J. (2014). Interferon- γ , interleukins-6 and -4, and factor XIII-A as indirect markers

- of the classical and alternative macrophage activation pathways in chronic periodontitis. *J. periodontol.*, 85(5), 751-760.
- Needleman, I., Garcia, R., Gkranias, N., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Iorio, A. D., . . . Petrie, A. (2018). Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J. Clin.Periodontol.*, 45, S112-S129.
- Nestle, F. O., Turka, L. A., & Nickoloff, B. J. (1994). Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *The J. Clin. invest.*, 94(1), 202-209.
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., & Carranza, F. (2006). *J. Clin.Periodontol.*. 10 [sup] th ed. St. Louis, Missouri: WB Saunders.
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2011). *Carranza's clinical periodontology*: Elsevier health sciences.
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41(5), 694-707.
- Nowicki, E. M., Shroff, R., Singleton, J. A., Renaud, D. E., Wallace, D., Drury, J., . . . Lamont, R. J. (2018). Microbiota and metatranscriptome changes accompanying the onset of gingivitis. *MBio*, 9(2).
- Özçaka, Ö., & Bıçakcı, N. Periodontal Hastalıklarla İlişkili Genler ve Gen Polimorfizimleri. *Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 31(2), 83-93.
- Page, R. (2000). KS Kornman The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.*, 14, 9-11.
- Page, R. C. (1998). The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann. Periodontol.*, 3(1), 108-120.

- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34(3), 235-249.
- Panee, J. (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*, 60(1), 1-12.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., . . . Graziani, F. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.*, 89, S173-S182.
- Pédron, T., & Sansonetti, P. (2008). Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois. *Cell host & microbe*, 3(6), 344-347.
- Pinhal-Enfield, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S. N., Salzman, A. L., Boons, G.-J., & Leibovich, S. J. (2003). An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A2A receptors. *Am J Pathol*, 163(2), 711-721.
- Porta, C., Riboldi, E., Ippolito, A., & Sica, A. (2015). Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Pouliot, M., Clish, C. B., Petasis, N. A., Van Dyke, T. E., & Serhan, C. N. (2000). Lipoxin A4 analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*, 39(16), 4761-4768.
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiologica*, 198(1), 15-35.

- Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.
- Reynolds, J. J., & Meikle, M. C. (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol.* 2000, 14(1), 144-157.
- Robinson, J. M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.*, 131(4), 465-469.
- Romanelli, R., Mancini, S., Laschinger, C., Overall, C. M., Sodek, J., & McCulloch, C. A. (1999). Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and immunity*, 67(5), 2319-2326.
- Ruffell, B., Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in immunology*, 33(3), 119-126.
- Salvi, G. E., & Lang, N. P. (2005). Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J. Clinic. Periodontol.*, 32, 108-129.
- Santos, C. F. d., Sakai, V. T., Machado, M. A. d. A. M., Schippers, D. N., & Greene, A. S. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J. Appl. Oral Sci.* 12(1), 1-11.
- Schultze, J. L., Freeman, T., Hume, D. A., & Latz, E. (2015). A transcriptional perspective on human macrophage biology. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Schultze, J. L., & Schmidt, S. V. (2015). Molecular features of macrophage activation. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Schumann, J. (2016). It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur J Pharmacol* 785, 18-23.

- Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, D. D., & Boyan, B. D. (1997). Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol.* 2000, 14(1), 158-172.
- Shaddox, L. M., Andia, D. C., Casati, M. Z., Nociti Jr, F. H., Sallum, E. A., Gollwitzer, J., & Walker, C. B. (2007). Microbiologic changes following administration of locally delivered doxycycline in smokers: A 15-month follow-up. *J. Periodontol.*, 78(11), 2143-2149.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., . . . Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233(9), 6425-6440.
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(11), 762-774.
- Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., & Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life* 72(21), 4111-4126.
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Investig.*, 122(3), 787-795.
- Silness, J., & Løe, H. (1964). Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* 22(1), 121-135.
- Silness, J., & Løe, H. (1966). Periodontal disease in pregnancy: Iii. Response to local treatment. *Acta Odontol. Scand.* 24(6), 747-759.
- Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol.* 2000, 63(1), 80-101.
- Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., & Kent Jr, R. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25(2), 134-144.

- Stabholz, A., Soskolne, W. A., & Shapira, L. (2010). Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol.* 2000, 53(1), 138-153.
- Stefater III, J. A., Ren, S., Lang, R. A., & Duffield, J. S. (2011). Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in molecular medicine*, 17(12), 743-752.
- Tatakis, D. N., & Kumar, P. S. (2005). Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dental Clinics*, 49(3), 491-516.
- Toiviainen, A., Jalasvuori, H., Lahti, E., Gursoy, U., Salminen, S., Fontana, M., . . . Paster, B. (2015). Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinic. oral Investig.*, 19(1), 77-83.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 89, S159-S172.
- Trombelli, L., Scapoli, C., Tatakis, D. N., & Minenna, L. (2006). Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: response in aggressive periodontitis subjects. *J. Clinic. Periodontol.*, 33(2), 79-85.
- Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., & Reynolds, E. C. (2020). The nexus between periodontal inflammation and dysbiosis. *Frontiers in immunology*, 11.
- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol*33, 643-675.

- Veloso, P., Fernández, A., Terraza-Aguirre, C., Álvarez, C., Vernal, R., Escobar, A., & Hernández, M. (2020). Macrophages skew towards M1 profile through reduced CD163 expression in symptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Investig*
- Viniegra, A., Goldberg, H., Çil, Ç., Fine, N., Sheikh, Z., Galli, M., . . . Glogauer, M. (2018). Resolving macrophages counter osteolysis by anabolic actions on bone cells. *J. Dent. Res.* 97(10), 1160-1169.
- Waldrop, T. C., Anderson, D. C., Hallmon, W. W., Schmalstieg, F. C., & Jacobs, R. L. (1987). Periodontal Manifestations of the Heritable Mac-1, LFA-1, Deficiency Syndrome: Clinical, Histopathologic and Molecular Characteristics. *J. Periodontol.*, 58(6), 400-416.
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in immunology*, 5, 614.
- Wang, X., Li, Y., Feng, Y., Cheng, H., & Li, D. (2019). Macrophage polarization in aseptic bone resorption around dental implants induced by Ti particles in a murine model. *J. Periodontal Res.*, 54(4), 329-338.
- Williams, H., Cassorla, G., Pertsoulis, N., Patel, V., Vicaretti, M., Marmash, N., . . . Medbury, H. J. (2016). Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *International angiology: a journal of the International Union of Angiology*, 36(2), 145-155.
- Wolf, M., Lossdörfer, S., Craveiro, R., & Jäger, A. (2014). High-mobility group box protein-1 released by human-periodontal ligament cells modulates macrophage migration and activity in vitro. *Innate Immunity*, 20(7), 688-696.

- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445-455.
- Yamamichi, K., Fukuda, T., Sanui, T., Toyoda, K., Tanaka, U., Nakao, Y., . . . Uchiumi, T. (2017). Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway. *Arch. Oral Biol.* 83, 241-251.
- Yang, J., Zhu, Y., Duan, D., Wang, P., Xin, Y., Bai, L., . . . Xu, Y. (2018). Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 96, 234-242.
- Yu, T., Zhao, L., Huang, X., Ma, C., Wang, Y., Zhang, J., & Xuan, D. (2016). Enhanced activity of the macrophage M1/M2 phenotypes and phenotypic switch to M1 in periodontal infection. *J. Periodontol.*, 87(9), 1092-1102.
- Zambon, J. J., & Haraszthy, V. I. (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol.* 2000, 7(1), 69-82.
- Zhou, L. N., Bi, C. S., Gao, L. N., An, Y., Chen, F., & Chen, F. M. (2019). Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease. *Oral diseases*, 25(1), 265-273.
- Zhou, Q., Leeman, S. E., & Amar, S. (2011). Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci* 108(7), 2867-2872.
- Zhuang, Z., Yoshizawa-Smith, S., Glowacki, A., Maltos, K., Pacheco, C., Shehabeldin, M., . . . Verdelis, K. (2019). Induction of M2 macrophages prevents bone loss in murine periodontitis models. *J. Dent. Res.*, 98(2), 200-208.

Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., & Cohen, P. L. (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J. Immunol. Res.*, 189(7), 3508-3520.



EKLER

ETİK KURUL ONAYI (EK-1)



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83116987 - 254
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 19.02.2019
Toplantı No : 2019/02
Proje No : 19-KAEK-029

20.03.2019

Sayın, Doç.Dr. Hatice BALCI YÜCE

Etik Kurulumuzun 19.02.2019 tarihli toplantısında görüşülen 19-KAEK-029 kayıt numarası "Agresif ve Kronik Periodontitisin Patogenezinin Makrofaj Fenotipleri (M1-M2) ile İlişkisinin Araştırılması" başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmeliğin 14-4. maddesi ve yönergemizin 18-3. maddesine göre çalışmanız tamamlandıktan sonra sonuç raporunun tarafımıza en geç 90 gün içerisinde bildirilmesi gerekmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç. Dr. Faruk KUTLUTÜRK