T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA HİPOKSİ, APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİNİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

TÜLİN ÇAKIR

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ALİ ÇEKİCİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

İTHAF

En değerlilerime. Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli hocam ve danışmanım, sayın Doç. Dr. Ali Çekici'ye,

Doktora çalışmamın laboratuvar aşamalarında büyük katkı sağlayan, engin bilgi ve hayat tecrübesi birikiminden faydalanmama izin veren sevgili hocam sayın Prof. Dr. Meral Yüksel'e,

Doktora eğitimim boyunca yanımda olduğunu her zaman hissettiren, mesleki ve hayati öğütleriyle bana yol gösteren değerli hocam, sayın Prof. Dr. Serdar Çintan'a ve gösterdikleri destek ve yakınlık ile mesleki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. A. Gülden Işık ve Prof. Dr. Funda Yalçın'a,

Mesleki tecrübelerinden yararlanmış olduğum Prof. Dr. Erhan Fıratlı ve Prof. Dr. Korkud Demirel'e,

Uzmanlık yıllarını keyifli hale getiren bu yola beraber başladığım değerli arkadaşlarım Şebnem Bilir, Özgür Özgünler, Revan Birke Koca, Buse Başak Yılmaz'a.

Doktora eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, her zaman yanımda olan meslektaşlarım, Fatih Cömert, Onur Utku Yüksel, Onur Öz, Meltem Bayrak, Sinan Kargı, Canan Aslan, İlayda İlday, Cem Akmanlar ve diğer arkadaşlarıma, uzmanlarımıza ve tüm anabilim dalı çalışanlarına,

Sonsuz destek ve sevgilerini hep kalbimde hissettiğim sevgili arkadaşlarım Ceren Altan, Ömer Faruk Erol ve canım ailem Radife Çakır, Ümit Çakır, Selin Rüya Çakır ve Akın Çakır'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2019-34781

İçindekiler

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
RESİMLER LİSTESİ ..... Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Dental Biyofilm- Plak Biyofilmi 5
2.1.1. İmmunopatogenez 5
2.2. Reaktif Oksijen Metabolitleri 6
2.2.1. ROM'un Periodontal Dokulardaki Fizyolojik Rolü 6
2.2.2. Terminoloji 7
2.2.3. Reaktif Oksijen Metabolitleri 9
2.2.4. ROM ve Oral Hastalıklar 18
2.2.5. Doku yıkım Mekanizması 19
2.2.6. Periodontal hastalık patogenezinde ROM'un rolü 22
2.3. Apoptoz 28
2.3.1. Apoptoz sinyal yollarının moleküler mekanizması 30
2.3.2. Apoptoz düzenlenme mekanizması 32
2.4. Hipoksi 35
2.5. Periodontal Hastalık Sınıflaması 37
Periodontal Sağlık 37
Gingivitis 38
2.5.1. Periodontitis 39

2.6. Tükürük....45
GEREÇ VE YÖNTEM....48
2.7. Çalışma planı....48
2.7.1. Çalışma gruplarının tanımlanması....48
2.7.2. Tükürük Örneklerinin toplanması....50
2.7.3. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin toplanması....50
2.7.4. Periodontal Ölçümler....50
2.8. Biyokimyasal Belirteçlerin Değerlendirme Yöntemleri....52
2.8.1. Tükürük Örneklerinin Değerlendirilmesi....52
2.8.2. DOS Örneklerinin Değerlendirilmesi....55
2.8.3. İstatistiksel değerlendirme yöntemleri....57
3. BULGULAR....59
3.1. Demografik Verilere Ait Bulgular....59
3.1.1. Yaş Bulguları....59
3.1.2. Cinsiyet Dağılımına ait Bulgular....60
3.2. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi....61
3.2.1. Plak Indeksi (PI) Bulguları....61
3.2.2. Gingival Indeks (GI) Bulguları....62
3.2.3. Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD) Bulguları....63
3.2.4. Sondalamada Kanama (SK) Bulguları....64
3.2.5. Klinik Ataşman Düzeyi (KAD) Bulguları....65
3.2.6. Mobilite Bulguları....66
3.3. Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi....67
3.3.1. Tükürük IL-1βDüzeyi....67
3.3.2. Tükürük TNF-αDüzeyi....68
3.3.3. Apoptoz Belirteci Bulguları....69
3.3.4. Hipoksi Belirteci Bulguları....72
3.3.5. Oksidatif Stres Belirteci Bulguları....73
3.4. Korelasyon Analizi....78
4. TARTIŞMA....85
4.1. Yöntemin Tartışması....85
4.2. Bulguların Tartışması....88
5. SONUÇ....95

KAYNAKLAR 97
HAM VERİLER 121
FORMLAR 122
ETİK KURUL KARARI 123
PATENT HAKKI İZNİ 127
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....128
ÖZGEÇMİŞ 129

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo1. Gerçek radikal ve reaktif oksijen türleri ve sembolleri

Tablo 2. Periodontitis Evrelerinin (I-IV) gösterimi.

Tablo 3. Periodontitis derecelendirmesinin (A-C) gösterimi

Tablo 4. Korelasyon analizi verileri.

Tablo 5. Korelasyon analizi verileri (devam).

ŞEKİLLER LİSTESİ

Hata! Şekil tablosu öğesi bulunamadı.

Şekil1, atomik oksijenin (O), katman-1'de bir s-orbitali ($2e^-$) ve katman-2'de bir s-orbital ($2e^-$) ile üç p-orbitalinin ($4e^-$) olduğunu göstermektedir.

Şekil 2, NADPH-oksidaz (heksoz-monofosfat) şantının şematik gösterimi, oksijenin süperoksite tek elektron indirgemesi için glikoz-6-fosfat (G6P) ve NADPH kullanımını göstermektedir

Şekil 3, Nötrofil-süperoksit ve nötrofil-antioksidan enzim sistemleri arasındaki biyokimyasal etkileşimlerin şematik bir temsili.

Şekil 4, Peroksinitrit anyonunu oluşturmak için süperoksit ve nitrik oksit arasındaki etkileşimler ve bu reaktif türlerin moleküler ve hücresel etkilerinin gösterimi.

Şekil 5, ROM'un proteinler ve amino asitler üzerindeki etkilerinin şematik bir görünümü

Şekil 6. Periodontal Doku hasarında oksidatif stres aracılı olası yol.

Şekil 7. Oksidatif stres, periodontal hastalık ve sistemik hastalıklar arasındaki ilişki.

Şekil 8 ROM'un periodontal patojenlere yanıt olarak kronik iltihap ve doku hasarı oluşturmadaki merkezi rolünü gösteren şematik çizim.

Şekil 9. Apoptoz mekanizmaları ile ekstrensik ve intrensik yolların şematik gösterimi.

Şekil 10. Bax ve Bcl-2'nin intrensik yoldaki etki mekanizmaları.

Şekil 11. OSI hesaplama formülü.

Şekil 12. OSI referans değerleri.

Şekil 13. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait yaşbulguları(median ± standart sapma).

Şekil 14. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait cinsiyetbulguları(kişi sayısı).

Şekil 15. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait PIbulguları (median ± standart sapma).

Şekil 16. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait GIbulguları (median ± standart sapma).

Şekil 17. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait SCDbulguları(median ± standart sapma, mm).

Şekil 18. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait SKbulguları(median ± standart sapma, %).

Şekil 19. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait KADbulguları(median ± standart sapma, mm).

Şekil 20. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait mobilitebulguları(median ± standart sapma).

Şekil 21. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük IL-1β düzeyleri(median ± standart sapma, pg/ml).

Şekil 22. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TNF-α düzeyleri(median ± standart sapma, pg/ml).

Şekil 23. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz-8 düzeyleri(median ± standart sapma, pg/ml).

Şekil 24. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz 9 (median ± standart sapma, ng/ml).

Şekil 25. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz 3 düzeyleri(median ± standart sapma, ng/ml).

Şekil 26. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük HIF-1αdüzeyleri(median ± standart sapma, pg/ml).

Şekil 27. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TAS düzeyleri(median ± standart sapma, mmol/L).

Şekil 28. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TOS düzeyleri(median ± standart sapma, mikromol/L).

Şekil 29. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük OSI düzeyleri(median ± standart sapma, OSI=TOS/TAS).

Şekil 30. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait DOS Luminol aracılı KL düzeyleri(median ± standart sapma, rLu).

Şekil 31. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait DOS Lusigenin aracılı KL düzeyleri(median ± standart sapma, rLu).

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Luminometre(Berthold Junior LB 9509, Almanya).

Resim 2. Luminol ve Lusigenin içeren tüpler.

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AO- Anti Oksidan

AP- Agresif Periodontitis

AHL- Asil HomoserinLaktonları

CRP- C reaktif Protein

DISC- Ölüme neden olan sinyal kompleksi(deathinducingsignalcomplex)

DOS- Dişeti Oluğu Sıvısı

D-ROM- Diacron-reaktif oksijen metabolitleri

GI- Gingival İndeks

GCF-GingivalCrevicularFluid (İngilizce DOS)

H_2O_2- Hidrojen Peroksit

H_2O- Su

KAD- Klinik Ataşman Düzeyi

KAK- Klinik Ataşman Kaybı

KP- Kronik Periodontitis

MOMP- Mitokondriyal dış zar permeabilizasyonu

MSS- Mine Sement Sınırı

NAC- N-asetilsistein

$NO^{\bullet}$- Nitrik oksit

$O_2^{\bullet -}$- Süperoksit

$^{\bullet}OH$- Hidroksil Radikali

OS- Oksidatif Stres

PI- Periodontal İndeks

PDL- PeriodontalLigaman

RAT- Reaktif Azot Türleri

ROM- Reaktif Oksijen Metabolitleri

ROT- Reaktif Oksijen Türleri

SCD- Sondalanabilir Cep Derinliği

SOD- SüperoksitDismutaz

SK- Sondalamada Kanama

TAK- Total Antioksidan Kapasitesi

TAS- Total Antioksidan Seviyesi

TG- TrigeminalGanglion

TLR- Toll benzeri Reseptör(TollLikeReceptor)

TME- Temporomandibular Eklem (TMJ (İngilizce)- TemporomandibularJoint)

TNF- Tümör Nekroz Faktörü

TOS- Total Oksidan Seviyesi

e^-- elektron

µm- mikrometre

ÖZET

Çakır T. Periodontitisli hastalarda hipoksi, apoptoz ve oksidatif stres ilişkisinin biyokimyasal olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Amaç: Sistemik olarak sağlıklı Evre III ve IV, Derece C Periodontitis hastalarında oksidasyon ve apoptoz mekanizmalarını klinik durumla ilişkili olarak değerlendirmek amaçlanmıştır. Klinik durum, oksidatif stres ve apoptoz belirteçleri arasındaki korelasyon incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışma grubu Evre III ve IV, Grade C periodontitisli sistemik sağlıklı bireylerden, kontrol grubu sistemik ve periodontal olarak sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Tükürükte Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, IL-1β, TNF-α, HIF-1α, TAS, TOS ölçümleri yapılmıştır. DOSta Luminol ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile reaktif oksijen moleküllerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Plak İndeksi(PI), Gingival İndeks(GI), Sondalanabilir Cep Derinliği(SCD), Klinik Ataşman Düzeyi(KAD), Sondalamada Kanama(SK) ve mobilite düzeyi kaydedilmiştir. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Gruplar arasında klinik ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Klinik ve biyokimyasal değişkenler arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Analizi ile değerlendirilmiştir. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: KAD, PI, GI, SK, OSI, TNF-α, Luminol aracılı ve Lusigenin aracılı Kemilüminesans bulguları ile Kaspaz-3 düzeyi arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Yaş, PI, GI, SCD, SK, KAD, Mobilite, TNF-α, Kaspaz-3, TAS, TOS, OSI, Luminol ve Lusigenin aracılı kemilüminesans bulguları periodontitis grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur.

Sonuç: Bulgularımız, hipoksinin ROM artışı ile ilişkili olduğunu ve bunun da apoptoz belirteçlerinin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Evre III ve IV derece C periodontitis hastalarında periodontal durum oksidasyon ve apoptoz ile anlamlı düzeyde ilişkilidir.

Anahtar Kelimeler : Agresif periodontitis, periodontitis, hipoksi, apoptoz, oksidatif stres

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TDK-2019-34781

ABSTRACT

CAKIR T. Hypoxia, apoptosis and oxidative stress in patients with periodontitis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Periodontology. İstanbul. 2021.

Aim: The aim of this study is to evaluate the apoptosis and oxidation mechanisms in systemically healthy Stage III and IV, Grade C periodontitis patients in relation to clinical status. Additionally, correlation between clinical status, oxidative stress and apoptosis markers is examined.

Materials and Methods: Study group consists of 30 systemically healthy individuals diagnosed with Stage III and IV, Grade C periodontitis between ages 18 and 45. Control group consists of 29 systemically and periodontally healthy individuals between ages 18 and 45.

Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, IL-1β, TNF-α, HIF-1α, TAOC, TOC measurements were made in saliva. Identification of reactive oxygen molecules was carried out by Luminol and Lucigenin-mediated Chemiluminescence in gingival crevicular fluid(GCF) samples. Plaque Index(PI), Gingival Index(GI), Probing Pocket Depth (PPD), Clinical Attachment Level (CAL) , Bleeding on Probing (BOP) and tooth mobility were recorded. Kolmogorov-Smirnov test was applied to examine the distribution of the data. Mann-Whitney U test was used to compare clinical parameters and biochemical findings between study and control groups. Pearson Correlation Analysis was performed to examine the correlation between clinical and biochemical variables. All statistical analyzes in the study were performed using SPSS, v.22.0 statistical software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: CAL, PI, GI, PPD, OSI, TNF-α, Luminol-mediated and Lucigenin-mediated Chemiluminescence findings and Caspase-3 level were found to be strongly correlated. Age, PI, GI, PPD, BOP, CAL, Mobility, TNF-α, Caspase-3, TAOC, TOC, OSI, Luminol-mediated and Lucigenin-mediated Chemiluminescence findings were found statistically significantly different in the periodontitis group compared to the control.

Conclusion: Our findings show that hypoxia is associated with the increase of ROM, which in turn result in the increase of apoptosis markers. Periodontal status was significantly correlated with oxidation and apoptosis in stage III and IV grade C periodontitis patients.

KeyWords: Aggressive periodontitis, periodontitis, hipoxia, apoptosis, oxidativestress

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.TDK-2019-34781

ZUSAMMENFASSUNG / RESUME

CAKIR T. Hipoxie, Apoptose und oxidativer Stress bei Patienten mit Parodontitis. Universität Istanbul, Institut für Gesundheitswissenschaften, Abteilung für Parodontologie. Istanbul. 2021.

Ziel: Das Ziel dieser Studie ist es, die Apoptose- und Oxidationsmechanismen bei systemisch gesunden Patienten mit Parodontitis im Stadium III und IV, Grad C in Bezug auf den klinischen Status zu bewerten. Zusätzlich wird die Korrelation zwischen klinischem Status, oxidativem Stress und Apoptosemarkern untersucht.

Material und Methoden: Die Studiengruppe besteht aus 30 systemisch gesunden Personen mit diagnostizierter Parodontitis im Stadium III und IV Grad C im Alter zwischen 18 und 45 Jahren. Die Kontrollgruppe besteht aus 29 systemisch und parodontal gesunden Personen zwischen 18 und 45 Jahren.

Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, IL-1β, TNF-α, HIF-1α, TAOC, TOC-Messungen wurden im Speichel durchgeführt. Die Identifizierung reaktiver Sauerstoffmoleküle wurde durch Luminol- und Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz in Proben von Zahnfleischtaschenflüssigkeit (GCF) durchgeführt. Plaque-Index (PI), Gingival-Index (GI), Sondierungstaschentiefe (PPD), Clinical Attachment Level (CAL), Blutung bei Sondierung (BOP) und Zahnbeweglichkeit wurden aufgezeichnet. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde angewendet, um die Verteilung der Daten zu untersuchen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um klinische Parameter und biochemische Befunde zwischen Studien- und Kontrollgruppen zu vergleichen. Die Korrelationsanalyse nach Pearson wurde durchgeführt, um die Korrelation zwischen klinischen und biochemischen Variablen zu untersuchen. Alle statistischen Analysen in der Studie wurden mit der Statistiksoftware SPSS v.22.0 durchgeführt. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse: CAL, PI, GI, PPD, OSI, TNF-α, Luminol-vermittelte und Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz-Befunde und Caspase-3-Spiegel korrelierten stark. Alter, PI, GI, PPD, BOP, CAL, Mobilität, TNF-α, Caspase-3, TAOC, TOC, OSI, Luminol-vermittelte und Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz-Ergebnisse wurden in der Parodontitis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschiedlich gefunden .

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass Hypoxie mit einer Erhöhung des ROM verbunden ist, was wiederum zu einer Erhöhung der Apoptosemarker führt. Der parodontale Status korrelierte signifikant mit Oxidation und Apoptose bei Patienten mit Parodontitis im Stadium III und IV Grad C.

Schlüsselwörter: Aggressive Parodontitis, Parodontitis, Hipoxie, Apoptose, oxidativer Stress

Die vorliegende Arbeit wurde vom Forschungs fonds der Universität Istanbul unter stützt. Projekt Nr. TDK-2019-34781

CAKIR T. Hipoxie, apoptose et stress oxydatif chez les patients atteints de parodontite. Université d'Istanbul, Institut des sciences de la santé, Département de Parodontologie. Istanbul. 2021.

Objectif : L'objectif de cette étude est d'évaluer les mécanismes d'apoptose et d'oxydation chez des patients atteints de parodontite de stade III et IV, de grade C en bonne santé systémique par rapport à l'état clinique. De plus, la corrélation entre l'état clinique, le stress oxydatif et les marqueurs de l'apoptose est examinée.

Matériels et méthodes : Le groupe d'étude se compose de 30 individus en bonne santé systémique diagnostiqués avec une parodontite de stade III et IV, de grade C entre 18 et 45 ans. Le groupe de controle se compose de 29 individus en bonne santé systémique et parodontale entre 18 et 45 ans.

Des mesures de caspase-3, caspase-8, caspase-9, IL-1β, TNF-α, HIF-1α, TAOC, TOC ont été effectuées dans la salive. L'identification des molécules réactives de l'oxygène a été réalisée par chimiluminescence médiée par le luminol et la lucigénine dans des échantillons de fluide gingival (GCF). L'indice de plaque (PI), l'indice gingival (GI), la profondeur de la poche au sondage (PPD), le niveau d'attachement clinique (CAL), le saignement au sondage (BOP) et la mobilité dentaire ont été enregistrés. Le test de Kolmogorov-Smirnov a été appliqué pour examiner la distribution des données. Le test Mann-Whitney U a été utilisé pour comparer les paramètres cliniques et les résultats biochimiques entre les groupes d'étude et de contrôle. Une analyse de corrélation de Pearson a été réalisée pour examiner la corrélation entre les variables cliniques et biochimiques. Toutes les analyses statistiques de l'étude ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique SPSS, v.22.0. $P < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Résultats : Les résultats de la chimioluminescence médiée par le luminol et la lucigénine et le niveau de caspase-3 se sont avérés être fortement corrélés. Âge, IP, GI, PPD, BOP, CAL, Mobilité, TNF-α, Caspase-3, TAOC, TOC, OSI, Les résultats de la chimiluminescence à médiation par le luminol et la lucigénine ont été trouvés statistiquement significativement différents dans le groupe parodontite par rapport au groupe de contrôle.

Conclusion : Nos résultats montrent que l'hypoxie est associée à l'augmentation de la ROM, qui à son tour entraîne une augmentation des marqueurs de l'apoptose. L'état parodontal était significativement corrélé à l'oxydation et à l'apoptose chez les patients atteints de parodontite de stade III et IV de grade C.

Mots clés: parodontite agressive, parodontite, hipoxie, apoptose, stress oxydatif

Le présent travail a étés outenu par le Fonds de recherche de l'Université d'Istanbul. Numero de Projet: TDK-2019-34781

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontitis, periodontal patojenler ile konak immün yanıt etkileşimi yoluyla dişi destekleyen dokuların bütünlüğünü bozan iltihapsal bir hastalıktır[1].Bu iltihapsal süreç dental plak ile başlayıp kök yüzeyi ve çevresindeki alveolar kemikte periodontal ataşman kaybına ve sonucunda diş kaybına neden olmaktadır. Periodontal dokularda ve etrafındaki dokularda kolonize olmuş bakterilere karşı gelişen iltihapsal olaylar ve immün yanıt vücudun sistemik dolaşımını ve periferal sistemlerini kapsamaktadır[2]. Bu hücresel ve humoral faktörler, sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerini içeren çift yönlü karmaşık konak-mikrobiyal etkileşimlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Subgingival plaktaki primer etiyolojik faktör spesifik olarak, baskın gram negatif anaerobik veya fakültatif bakterilerdir[3]. Periodontal doku hasarının çoğu bu mikroorganizmalara ve onların ürünlerine karşı gelişen konak yanıtından kaynaklanmaktadır[4]. Proteolitik enzimler(ör: nötrofil elastaz), inhibitörleri(ör: a1-antitripsin), reaktif oksijen metabolitleri (ROM) ve vital dokuları, hücreleri ve moleküler komponentleri koruyup tamir eden antioksidan savunma sistemi arasında homeostatik dengenin kaybedilmesi ile periodontal doku hasarı meydana gelmektedir. Bu bozulmanın temelinin bir kısmı genetik kaynaklı (%32-82)[5] ve bir kısmı çevresel kaynaklıdır(ör: sigara içmek)[6].

Periodontitis patogenezinin yeni bir modeli, patojenlerin tek başına gerekli olduğunu, ancak başlı başına periodontal lezyonların gelişimi için yetersiz olduğunu göstermiştir. Periodontal doku hasarının büyük çoğunluğu, lökositlerin, kompleman ve ROM katılımı ile konak immün yanıtının etkilenmesinden kaynaklanmaktadır[7].

Periodontal hastalık, diş ve dişeti üzerinde oluşan mikrobiyal bir biyofilm olan dental plaktaki bakteriler tarafından başlatılan dişetinin lokalize iltihabı olan gingivitis ile başlar. Bu tanımda gingivitis terimi, plağa bağlı gingivitisi belirtmektedir. Dental plak birbirine ve / veya yüzeylere veya arayüzlere yapışan matris kaplı bakteri popülasyonları olarak tanımlanabilir[8]. Periodontitis, gingivitis tedavi edilmediğinde yatkın bireylerde, derin periodontal cepler yaratan dişeti, kemik ve ligament kaybı ile ilerlemesiyle ortaya çıkmaktadır. Periodontal hastalık, vücudun genel iltihapsal yükünü artırabildiği gibi, sistemik olarak etkileri görülebilmektedir[9,10].

ROM ve reaktif azot türleri (RAT) içeren serbest radikaller normal hücrelerde düşük fakat ölçülebilir konsantrasyonlarda bulunmaktadır[11]. Seviyeleri, endojen

antioksidan sistemler tarafından üretim hızları ile temizlenme, uzaklaştırılma oranları arasındaki dengeye bağlıdır. ROM / RAT üretimine karşılık, antioksidan yanıtın sistemi dengeleyemediği durumlarda, oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır.

Organizmayı oksidatif saldırıdan korumak için çeşitli mekanizmalar olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizmalar, enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak gruplandırılabilir. Enzimatik savunma esas olarak katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinden oluşmaktadır, enzimatik olmayan savunma ise reaktif türleri temizleyebilen veya etkisiz hale getirebilen bir dizi organik molekülü içermektedir[12].

ROM, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_20_2), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve tekli oksijen ($^1O_2$) gibi kısa ömürlü, son derece reaktif düşük oksijen ürünleridir[13]. ROM ve periodontitis arasındaki yakın ilişki, 1970'lerin başındaki öncü çalışmalardan başlayarak uzun süredir incelenmektedir[14–16].ROM'un periodontitisteki rolü kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir[17,18]. Kısaca, hücresel düzeydeki ROMun, hücresel sinyal iletimi, hücresel farklılaşma ve apoptoz da dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerin fizyolojik süreçleri için gerekli olduğu gösterilmiştir [13,19,20].

Periodontal hastalığın birçok etyolojik etkeni olduğu bilinmektedir, ancak periodontal yıkımın başlama mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Doku yıkımı bakteriler ve yan ürünlerine karşı oluşan kontrolsüz konak yanıtının sonucu olarak ortaya çıkmaktadır[4]. Yıkım mekanizmalarından birinin proteolitik enzim ve inhibitörleri ile ROM ve antioksidan (AO) sistem arasındaki homeostatik dengenin bozulması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir[21,22].

Periodontal hastalık teşhisinde sondalanabilir cep derinliği, klinik ataşman düzeyi, plak indeksi, sondalamada kanama gibi klinik tanı yöntemleri ve kemik kaybı değerlendirmesi için radyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler hastalığın şiddeti hakkında bilgi vermektedir fakat hastalık aktivitesi hakkında kesin bir bilgi sunamamaktadır [23].

Bu tezin temel amacı sistemik olarak sağlıklı Evre III ve Evre IV, Derece C Periodontitis hastalarında oksidasyon ve apoptoz mekanizmaları arasındaki ilişkiyi tükürük ve dişeti oluğu sıvısı (DOS) örneklerinde reaktif oksijen metabolitleri, Il-1β, TNF-α, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, HIF-1α, total antioksidan ve total oksidan düzeylerini klinik durumla karşılaştırmalı olarak inceleyerek değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

Dental biyofilm(plak biyofilmi) oluşumu, mikroorganizmaların diş yüzeyine yapışması ile başlar ve periodontal enfeksiyonların gelişiminin ilk adımıdır[24]. Dental plak eşsiz bir ekosistemdir. Yüzlerce bakteri türü insan ağız boşluğunda yaşar ve bu çoklu bakteri türleri bir dental plak topluluğu oluşturur[25]. Dental biyofilm (plak biyofilmi) üzerinde çok fazla çalışılmıştır. Tek bir insanda yaklaşık 150 tür içerebilmektedir ve insanlarda bugüne kadar 800 farklı tür tanımlanmıştır[26]. Hangi türlerin özellikle virülent olduğu ve periodontal hastalığın başlamasına neden olabileceği tartışması yıllardır süregelmektedir ve hala çözümlenememiştir[27,28]. Varsayılan patojenler, Gram negatif anaerobik bakterileri, spiroketleri ve hatta virüsleri içerir, ancak tek bir patojenin kendi başına periodontal hastalığa neden olmadığı, bunun yerine disbiyozisin (mikrobiyal biyofilm dengesizliği) kendisinin patojenik "ünite" olması muhtemeldir. Oral mikrobiyota, konak ile çoğunlukla simbiyotik bir ilişki içindedir; ancak, bu mikrobiyal topluluktaki büyük değişimler (disbiyozis), dişeti iltihabı, farklı periodontitis formları, çürük ve endodontik enfeksiyonlar gibi çeşitli ağız hastalıklarının gelişmesine yol açabilmektedir[29]. Periodontal hastalıklar, patojenik biyofilm ile ilişkili olarak en sık görüleniltihapsal ağız hastalıkları arasındadır. Ortaya çıkan iltihapsalolaylar ise, periodonsiyumun daha fazla tahrip olmasına ve sonunda diş kaybına neden olmaktadır[30].

Periodontal ceplerdeki bakteriler, mineraller ve vitaminler gibi temel büyüme faktörlerinin yanı sıra karbon ve azotun besin kaynağı olarak dişeti oluğu sıvısını kullanmaktadır. Bu bakteriler daha sonra çoğalıp sinyallerle birbirleri ile iletişim kurabilmektedir[31,32]. Ekosistemi korumak amacıyla, çeşitli anaeroblar, toplanmış bakteri kütleleri oluşturarak birbirlerine bağlanmaktadır[31]. Bakteriyel gen ekspresyonunun hücre yoğunluğundaki değişikliklere cevaben düzenlenmesi, quorum sensing olarak bilinir. Quorum-Sensing bakteriler, popülasyon arttıkça çevrede biriken, otoindüktörler adı verilen hücre dışı sinyal moleküllerini sentezler ve salgılarlar[31]. Gram-pozitif bakteriler genellikle küçük dağılabilir peptidler yoluyla iletişim kurarken, çoğu Gram-negatif bakteri, onları üreten bakteri türlerine bağlı olarak yapı içinde değişen, Asil Homoserin laktonları (AHL'ler) salgılar[33].

Bazı çalışmalarda, periodontal hastalığa bir veya birkaç spesifik patojen sebep olsaydı, tercih edilecek tedavi yöntemi, tüm biyofilmin uzaklaştırılmasından ziyade plak mikrobiyotasının hedeflenmiş bir değişimi olabileceği yönünde görüş bildirilmiştir[28].

2.1. Dental Biyofilm- Plak Biyofilmi

Oral mikrobiyotanın belirgin çeşitliliği, çevresel değişimlerle baş edebilmek için mikrobiyal topluluğa çok yönlülük sağlar[34]. Periodontitis, bu mikrobiyal topluluğun üyelerindeki değişimlerden ziyade topluluk yapısındaki ekolojik değişimlerle ilişkili görünmektedir[29]. Başka bir deyişle, sağlıktan periodontitise geçiş mutlaka sağlıkla ilişkili türlerin değişmesinden değil, daha önce düşük seviyelerde bulunan yeni baskın türlerin / filotiplerin yükselişinden kaynaklanmaktadır.

Periodontal hastalığın agresif formları prospektif kohort çalışmalarda Aggregatibacter actinomycetemcomitans'ın spesifik kolonilerinin kolonizasyonu ile bağdaştırılmıştır[35]. Diğer türler, Porphyromonas gingivalis dahil, şiddetli veya progresif periodontitisle ilişkilendirilmiştir[36], mikrobiyal biyofilmin zamanla değişimi ve periodontitisle ilişkisi ise tam olarak anlaşılamamıştır.

Sistematik bir derlemede Agresif ve Kronik Periodontitisin spesifik periodontal patojenlere göre ayırt edilemeyeceği belirtilerek, sebep olan mikrobiyal biyofilmin her iki hastalıkta da aynı olduğu ileri sürülmüştür[37].

Dental biyofilm, kalsifiye olmayan (yumuşak) ve kalsifiye olan (diştaşı) şeklinde iki formda da bulunabilir. Subgingival plağın kalsifikasyonu periodontal dokulardaki iltihap tarafından indüklenen serumdaki iyonlar nedeniyle olurken, supragingival diştaşı tükürükteki kalsiyum ve fosfat iyonlarının plak içerisine toplanmasıyla oluşur[38].

2.1.1. İmmunopatogenez

Mikrobiyal biyofilmin varlığı periodontal hastalığın patogenezi için yeterli olmayabilir. Mikrobiyal biyofilm ile konak arasındaki denge kaybolduğunda, disbiyoz oluşması ve konağın enfeksiyona karşı aşırı immün yanıtı ile periodontal hastalık periodontal

dokularda yıkımı oluşturur.[39–41] Bu dengeyi konağın faydası yönünde değiştirmek, zorludur ve her zaman mümkün olmamaktadır[42,43]. Bu durum, artmış iltihapsal yanıtın kronik iltihapsal sürece dönüşmesine ve sonucunda periodontal hastalıkta görülen doku yıkımına sebep olur[44]. Epitel hücreleri patojenlere karşı fiziksel bir bariyer olarak fonksiyon görmenin yanısıra doğalve kazanılmış immün yanıtta görev almaktadır[43]. Epitel içerisindeki dendritik Langerhans hücrelerimikrobiyal antijeni ayırt ederek lenfositlere sunmak için lenfoid dokuya taşır. Periodontal dokulara nötrofil, granülosit ve lenfosit infiltrasyonu sonucu: nötrofiller bakterileri nötralize etmeyi deneyerekmikrobiyal biyofilmin büyüklüğü ve kronik direnci ile karşılaşırlar. Bu şiddetli kronikiltihapsal yanıt, osteoklastlar tarafından kemik rezorbsiyonuna ve kollajen fibrillerin matriks metalloproteinazlar tarafından yıkımına ve granülasyon dokunun oluşmasına yol açar[45,46]. Bu patofizyolojik durum, mikrobiyal biyofilm yani asıl etken başarılı bir şekilde tedavi amaçlı olarak ortadan kaldırılana kadar devam eder.

Oral mikroorganizmalar periodontal hastalıkların patogenezinde temel bileşenlerden biri olsalar da bireysel immün yanıtın duyarlılığı hastalık sürecini belirleyen önemli etkendir[47]. Oksidan yükleme ve antioksidan kapasite arasındaki dengesizlik sonucu oluşan oksidatif stres (OS), periodontal hastalıkların ilerlemesinde potansiyel bir faktördür. Artmış OS , kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve aterosklerozis dahil birçok hastalığın patogenezindekarşımıza çıkmaktadır. Oral kavitede yiyecekler, iltihap, sigara dumanı ve dental materyaller gibi birçok oksidatif stres kaynağı bulunmaktadır. Tükürük ve oral hücrelerin tümü, toksik serbest radikallerin hem oluşumunda hem de onlara karşı korunmada rol oynar[48]. Periodontal hastalıklar ile ilişkili doku hasarında reaktif oksijen türlerinin rolüne dair yeni kanıtlar ortaya çıkmıştır.Bu nedenle, periodontal hastalıkların yönetiminin bir parçası olarak antioksidanlarla yapılan tedavi denemeleri mantıklı bulunmaktadır[49].

2.2. Reaktif Oksijen Metabolitleri

2.2.1. ROM'un Periodontal Dokulardaki Fizyolojik Rolü

Periodontitis, polimikrobiyal disbiyoz ve konak yanıtının aktivasyonu ile ilişkili bir hastalıktır[50]. P. gingivalis ve Tannerella forsythia (T. forsythia) gibi patojenler periodontal doku homeostazının bozulmasına neden olabilir ve iltihaba yol açabilmektedir[7,51,52]. Başta Gram negatif anaerobik veya fakültatif bakteriler olmak üzere

periodontal patojenler oksidatif ortamdaki değişikliklere karşı oldukça hassastır[52]. ROM, hücresel oksidatif ortamı yıkabilmekte ve periodontal patojenlerin öldürülmesine katılabilmektedir. Örneğin, in vitro olarak lökositlerin bulunduğu ortama P. gingivalis lipopolisakariti (LPS) veya Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum) eklenmesi sonucunda ROM oluşumunda belirgin bir artış gözlenmiştir [53,54]. Çok yakın bir zamanda H_2O_2'nin, oral polimikrobiyal sinerjinin merkezi bir belirleyicisi olduğu bildirilmiştir[55]. Bununla birlikte, çeşitli kanıtlar Treponema denticola (T. denticola) gibi periodontal patojenlerin ROM indüksiyonunu baskılamak için stratejiler geliştirdiğini ortaya koymuştur[56]. Buna karşılık, bazal seviyelerde, ROM, sinyal iletimi, hücresel homeostaz ve hücre ölümünün düzenlenmesinde ikinci haberci molekülolarak görev yapmaktadır. Bazı bulgular, ROM'un hPDLF'lerin çoğalmasına ve farklılaşmasına katıldığını göstermektedir. Bununla birlikte, birçok çalışma H_2O_2'nin ağırlıklı olarak hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını inhibe edici bir mediyatör olarak hareket ettiğini bildirmiştir[57]. Bu çelişkili sonuçlar H_2O_2'ye verilen hücresel tepkilerin, H_2O_2 konsantrasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterebileceğinden kaynaklı olabilmektedir. Örneğin, Burdon ve ark.[58] 1 μM H_2O_2'ye maruz kalmanın BHK-21 fibroblastların çoğalmasını artırdığını belirtirken, 0.5 ve 1 mM'de H_2O_2'nin apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir[58].

2.2.2. Terminoloji

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, bağımsız bir şekilde varlığını sürdürebilen bir tür olarak tanımlanmıştır[59]**.** Doğaları gereği, elektronları çıkarabilme yeteneğine sahip ve böylece sadece oksijensiz radikalleri değil aynı zamanda nitrojen ve klor türlerini de içeren hücre ve doku işlevi için hayati öneme sahip çeşitli biyomolekülleri okside edebilen yüksek oranda reaktif moleküllerdir.

ROM faaliyetlerini, diğer sınıflardaki ortak işbirlikçi türler hakkında konuşmadan tartışmak mümkün değildir. Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) ve süperoksitin ($O_2^{\bullet-}$) reaksiyonundan türetilen özellikle peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşumunun, iltihapsal hastalıkların patogenezinde öneminin yeterince vurgulanmadığını gösteren yeni veriler mevcuttur[60].

ROM gerçek radikal olmayan, ancak yine de hücre içi ve dışı ortamlarda radikal oluşum yeteneğine sahip diğer reaktif türleri kapsadığı için daha popüler hale gelmiş bir terimdir.

Gerçek Radikaller	Radikal Sembolü	ROM	ROM Sembolü
Süperoksit	**$O_2^{\bullet-}$**	**Hidrojen Peroksit**	**H_2O_2**
Hidroksil	**$^{\bullet}OH$**	**Hipokloröz Asit**	**HOCl**
-+Perhidroksil	**$HO_2^{\bullet-}$**		
Hidroperoksil	**$HOO^{\bullet}$**	**Tekli Oksijen**	**$^1O_2$**
Alkoksil	**$RO^{\bullet}$**	**Ozon**	**O_3**
Ariloksil	**$ArO^{\bullet}$**		
Arilperoksil	**$ArOO^{\bullet}$**		
Peroksil	**$ROO^{\bullet-}$**		
Asiloksil	**$RCOO^{\bullet}$**		
Asilperoksil	**$RCOOO^{\bullet}$**		

Tablo1. Gerçek radikal ve reaktif oksijen türleri ve sembolleri. Battino ve ark.[61] 'ın derlemesinden alınan ve başlıca gerçek oksijen radikallerini ve ROM'u özetleyen tablo. (•eşleşmemiş bir elektronu belirtmektedir ve - veya + moleküler yükünü belirtmektedir.Yanında + veya - veya nötr olabilir.

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda, oksitlenebilir bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır[62]. Normal fizyolojide ROM aktivitesi ile antioksidan savunma kapasitesi arasında dinamik bir denge vardır. Bu denge ya antioksidan savunmada bir azalma, ya da ROM üretimi ve aktivitesinde bir artışla ROM lehine değiştiğinde, OS ile sonuçlanmaktadır. OS , Sies tarafından, pro-oksidan-antioksidan dengesinin oluşum lehine bozularak potansiyel hasara yol açması şeklinde tanımlanmaktadır[63]. Buna göre, hücre başına günde 1 milyar ila 3 milyar reaktif türün üretildiği tahmin edilmektedirve bu antioksidan savunma sistemlerinin sağlığın korunmasındaki önemini açık bir şekilde ortaya koymaktadır[64].

Redoks potansiyeli, bir maddenin, hidrojene kıyasla, elektronlara affinitesinin ölçüsüdür (volt cinsinden). Hidrojenden daha güçlü elektronegatif olan maddeler (yani hidrojeni oksitleyebilen) pozitif redoks potansiyeline sahiptir ve oksidandır.Hidrojenden daha az elektronegatif olan maddeler (yani, indirgeyebilen), negatif redoks potansiyeline sahiptir ve indirgeyici ajanlardır. Oksidasyon ve redüksiyon(indirgenme) reaksiyonları her zaman bir arada olur ve redoks reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır. Dişeti oluğunda / cebinde, düşük bir redoks potansiyelinin olması, subgingival anaerobların büyümesi ve hayatta kalması için esastır, hücreler ve dokularda ise indirgen bir ortam (düşük redoks potansiyeli) olması OS e karşı koruyucudur[65]. Bu nedenle, periodontitis

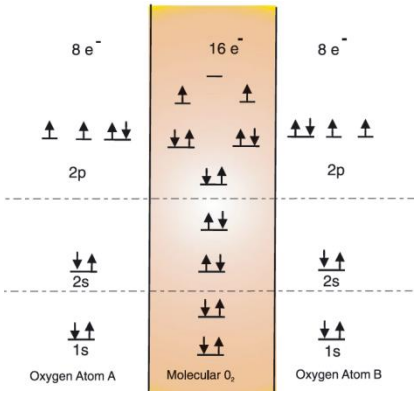
tedavisi açısından redoks biyolojisine dayanan stratejilerin geliştirilmesinde bir tartışma vardır. Konak hücrelerini ve dokuları OS e karşı korumak için düşük redoks statüsünü korumak, anaerobların büyümesini ve hayatta kalmasını destekleyici nitelikte olacaktır. Bununla birlikte, vücudun bölümlere ayrılmış olduğunu hatırlamak redoks biyolojisinin karmaşıklığının anlaşılması açısından önemlidir. Bakteriler, virüslerin aksine hücre içi patojenler değildir bu nedenle, bir hücre içinde düşük redoks durumunun korunmasının, periodontal cep / dişeti oluğu içinde yüksek redoks durumu ile ilgili olmayabileceği düşünülmektedir.

Antioksidan bileşimindeki bölümlendirilmiş farklılıkların bir örneği, Brock ve ark.[22] tarafından gösterilmiştir. DOS un antioksidan bileşiminin, esas olarak plazma ve tükürükten farklılaştığını, azalmış glutatyonun (GSH), dişeti oluğu sıvısında majör bir antioksidan olduğu, buna karşın yüksek protein-antioksidan seviyelere sahip ürik asidin tükürük ve plazmada baskın olduğu gösterilmiştir[22].

2.2.3. Reaktif Oksijen Metabolitleri

2.2.3.1. Atomik ve moleküler oksijen - temel prensipler

Atomlar, elektronlar (e) içeren dış orbitale ve enerjiye sahiptir, ve bu kabuk pozitif yüklü çekirdeğe yönelmelerini önler.



Şekil1. Atomik oksijenin (O), katman-1'de bir s-orbitali ($2e^-$) ve katman-2'de bir s-orbital ($2e^-$) ile üç p-orbitalinin ($4e^-$) olduğunu göstermektedir.

Her bir katman (1, 2, 3, 4, vb. numaralandırılmış) her iki yönde dönebilen dört taneye kadar yörünge düzenine (s, p, d, f şeklinde) sahip olabilir. Her bir yörünge, Pauli Hariç Tutma İlkesi olarak tanımlanmış olan bir çift olarak zıt yönlerde dönen iki elektrona sahiptir. Üç p-orbitalinden biri, bir elektron çiftine ($2e^-$)sahiptir, ancak atomik kinetiğin karmaşık nedenlerinden dolayı kalan iki p-orbitalinin birer elektronları vardır

(toplamda8e^-). Dış 2e^- aynı enerjiye sahiptir ve her biri ayrı bir p orbitalini işgal ettiği için paralel yönde dönerler. Böylece atomik oksijen $(1s)^2$ $(2s)^2$ $(2p)^4$ olarak adlandırılmaktadır. Moleküler di-oksijen (O_2), iki oksijen atomunun birleşiminden oluşmuştur ve iki atom katmanında 16 elektron (atom başına sekiz) olduğundan ancak dış 2e^- u eşleşmemiş olduğundan stabil "bi-radikal" olarak kabul edilmektedir. Katman-1'de iki s-yörüngesi vardır, katman-2'de iki s-yörüngesi vardır ve geri kalan 8e^- içinde zıt dönüşlerle eşleşmiş6e^- ve bireysel dış yörüngelerdeki2e^- p-yörüngelerindedir, atomik oksijen gibi, paralel bir dönüşleri vardır.Sonuç olarak en dış eşleşmemiş elektronlarını eşleştirmek isteyen bir moleküldür, bu nedenle güçlü bir oksitleyici ajandır. Ancak paralel dönüşe sahip olan dış eşleşmemiş 2e^-dan gelen, oksijenin doğasında olan "dönüş kısıtlaması" nedeniyle, elektron çiftlerini kabul edemez, çünkü 2e^-, oksijenin dış 2e^- ile eşleşmesi için paralel dönüşlerle (atomik enerji tasarrufu) izole şekilde mevcut değildir. Atom düzeyindeki bu olayları anlamak oksijen ile ondan elde edilen ROM arasındaki ilişkiyi anlamayı kolaylaştırmaktadır.

Oksijene bir e^-eklenmesi, süperoksit anyonunun oluşumuyla sonuçlanır:

$$\mathbf{O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}}$$

İkinci bir e^- eklenmesi hidrojen peroksit (H_2O_2) ROM'unun oluşumuyla sonuçlanır:

$$\mathbf{O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2}$$

Üçüncü bir e^- eklenmesi hidroksil radikalinin oluşumuyla sonuçlanır ($^{\bullet}$OH):

$$\mathbf{H_2O_2 + e^- \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^-}$$

Dördüncü bir e^- eklenmesi ile su oluşur (H_2O):

$$\mathbf{{}^{\bullet}OH + e^- + H^- \rightarrow H_2O}$$

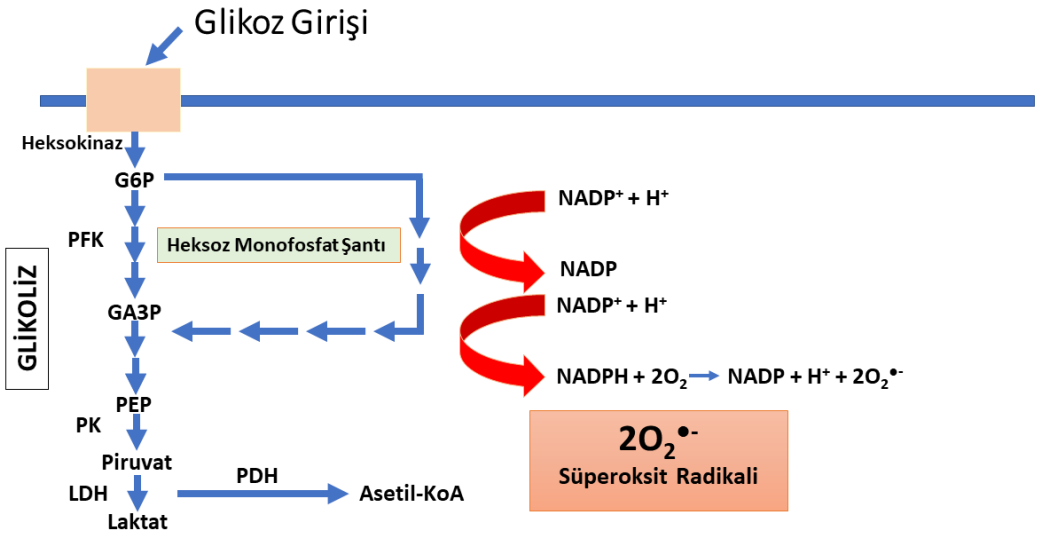
2.2.3.2. ROM ve oksijen radikallerinin kökenleri ve oluşumu

Oksijen radikalinin ve ROM oluşumunun ve uzaklaştırılmasının yolları daha önceki çalışmalarda gözden geçirilmiştir[16,61,66,67]. Eksojen kaynaklar arasında ısı, travma, ultrason, ultraviyole ışık, ozon, sigara, egzoz dumanı, radyasyon, enfeksiyon, aşırı egzersiz ve terapötik ilaçlar bulunmaktadır[66,68,69].

Endojen kaynaklar; mitokondriyal elektron taşıma sistemlerinden elektron kaçağı ile süperoksit oluşması ve konak savunma hücreleri ve bağ doku hücrelerinden kaynak alan fonksiyonel üretim olarak sıralanabilir.

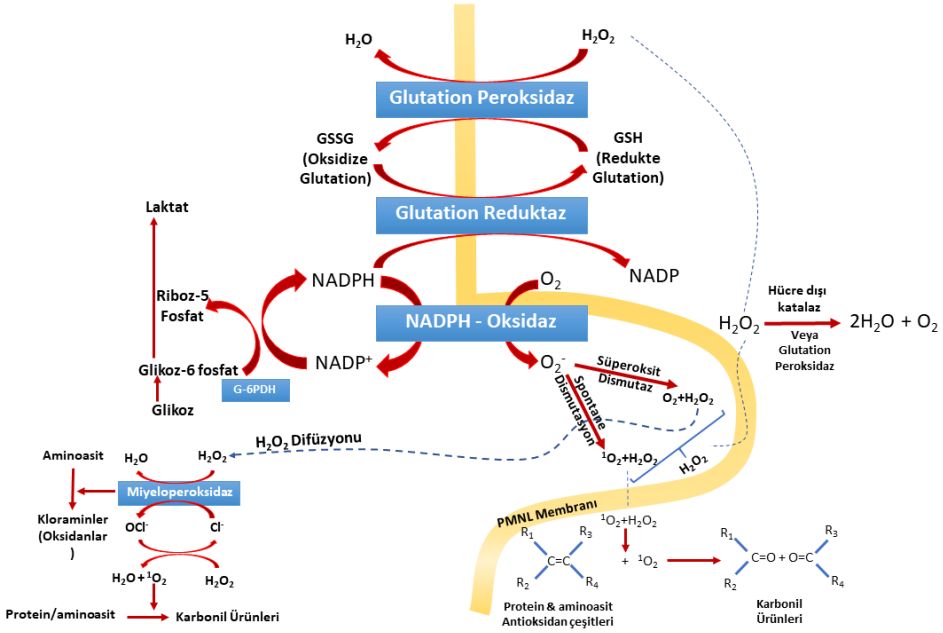
Hücre metabolizması, oksijen tüketimini ve mitokondri içinde piruvat (Şekil 3) oluşturmak için glikoliz yoluyla kullanılmasını içermektedir. Bunu, amino asit döngüsü takip eder ve ATP üretilir. Bununla birlikte, taşıyıcılarından sabit oranda çıkan elektronlar, oksijeni süperoksit anyonuna indirgerler.

Eksik oksijen indirgenmesinin, tüketilen oksijenin% 1-3'ü ve mitokondriyal antioksidan yakalayıcılarınsüperoksit yok etme kabiliyetini aşan bir oranda olduğu tahmin edilmektedir[70]. Manganeze bağlı olan süperoksit dismutaz2, oluşan süperoksit radikallerini uzaklaştırmayı sağlamaktadır.Bununla birlikte, ROM ve reaktif azot türlerinin mitokondriyal DNA hasarı bazı kronik hastalıklarda ve yaşlanmada önemli olduğu düşünülen bir süreçtir[71]. Mitokondri bu nedenle önemli bir in vivo ROM kaynağıdır, ve mitokondriyal DNA'nın üretilen ROM'a yakınlığı nedeniyle, nükleer DNA'dan daha kolay hasara uğradığı görülmektedir[60,72].



Şekil2. NADPH-oksidaz (heksoz-monofosfat) şantının şematik gösterimi, oksijenin süperoksite tek elektron indirgemesi için glikoz-6-fosfat (G6P) ve NADPH kullanımını göstermektedir(Chapple&Matthews)[17].

Fonksiyonel süperoksit üretimi, glikoz-6 fosfatı glikoliz yolundan (Şekil2) kaplayan ve süperoksit radikal anyonunu oluşturmak için moleküler oksijen ve NADPH'yi (Şekil 2 ve 3) kullanan heksoz-monofosfat (veya NADPH-oksidaz) şantının aktivasyonunu içermektedir. Bu işlem, polimorfonükleer lökositler (nötrofiller) içerisinde söz konusu "solunum patlaması" olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli mitojenler, antijenler, sitokinler ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör gibi diğer mediyatörler tarafından uyarılmaktadır.



Şekil 3. Nötrofil-süperoksitve nötrofil-antioksidan enzim sistemleri arasındaki biyokimyasal etkileşimlerin şematik gösterimi(Chapple &Matthews)[17].

Fcc reseptörlerini (FccR), Toll benzeri reseptörleri (örn. TLR-4, TLR-9) [73] aktive edebilen, bakteri DNA'sını, fMLPgibi bakteri kaynaklı küçük peptidleri ve forbol miristat asetat gibi protein kinaz C agonistlerini aktive eden opsonize partiküller önemli aktivatörlerdir. NADPH-oksidaz, sitozolik alt birimler (örneğin, p47phox, p40phox, p67phox) ve lipid membran içine bağlanmış alt birimler (örneğin, gp91phox, p22phox) içeren karmaşık bir yapıya sahiptir.

Hücre yüzeyi reseptörlerini oksidaza bağlayan proksimal yollar, zamansal davranışlarda ve biyokimyasal bileşenlerde farklılık gösterir, ancak akış aşağı yolları, NADPH-oksidazın sitozolik aktivasyon noktalarında birleşiyor gibi görünmektedir[74].

Süperoksit yalnızca fagositozlanmış partikül ile temas halinde olan plazma zarı bölgesinde üretilmektedir ve yakın zamana kadar süperoksit ve hidrojen peroksitin toksisitesi ile mikrobiyal etkenin ortadan kaldırılmasıarasında bir bağlantı gösterilememiştir.

Ahluwalla ve ark. nın son zamanlarda yayınladıkları bir makalede[75], nötrofiller içindeki ROM üretim işleminin lizozomal proteazların aktivasyonu ileopsonlanmış moleküllerin tahrip edebileceğine dair kanıt sağlanmıştır.Hücre yüzeyi reseptörü stimülasyonundan kaynaklanan yüksek sitozolik Ca^{2+} seviyelerinin, fagolizozom (vakuol) membranında Ca^{2+} bağımlı K^+ kanallarını açtığını göstermişlerdir.

Aynı zamanda, NADPH-oksidaz, süperoksit (e) 'yi vakuolar membrandaki konumundan, vaküole (fagolizozom) pompalar ve bu membranı depolarize ederek iyonik bir gradyan üretir, ki bu da K^+ iyonlarının içe doğru akışıyla sonuçlanır. Vakuol içindeki hipertonik K^+dan zengin alkali ortam (artmış pH) içerideki lizozomal proteazları aktive ederek bu proteazların mikrobiyal yıkımı meydana getirmesini sağlamaktadır[76].

Sağlıklı bireylerde, nötrofil primeri, dokularda periferik veya lokal olarak ortaya çıkabilmektedir, bunun ardından nötrofil stimülasyonu oksidatif patlamayı indükler. Başlangıçta süperoksit oluşur ve sonra ya kendiliğinden hidrojen peroksite ayrışır ya da aktif olarak üç süperoksit dismutaz enzim sisteminden biri tarafından hidrojen peroksite dönüştürülür. Süperoksit dismutaz (SOD) insan periodontal ligamentinde tespit edilmiştir ve yüksek düzeyde süperoksit salınımına karşı dişeti fibroblastları içinde önemli bir savunma mekanizması olabileceğine dair kanıt vardır[77].

Hidrojen peroksit oluştuktan sonra, nötrofil miyeloperoksidaz için bir substrat olarak hareket eder ve bu onu başka bir ROM olan hipokloröz aside (HOCl) dönüştürür.

Hipokloröz asidin aktivitesi konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek konsantrasyonlar sitotoksiktir, ancak düşük konsantrasyonlarda bilehipokloröz asit, a1-antitripsini[78] oksitleyebilir ve inaktive edebilir, nötrofil kollajenazı[79] aktive edebilir[80]. Hidrojen peroksit ayrıca Fe2 + veya Cu2 + iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonlarına uğrayarak tüm oksijen radikallerinin en güçlü olanını, hidroksil radikalini(˙OH) oluşturabilir.

$$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH}$$

(basitleştirilmiş Fenton reaksiyonu).

Bu reaksiyon serbest radikal biyokimyasındakien önemli reaksiyonlardan biridir[81].Bölgeye özgü hidroksil radikal oluşumuna yol açmaktadır[82] çünkü yüklenmemiş hidrojen peroksit lipid membran içerisine girebilmektedir. Böylece Fenton reaksiyonları, düşük aktiviteli ve büyük ölçüde zayıf ROM'u güçlü hidroksil radikaline dönüştürebilmektedir. Bu olay hücre içerisinde gerçekleştiği için DNA gibi hayati yapıların zarar göresi kolaylaşmaktadır.

Normalde çözünür ferröz demir (Fe^{2+}), proteinlere sıkıca bağlanmış olup, in vivo olarak mevcut değildir, ancak süperoksitin demir depolama proteinleri içindeki ferric demir (Fe^{3+}) üzerindeki etkisiyle hücreler içinde (örneğin mitokondri veya sitozol) üretilebilmektedir.

$$\mathbf{Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2.}$$

Hidrojen peroksitin dismutasyonu aynı zamanda tekli oksijen ($^1O_2$) olarak adlandırılan ROM'a yol açmaktadır. Tekli oksijen, bir enerji girişi almış moleküler oksijendir ve bu da, dıştaki eşleşmemiş iki elektrondan birinin dönüş yönünü değiştirerek, yüksek enerjili duruma geçişine izin vermektedir. Bu, dış iki eşleşmemiş elektronun eşleşmesinin mümkün olduğu bir durum yaratır, çünkü karşıt dönüşlere sahip iki eşlenmemiş elektronun alınması mümkündür. Tekli oksijen, gerçek bir radikal olmamakla birlikte, çok reaktiftir ve çoklu doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinden lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir.[83] Eozinofiller tekli oksijen kaynaklarından biridir[84], ancak ozonun biyomoleküllerle reaksiyonu da tekli oksijen oluşumuna yol açabilmektedir[85]. Tekli oksijenin çıkarılması, tekli oksijenin enerjisini soğurup ısıyı serbest bırakacak karotenoid pigmentlerle elde edilmektedir[86].

2.2.3.3. Superoksit ve nitrik oksit

Oksijen molekülüne bir elektron ilavesiyle $\mathbf{O_2^{\bullet-}}$ oluşmaktadır[87]. Serbest radikal olsa da, yüksek derecede reaktif değildir. Süperoksit'in üretimi çoğunlukla hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşmektedir[88]. Mitokondriyal elektron transfer sistemi memeli hücresinde ATP'nin ana kaynağıdır ve dolayısıyla hayatın devamı için gereklidir. Enerji dönüşümü sırasında az miktarda elektron kaçakları oksijenin $O_2^{\bullet-}$ serbest radikaline dönüşümüne neden olmaktadır ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynamaktadır[89]. Normalde oksijenin suya dönüştürülmesi gerekirken, toplam elektronların % 1-3'ü$O_2^{\bullet-}$oluşturmak üzere sızdığı submitokondriyel parçacıklar üzerindeki ölçümlerde gösterilmektedir.

NO , nitrik oksit sentazlar adı verilen bir enzim ailesi tarafından Larginine'den sentezlenmektedir. Üç formu vardır:

• Tip 1 nitrik oksit sentaz - beyin enzimi (bNOS);

• Tip 2 nitrik oksit sentaz - makrofajlarda bulunan indüklenebilir enzim (iNOS);

• Tip 3 nitrik oksit sentaz - endotel hücre enzimi (eNOS).

Endotel hücresi nitrik oksit sentaz, kan damarlarında düz kas gevşemesine neden olmaktadır. Nitrik oksit, hücrelere kolayca giren ve porfirin halkasından özü alarak heme bağlı demire bağlanan küçük bir lipofilik moleküldür. Bu ve sonraki sitosolik etkileşimler, hücresel kalsiyumun sekestrasyonuna, hücre içi kalsiyum seviyelerinde bir düşüşe ve ardından düz kas gevşemesine yol açmaktadır[90,91]. Bununla birlikte, makrofaj kaynaklı indüklenebilir nitrik oksit sentaz; süperoksit ile aynı anda salındığında reaktif azot türleri peroksinitit anyonunu oluşturmaktadır[92]. Peroksinitit gerçek bir radikal olmasa da, daha önce nitrik oksit ve süperoksit ile ilişkilendirilen sitotoksik etkilerin çoğundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır[93,94]. Lipid peroksidasyonuna sebep olarak hücre membranının, akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücre membranına zarar verebilmektedir. Bu zararlar:

• Oksidasyon yoluyla glutatyon tüketimi;

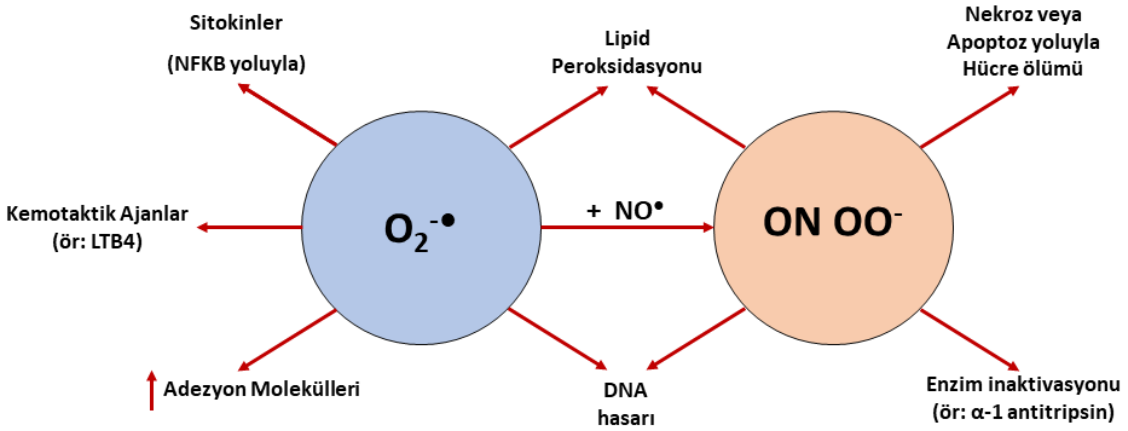
• Süperoksit dismutaz aktivitesini inhibe edebilen nitrotirosin oluşumu;

• Nitrosilasyon, deaminasyon ve oksidasyon yoluyla DNA hasarı;

• Yüksek konsantrasyonlar nedeniyle oluşan hızlı hücre nekrozu[95];

• Düşük konsantrasyonlar nedeniyle oluşan apoptoz[95,96]

olarak sıralanabilir.



Şekil 4. Peroksinitrit anyonunu oluşturmak için süperoksit ve nitrik oksit arasındaki etkileşim ve bu reaktif türlerin moleküler ve hücresel etkilerinin gösterimi(Cuzzocrea ve ark.[60])

Nitrik oksit, süperoksit ve peroksinitit etkileşimlerinden kaynaklanabilecek geniş biyolojik faaliyet yelpazesi, Cuzzocrea ve ark.[60]'dan alınan Şekil 4 de özetlenmiştir. Superoksit, pro-enflamatuvar sitokinlerin nükleer faktör-kB transkripsiyonunu tetikleyerek pro-enflamatuvarözellik göstermektedir. Bu etkinin görülebildiği diğer örnekler arasında endotel hücre hasarı[97], artmış damar geçirgenliği[98], lökotrien B4 oluşumuyoluyla nötrofil kemotaksisi[99], lipid peroksidasyonu[100], DNA iplikçik kopmaları[101] sayılabilir.

2.2.3.4. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit zayıf bir ROM olmakla birlikte doku hasarına neden olma potansiyeli, Fenton reaksiyonuveya ultraviyole ışınları gibi etkenlerin katkısıyla daha güçlü olan hidroksil radikalininoluştuğu durumlarda çok artmaktadır. Konsantrasyonu 50 MM'yi geçmediği sürece, hidrojen peroksitin sitotoksisitesi sınırlıdır[102] ve biyolojik olarak daha çok hücre sinyal molekülü[103]olarak görev almaktadır. Hidrojen peroksit, bazı hücrelerde ve iltihabın olduğu yerlerde nükleer faktör-kB aktivasyonunda ikinci bir haberci olarak

rol oynayarak[104,105] yapışma molekülü özelliğini arttırır[106], hücre çoğalmasına neden olur, apoptozu tetikler[107,108], trombosit agregasyonunu düzenler[109].

Hidrojen peroksitin uzaklaştırılması görevini yüklenen başlıca enzimler;hücre içinde etki eden antioksidan enzim katalaz, mitokondri içinde ve hücre dışındaetki eden glutatyon peroksidaz, ve tioredoksin bağlı peroksidazlardır[102]. Hidrojen peroksit ayrıca, çay ve kahvede yüksek konsantrasyonlarda alınmaktadır ve oral mukozal hücrelere yayıldığı düşünülmektedir[110]. Ayrıca oral bakteriler tarafından üretilir ve tükürükteki hidrojen peroksit, tükürük peroksidaz sistemi tarafından tiyosiyanatı antimikrobiyal ürünlere oksitlemek için kullanılmaktadır[111].

2.2.3.5. Hidroksil Radikali

Hidroksil ($^{\bullet}OH$) radikali ve perhidroksil radikali ($HO_2^{\bullet-}$), bir dizi hücresel ve doku bileşeninde hasara yol açtığı bilinen en güçlü türlerdir. Hücresel olarak hasar görecek yapılar arasında; lipid, karbonhidrat, protein ve DNA hasarı, antiproteazların oksidasyonu ve düşük moleküler ağırlıklı türler sayılabilir. Lipidlerdeki hasarlipid peroksidasyonu yoluyla olurken, karbonhidratlarda karbonhidrat radikalleri veya depolimerize edici mukopolisakaritler oluşturmaktadır. Protein hasarı birkaç farklı ROM kaynaklı olabilmektedir. Ancak asıl hasar genellikle, alifatik amino asitleri okside eden ve protein yan zincirlerinin hidroksillenmiş türevlerini oluşturan hidroksil radikali kaynaklıdır[112,113]. Hidroksil radikali aktivitesinin karakteristik özelliği, tirozin, triptofan, fenilalanin[114]ve ayrıca histidinin hidroksilasyonudur[115]. Sonraki Fenton reaksiyonları aromatik hidrokarbonlar ve alifatik ürünler oluşturmaktadır. Antiproteazların oksidasyonu - hidroksil radikali aracılı lipid peroksidasyonu, metiyonin-358'in[116] oksidasyonu yoluyla a-antitripsin'i inaktive edebilen radikal ara maddeler oluşturmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı türlerdeki hasar ise düşük moleküler ağırlıklı türler ve sonrasında transkripsiyon faktörü aktivitesi azalmış glutatyon (GSH) nedenlidir.

Hücre dışı hasar görebilecek yapılar arasında;hücre dışı matris bileşenleri ile kolajenler ve yapısal proteinlerdir. Hücre dışı matris bileşenlerinde özellikle proteoglikan ve glikozaminoglikan bozunum zinciri yer almaktadır. Kolajenler ve yapısal proteinlerde ise kolajen üzerindeki prolin bölgeleri özellikle hidroksil radikali aracılı bozulmaya eğilimli görünmektedir[117] ve kolajen diğer proteinlere oranla 3 kat fazla prolin kalıntısı

içerdiğinden[118] periodontal ligamanda bulunan tip 1 kollajen oksidatif bozulmaya karşı özellikle duyarlı olabilmektedir[119].

2.2.4. ROM ve Oral Hastalıklar

ROM patolojik durumların nedeni olabildiği gibi, bu patolojik durumların ilerlemesinin nedeni olabileceğide kabul edilmektedir[120]. Orofasiyal bölge ile ilişkilendirilmiş hastalıklarda da durum aynıdır. Orofasiyal dokularda görülen birçok durum veya hastalık, dokuda yer alan hücre dışı matrisin yıkımından kaynaklanmaktadır[67]. Nitekim, temporomandibular disfonksiyonun doğrudan OS ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Araştırmacılar, sıçanlarda temporomandibular eklem (TME) kıkırdak dokusu kaynaklı kondrositlerin iltihapsal mediyatörlere yanıt olarak, çok yüksek düzeyde ROM ürettiğini göstermişlerdir[121–123]. Ek olarak, Ueno ve ark., bir antioksidan amino asit türevi olan N-asetil sisteinin (NAC), TME kondrositlerindeki OS e bağlı hasarı hafifletme potansiyelini test etmiş ve olumlu sonuçlar elde etmişlerdir[124]. ROM ayrıca TME de görülen artrit durumunda, sinoviyal sıvıda tanımlanmıştır[120]. ROM, yara iyileşmesini geciktirebilecek birçok lokal veya sistemik faktörde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler bakteriyemi veya sepsis, travma, zayıf oksijenlenme, hipoksi, kronik sistemik bozukluklar ve çeşitli ilaçlar kaynaklı olabilmektedir[125]. Bu nedenle, ROM üretiminin baskılanmasının, normal yara iyileşme sürecinin önemli bir aşaması olduğu düşünülebilir. Sakallıoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında periodontal mukoperiostal iyileşme sürecinde, ROM'un temizleyici aktivite gözlendiği bildirilmiştir.[126].

Ağız kanserleri orofasiyal bölgede, patogenezinde ROM'un etkiliği olduğu tanımlanmış bir başka patolojik durumdur[127]. ROM dokulara oksidatif hasar verebilmektedir. Pek çok araştırmacı, karsinogenezin başlatılmasında ve sürecin ilerlemesindeROM'un rolünü tanımlamıştır[128,129]. Oral pre-kanser ve kanserde yükselmiş ROM seviyeleri, RAT ve düşük antioksidanlar bulunur. Bununla birlikte, çeşitli antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruma sağlayabilir. Bu nedenle antioksidanlarla tedavi, oral karsinogenezde yer alan çoklu basamakları önleme, inhibe etme ve tersine çevirme potansiyeline sahiptir[130]. Örneğin, oral skuamöz hücreli karsinomda tespit edilen belirgin OS'e karşı antioksidan bir savunma olduğu bilinmektedir[131]. Orofasiyal ağrı açısından, son çalışmalar, hem nöropatik ağrıda[132–134] hem de iltihapsal ağrıda[135,136] ortamda bulunan fazla ROM'un serbest radikal

temizleyiciler tarafından ortamdan uzaklaştırılmasıyla belirgin analjezik etkinin başladığını göstermektedir.

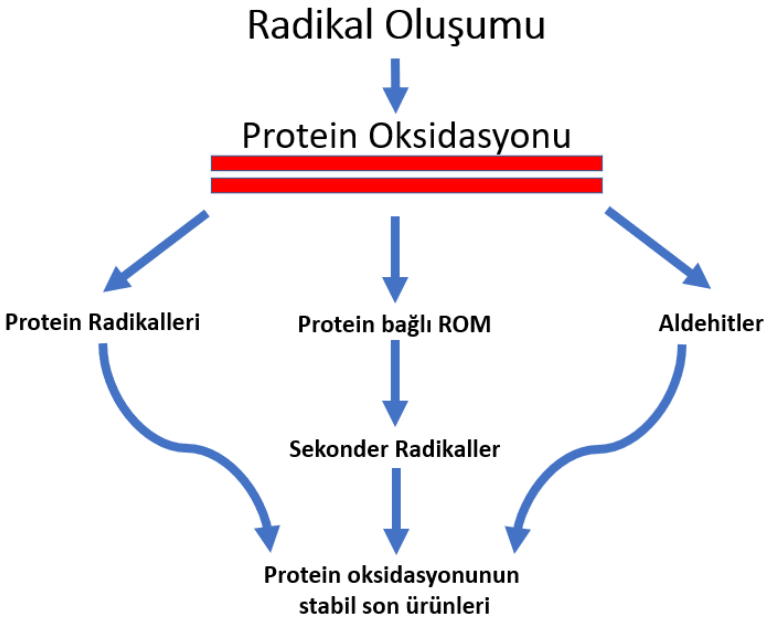
Ayrıca, birçok çalışmada kas yorgunluğu sürecinin[137,138] ve kas yaralanması sürecinin[139] başlamasıyla ROM üretimindeki artışı ilişkilendirmiştir.

2.2.5. Doku yıkım Mekanizması

2.2.5.1. Protein hasarı

ROM aracılı protein hasarının biyolojisi oldukça karmaşıktır ve tam olarak bilinmemektedir. Dean ve arkadaşlarının çalışmasında bazı okside olmuş proteinlerin hücreler tarafından zayıf bir şekilde işlendiğini, bu nedenle yaşlanma sırasında ve diyabet gibi kronik durumlarda dokularda birikmiş olduklarını belirtmişlerdir[140].

Bu birikimin etkileri, tersinir olan ya da tersinir olmayan fonksiyonel inaktivasyona ve proteazlar tarafından yıkımına artan bir duyarlılığa yol açabilmektedir.[59] Radikal atak, proteinlerde etkileşime girebilen karbon merkezli radikal ara ürünler yaratan C=C bağlarını etkileyerek yapı ve fonksiyonları bozabilir. Bir C=C bağının homolitik olarak bölünmesiyle oluşan iki türden her biri bir elektron alabilmektedir ve böylece nötr yüklü bireysel radikal ara maddeler oluşturmaktadır. Bu, büyük bir enerji girişi gerektirmektedir ve elektron ayırmaları, pozitif yüklü ve negatif yüklü bir radikal türün oluşumuna yol açmaktadır. Tiyol (-SH) grupları ayrıca ROM aktivitesi için proteinleri hedefler ve hidrojen çıkarılmasından (S=S) sonra tekrar çapraz bağlar oluşturarak disülfit köprüler oluşturmaktadır. ROM 'un proteinler üzerindeki etkileri, basitçe Şekil 5'de özetlenmiştir [140].



Şekil 5. ROM'un proteinler ve amino asitler üzerindeki etkilerinin şematik görünümü[140]

2.2.5.2. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu serbest radikal türlerinin en önemli reaksiyonlarından biridir. Bu işlemin aktifleştirilmesinde en etkili moleküller, hidroksil radikali ve peroksinitrit anyonudur ($ONOO^-$). Hidroksil radikali lipid peroksidasyon zincir reaksiyonuna yol açmaktadır. Krinsky[83] bu zinciri altı aşama ile açıklarken, Halliwell[59] üç ana aşama ile tepkimeyi basitleştirmektedir:

- başlangıç;
- yayılma;
- sonlandırma.

Hidroksil (veya peroksinitrit) radikali, lipid zarındaki araşidonik asit gibi bir çoklu doymamış yağ asiti yan zincirini hedef alır. Bu durum başlangıç aşaması olarak tanımlanır. Bir hidrojen atomu çıkararak, karbon merkezli bir radikal (L) oluşturmaktadır. Bunun sonucunda yeniden düzenlenebilir veya kovalent bir bağ oluşturmak üzere başka bir çoklu doymamış yağ asiti yan zincir radikaliyle birleşebilir, böylece çapraz bağlar oluşturabilir, membran yapısını ve fonksiyonunu bozabilir. Bununla birlikte, yan zincir

radikali genellikle oksijenle reaksiyona girerek bir lipid peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) oluşturmaktadır ve bu daha sonra başka bir çoklu doymamış yağ asiti yan zincirine saldırarak başka bir karbon merkezli radikal ve bir lipid hidroperoksit ($LOOH^{-}$) üretebilmektedir. Bu aşama ise yayılma olarak adlandırılmaktadır. Yan zincir radikali, oksijen varlığında başka bir çoklu doymamış yağ asiti yan zincirine saldıran lipid peroksil radikali oluşturur ve böylece zincir reaksiyonu devam eder. Böylece sitotoksik aldehitler ve malondialdehit gibi daha az toksik aldehitlere ayrışan yüzlerce lipid hidroperoksit oluşturmaktadır. Lipid hidroperoksitlerin birikmesi hücre zarının işlevini bozmaktadır, bu da zarın çökmesine neden olmaktadır. Sonlandırma aşaması, lipitte çözünebilen bir radikal temizleyici olan E vitamini (a-tokoferol) tarafından en etkili şekilde gerçekleştirilmektedir. Lipid peroksidasyon ürünleri, çeşitli biyoaktif moleküller içermektedir:

- birleşmiş dienler
- lipid peroksitleri
- aldehitler
- akrolein
- izoprostanlar
- nöroprostanlar
- uçucu hidrokarbonlar

2.2.5.3. DNA hasarı

Peroksinitrit ve hidroksil radikallerine bağlı DNA hasar mekanizmaları arasında şunlar bulunmaktadır:

- iplik kopmaları;
- baz çifti mutasyonları (purin ve pirimidin bazları);
- guaninin 8-hidroksiguanine[141] dönüşümü;
- silme;
- ekleme;

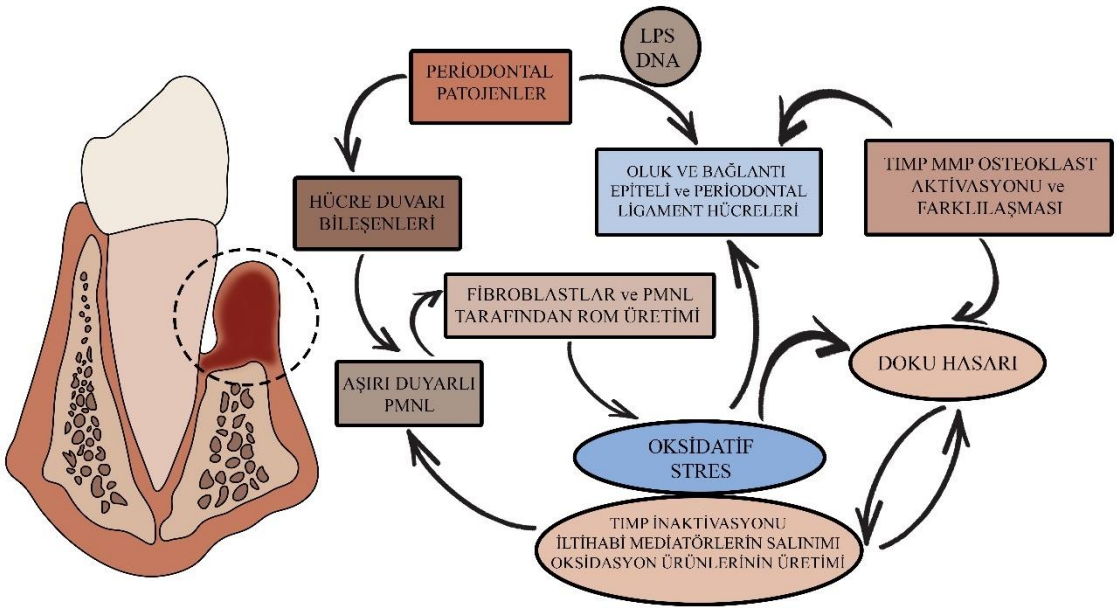
• kesme;

• dizi amplikasyonu.

Hidroksil radikali dört bazın tamamına zarar verir ve karakteristik bir “DNA parmak izi” oluşturmaktadır[142].

2.2.6. Periodontal hastalık patogenezinde ROM’un rolü

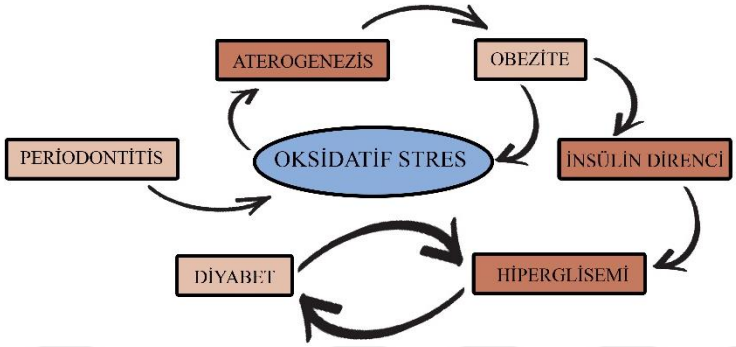
Periodontal hastalık patojenik bakteriler ve konak yanıtı arasındaki immün reaksiyondan kaynaklanmaktadır. Subgingival plak biofilmi, periodontal dokuda iltihapsal değişikliklerin başlamasında ana etiyolojik etkendir. Lipopolisakaritler (LPS) ve bu bakterilerden gelen DNA, iltihapsal sitokinlerin üretimine neden olmaktadır. Bakterilerin hücre bileşenleri ve pro-inflamatuar sitokinler, aşırı duyarlı PMN'lerin enfeksiyon bölgesinde toplanmasına ve aktivasyonuna neden olmakta, böylece ROM üretimini hızlandırmaktadır. Aynı zamanda, Nfkβ ve AP-1'in aktivasyonu osteoklastların aktivasyonuna neden olarak sonuçta doku hasarına neden olan MMP(matriks metalloproteinazlar) konsantrasyonunu arttırmaktadır. Periodontal doku yıkımı, lipid peroksitlerin, iltihapsal mediyatörlerin ve okside proteinlerin aşırı üretilmesine neden olmaktadır. Bu ürünler ayrıca makrofajları, nötrofilleri ve fibroblastları aktive etmektedir vedaha fazla ROM oluşmasına neden olmaktadır. Kısacası, periodontal patojenlerin varlığında, ROM ve doku yıkımının kısır bir döngü oluşturduğu söyleyenebilir. OS nin aracılık ettiği iltihapsal yollardaki değişiklikler, periodontal doku bozulmasında olası potansiyel mekanizmalardan biri olabilir. (Şekil 6)



Şekil 6. Periodontal patojenlere yanıt olarak kronik iltihap ve doku hasarında oksidatif stres kaynaklı olası yol. (LPS,lipopolisakkarit; PMNL, Polimorfonükleer lökosit; TIMP, metaloproteinaz doku inhibitörü; MMP, matriks metaloproteinaz; ROM, reaktif oksijen metabolitleri).

Oksidatif stresi karakterize eden oksidatif hasar, diğer nedenlerin yanı sıra çeşitli iltihapsal ve nörodejeneratif hastalıklar, bağ dokusu hastalıkları ve yaşlanma süreçleriyle ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stresin rolünün olduğu düşünülen hastalık ve durumların arasında periodontitis, obezite, tip II diabetes mellitus (DM), vasküler hastalıklar ve olumsuz gebelik sonuçları yer almaktadır[143]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu biyokimyasal olayın, kronik iltihapsal süreçlerin patolojik temelinde bulunabileceğini ve hastalıkların ilerlemesini etkileyebileceğini göstermektedir[144]. ROM'un ana hedefi doku lipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitleridir. Lipid oksidasyonu bir dizi ikincil ürüne yol açar; bu yan ürünler çoğunlukla oksidatif hasarı şiddetlendirebilen aldehitlerdir. Romatoid artrit, Sjogren sendromu, Lupus eritematozus gibi lokal veya sistemik kronik iltihapsal hastalıklar oksidatif stresin artışi ile ilişkilendirilmiştir. Buna dayanarak,

oksidatif stres , periodontal hastalık ve sistemik hastalıklar arasında nedensel bir ilişki olması beklenebilir[145].(Şekil 7)



Şekil 7. Oksidatif stres, periodontal hastalık ve sistemik hastalıklar arasındaki ilişki.

ROM çok yönlü etkilere sahiptir ve ROM' un işlevi redoks durumuna göre belirlenmektedir[146]. ROM antioksidan sistemin kapasitesini aşan düzeyde üretildiğinde, oksidatif stres uyarılmaktadır[49]. ROM' un periodontal hastalıkların patogenezine katılımı, periodontitis vakalarında bozulmuş bir redoks dengesinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Kesitsel çalışmalarda, periodontitislilerde, sağlıklı kontrollere göre plazma ve serumda düşük total antioksidan seviyeleri (TAS) gösterilmiştir[22,147–151]. Tükürüğün, periodontitis ile ilişkili biyobelirteçlerin yoğun olarak bulunduğu bir ortam olduğu belirtilmiştir[152].

Tükürükteki TAS, kronik periodontitisli hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur[149,153–155]. Ayrıca, periodontitisli hastaların serum, tükürük ve dişeti oluk sıvısında (DOS) sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek seviyelerde reaktif oksijen metabolitleri ve toplam oksidan seviyesi (TOS) olduğu gözlenmiştir[148,149,156,157]. Bu bilgilere ek olarak, periodontitisli bireylerde tükürük TAS ile klinik ataşman düzeyi (KAD) arasında ters yönlü güçlü korelasyon olduğu saptanmıştır[158]. Bir LPO ürünü olan Malondialdehit (MDA) ve TOS seviyeleri ile periodontal parametreler arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon gözlenmiştir[156]. Bu sonuçlar düşük TAS ve yüksek ROM'un periodontitis için risk faktörü olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, redoks durumundaki değişimin periodontitisin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunu belirlemek zordur.

ROM'un sebep olduğu doku hasarına dair kapsamlı çalışmalar yapılmıştır[17,49,67]. Bu çalışmalara göre, periodontal doku hasarı doğrudan oksidatif stresten ve dolaylı olarak, iltihap, apoptoz ve diğer faktörlerle ilişkili hücre sinyal yollarının aktivasyonu ile ortaya çıkabilmektedir. Lipid peroksidasyonunun ve hücre zarının zarar görmesinin ROM' un doğrudan neden olduğu doku hasarına aracılık edebileceği gösterilmiştir[159–161]. Bu durum, protein denatürasyonu ve enzim deaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır[49,151,162,163]. Nükleik asit hasarı, kromozom bozulması[164] meydana gelerek mitokondriyal yaralanma ve ROM oluşumuna neden olmaktadır[61]. Doku yıkımının, MDA, protein karbonilasyon ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) peroksidasyonu, protein hasarı ve DNA hasarı belirteci seviyelerinin ölçülmesiyle değerlendirileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir[164–170].

ROM, süperoksit radikali (**$O_2^{\bullet-}$**), hidroksil radikali (**$^{\bullet}OH$**) ve nitrik oksit radikali (**$NO^{\bullet}$**) türleri ve hidrojen peroksit (**H_2O_2**) ve hipokloröz asit (**HOCl**) gibi radikal olmayan oksijen türevleri gibi oksijen türevli serbest radikalleri içeren geniş kapsamlıbir terimdir.

PMNL'in, bakteriyel patojenlere karşı konak yanıtı sırasında üretilen ilk ve baskın savunma hücresi türü olduğu bilinmektedir[171]. Aktif periodontal hastalık sırasında fagositik hücreler tarafından üretilen ROM osteoklast stimülasyonunda rol oynayabilmektedir. ROM'un zararlı etkilerini in vivo olarak ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Antioksidan, oksitlenebilir bir substrat ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda, bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır[62]. Antioksidanların biyolojik sistemleri oksidatif hasardan koruduğu mekanizmalar, ROM' un doğrudan atılmasını ve ROM oluşumunu teşvik eden serbest katalitik metal iyonlarının ayrılmasını içermektedir. Memelilerin dokularında görev alan en önemli antioksidan, **$O_2^{\bullet-}$** 'nın ayrışmasını katalize eden ve katalaz ve glutatyon peroksidaz ile birlikte, **H_2O_2**'nin, hücre içi birikimine karşı koruyucu mekanizmalar sağlayan süperoksit dismutazdır(SOD)[172]. Bununla birlikte, bu enzimlerin hücre dışı sıvılar içindeki aktiviteleri düşüktür ve antioksidan aktivite, ferritin, transferrin, laktoferrin ve hemosiderin gibi demir bağlayıcı proteinlere ve seruloplasmin gibi bakır bağlayıcı proteinlere bağlanmaktadır[173].

Ek olarak, antioksidan aktivite aynı zamanda albümin, askorbat, a-tokoferol, bilirubin ve üre gibi düşük moleküler kütleli moleküllerle de ilişklendrilmiştir[173–177]. Bu

düşük moleküler kütleli antioksidanların çoğu tükürükte ve DOS'da tespit edilmiştir[178]. Artmış ROM üretimi ve antioksidan konsantrasyonları arasındaki dengesizlikler, romatoid artrit ve periodontal hastalıklar da dahil olmak üzere kronik iltihapsal hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır[16,179,180].

Periodontitiste doku yıkımının çoğunluğunun, dişeti kenarındaki dental plak biyofilmine karşı kontrolsüz konak yanıtının, nötrofil enzimleri uzun süreli salınmasınınve ROM salınımının sonucu olduğu kabul edilmektedir. Periodontal literatürdeki çoğu çalışmada, lipidler ile ilişkilendirilen ROM reaksiyonlarının belirteçlerine odaklanılmıştır. Günümüze kadar kronik periodontitiste yalnız tiyobarbitürik asit reaktif maddeler ve MDA araştırılmıştır. Yayımlanan tüm çalışmalar, kronik periodontitisli hastaların, periodontal olarak sağlıklı kontrollerden daha yüksek düzeyde lipid peroksidasyona sahip olduğunu göstermiştir. Periodontitisli bireylerde hem plazmada hem de eritrositlerde[160] tiobarbitürik asit reaktif maddelerin arttığı bulunmuştur[160,181]. MDA'nın da periodontitisli bireylerin DOS ve tükürük örneklerinde sağlıklı kontrollere göre arttığı bulunmuştur[161]. Periodontitisli bireylerin tükürükve dişeti oluğu sıvısı örneklerinde sağlıklı kontrollere göre MDA'nın arttığı bulunmuştur[161,156]. Tsai ve arkadaşlarının çalışmasındaMDA / 4-hidroksialkanalın DOS konsantrasyonları, tükürük konsantrasyonlarına göre 200 ile 400 kat arasında daha yüksek bulunmuştur[161]. Bu sonuç, DOS'da tükürükten önemli ölçüde daha yüksek miktarda ROM aktivitesi tespit edilebildiğini göstermektedir. Ancak bir başka çalışmada DOS ve tükürükteki total antioksidan kapasitenin benzer olduğu gösterilmiştir[22]. Wei ve ark. kronik periodontitisli hastalarda gerçekleştirdikleri çalışmada periodontal tedavi öncesi ve sonrası serum, tükürük ve DOS'daki lipid peroksidasyon seviyelerini, total oksidan seviyelerini ve süperoksit dismutaz seviyelerini incelemiştir. TOS ve süperoksit dismutaz düzeyinin (SOD) kronik periodontitis grubunda, sağlıklı kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada MDA sadece DOS örneklerinde bulunmuştur. Periodontal tedavi sonrasında serum, tükürük ve DOS'da TOS ve SOD seviyeleri başlangıç düzeylerine göre anlamlı derecede azalmıştır[157].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Diacron-reaktif oksijen metabolitleri (D-ROM), antioksidan potansiyeli, C-reaktif protein (CRP), interlökin-6 ve lipid profilleri serumdaki yüksek hassasiyetli testlerle belirlenmiştir. Şiddetli periodontitisli hastalarda, sağlıklı kontrol bireylerine kıyasla daha yüksek D-ROM seviyeleri ve düşük toplam

antioksidan kapasite gösterilmiştir ve D-ROM düzeylerinin CRP ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir[148].

DNA üzerindeki oksidatif hasar hakkındaki yayınlanmış verilerin çoğu, tükürükteki 8-hidroksideoksiguanozin seviyelerininin enzim bağlı immünosorbent tahlili(enzyme-linked immunosorbent-assay- ELISA) ile araştırıldığı bazı çalışmalar ile bildirilmiştir. Bu çalışmalar, kronik periodontitisli hastalardan alınan numunelerdeki 8-hidroksideoksiguanozin seviyelerinin, periodontal olarak sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğunu göstermiştir[164].

Protein oksidasyonu ile ilgili diğer veriler, sıçanlardaki deneysel periodontitisli dokulardaki nitrotirosinin immünohistokimyasal lokalizasyonuna dayanmaktadır[182–185]. Hayvan çalışmalarının dördünde, iltihapsal hücrelerin ve nitrotirosin-pozitif hücrelerin varlığının ligasyonlu dişlerle ilişkili dokularda kontrollere kıyasla arttığı gösterilmiştir.

ROM' un çeşitli iltihapsal hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu ve doku hasarında bir rolü olduğu fikri, son on yılda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bununla birlikte, doku hasarındaki rolleriyle ilgili kanıtları destekleme genellikle dolaylı ve şartlıdır. Gerçekten, çok az sayıda rapor Halliwell'in önermelerinden herhangi birini veya hepsini yerine getirmektedir. ROM'un belirli bir hastalıkta doku hasarının kilit aracıları olduğu sonucuna varılabilmesi öncesi yerine getirilmesi gereken kriterler[186,187].

1884'te Robert Koch[188] tarafından bir organizma ve bir hastalık arasında nedensel bir ilişki kurmak için önerilenlere benzer şekilde Halliwell tarafından önerilen kriterler şunlardır:

• ROM veya neden olduğu oksidatif hasar, yaralanma bölgesinde bulunmalıdır;

• ROM oluşumu veya bunun neden olduğu oksidatif hasarın zaman süreci, doku yaralanmasından önce veya aynı anda meydana gelmelidir;

• ROM'un ilgili bir zaman dilimi içinde in vivo olarak bulunan konsantrasyonlardaki dokulara doğrudan uygulanması, hastalıklı dokuda gözlenene benzer bir zarar vermelidir;

• ROM oluşumunu ortadan kaldırmak veya inhibe etmek, doku hasarını in vivo antioksidan etkileriyle ilgili bir dereceye kadar azaltmalıdır.

2.3. Apoptoz

Programlı hücre ölümü; gelişim sırasında rastlantısal ya da kazara meydana gelmeyen, kontrollü basamakların takibi sonucu lokal ve geçici olarak tanımlanmış yıkımdır[189]. Apoptoz terimi ise, morfolojik süreç sırasında gerçekleşen kontrollü hücresel yıkım olarak ilk defa Kerr tarafından tanımlanmıştır[190].

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, başlatıcı ve efektör olarak ikiye bölünmüş[191], kaspaz denilen bir sistein proteaz ailesi tarafından yönlendirilmektedir[192]. Başlatıcı kaspazlar, kaspaz-8 ve -9, çeşitli hücresel substratları parçalayan kaspaz-3, -6 veya -7 dahil olmak üzere efektör kaspazları aktive eden düzenleyici roldedirler[193]. Apoptoz, ekstrensik(dış) ve intrensik(iç) sinyalleşme yollarından yararlanır[194]. Dış yol kaspaz-bağımlıdır ve hücre dışı stimülasyon ile indüklenir. Bu dış uyaranlar, ölüme neden olan sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex-DISC) oluşumunu başlatır, böylece kaspaz-8'i aktive ederek kaspaz-3'ün aktivasyonu tetiklenir, bu da apoptozu başlatır[191].

İçsel(intrensik) yolak, mitokondri merkezli kaspaz bağımlı veya bağımsız yolaklar tarafından kontrol edilir ve hücrelerde mitokondriyal dış zar permeabilizasyonuna (MOMP) neden olabilen çoklu hücre içi uyaranlarla tetiklenebilir[195,196]. MOMP sırasında, sitokrom c'yi serbest bırakmak için mitokondri tetiklenir. Sitokrom c ve Apaf-1 birleşerek kaspaz-9 aktivasyonu için gerekli olan apoptozomu oluşturur.Kaspaz-9'un bölünmesi, kaspaz-3'ün proteolitik olgunlaşmasını ve sonuç olarak hücre apoptozunun yürütme fazının uyarılmasını sağlar[195]. Kaspaz-8'in DISC ile verimli ve hızlı aktivasyonu, mitokondriyal tutulumdan bağımsız olarak kaspaz-3'ü doğrudan aktive edebilir. Yetersiz DISC oluşumu durumunda, kaspaz-8, apoptozu başlatmak için kaspaz-9 üzerinden mitokondriye bağlı bir şekilde işlev görür[197]

Literatüre bakıldığında kaspaz-3 Kronik Periodontitisli hastaların DOS'unda yüksek bulunmuştur. Buna bakılarak Kaspaz-3 ün başlatıcı kaspazları, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 un da bu hastalık sürecine dahil olduğunu araştırmak amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

Periodontitis'in başlangıç ve gelişim fazları apoptoz'un işaretleriyle bağlıdır. Buna ek olarak *Aa* epitel hücrelerinde ve makrofajlarda, ve P.gingivalis ise T hücrelerinde apoptozu indükler. Fakat tüm bunların yanında periodontal hastalık patogenezinde

apoptotik mekanizmanın tam olarak nasıl olduğu ve hangi moleküllerin buna dahil olduğu henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır.

Gewies, apoptoz ile ilgili derlemesinde, klasik bilgi olarak, gerçekleşen süreçten şu şekilde bahsetmektedir:

'Apoptotik hücreler; hücre büzülmesi, deformasyon ve bu hücrelerin diğer hücrelerle temasının kaybolması gibi sterotipik morfolojik özellikleri ile diğer hücrelerden ayırt edilebilir. Hücrelerin kromotin ağı yoğunlaşır ve çekirdek zarına doğru itilir. Hücre zarı tomurcuklanarak sıkı membranla kaplı içerikler, hücreden ayrılır. Sitozol, yoğun kromotin ve organalleri içeren bu ayrılmış yapılara apoptotik cisimler denir. Bu cisimler makrofajlar tarafından yutularak inflamatuar yanıtı uyarmadan ortamdan uzaklaştırılır. Ayrıca, nekroza bağlı hücre ölümünün apotozdan farklılık gösterdiğini, nekrotik bir hücrenin ölümünde, hücre zarının bütünlüğünü kaybettiğini, hücre içeriğinin dağıldığını ve hücre bütünlüğünün bozulduğunu belirtmiştir'[198].

Nekrotik hücre ölümü, hastalığın patolojik bir şeklidir ve hızlı hücre şişmesi ve liziz ile karakterize akut hücresel hasardan kaynaklanan hücre ölümüdür. Buna karşılık, apoptotik hücre ölümü hücrenin kontrollü otomatik sindirimi ile karakterizedir. Hücreler, endojen proteazların aktivasyonu yoluyla kendi apoptotik ölümlerini başlatıyor gibi görünmektedir. Bu, hücre iskeleti bozulması, hücre küçülmesi ve zar kabarcıklarına neden olur. Apoptoz ayrıca çekirdek içindeki karakteristik değişiklikleri içermektedir. Çekirdek, endonükleazlar aktive edildiğinde ve nükleer DNA'yı parçalamaya başladığında yoğunlaşmaya uğramaktadır. Birçok hücre tipinde DNA, oligonükleozom boyutunda DNA fragmanlarına indirgenirken, diğerlerinde daha büyük DNA fragmanları üretilmektedir. Apoptoz ayrıca mitokondriyal fonksiyon kaybı ile de karakterizedir. Bu, mitokondrinin apoptozu düzenlemede önemli bir işlevi olabileceğine dair spekülasyonlara yol açmıştır . Ancak, bu hipotezi destekleyecek veriler şu anda mevcut değildir. Ölen hücre, plazma zarı bütünlüğünü korumaktadır. Bununla birlikte, apoptotik hücrelerin plazma zarındaki değişiklikler, komşu fagositik hücrelere onları yutmaları ve böylece degradasyon sürecini tamamlamaları için sinyal göndermektedir. Hemen fagositozlanmayan hücreler, daha küçük membrana bağlı olarak apoptotik cisimler adı verilen parçalara parçalanmaktadır. Apoptozun önemli bir özelliği, ölmekte olan hücrenin yok edilmesinde enflamatuar bir yanıt oluşmamasıdır. Aksine, nekrotik hücre ölümü

hücre zarı bütünlüğünün erken kaybıyla ilişkilidir ve bu sitoplazmik içeriğin sızmasına ve iltihapsal yanıtın oluşmasına neden olmaktadır[199].

Saraste, apoptoz sürecini moleküler ve biyokimyasal olarak açıklamış ve apoptotik hücrelerde meydana gelen bu morfolojik değişikliklerin, DNA'nın oligonükleozomal parçalara ayrılması, sitoplazma ve organallerin şekliyle integrasyonunu sağlayan spesifik protein substratlarının parçalanması sonucunda oluştuğunu belirtmiştir[200].

Leist de, nekroz sırasında, kontrolsüz biçimde hücre içeriğinin hücresel çevreye dağılmasının, çevre hücrelerin zarar görmesine ve ilgili dokuda güçlü iltihabi yanıtın ortaya çıkmasına neden olduğunu ifade etmiştir[201].

Çalışmalardan elde edilen veriler, apoptoz ve nekrozun kronik iltihapsal sürecin gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini ve periodontitiste doku yıkımı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir[202,203]. Klinik olarak sağlıklı dişetinde, özellikle bağlantı epitelinde bir miktar apoptoz oluşabilmektedir. Bu olay homoeostazın sürdürülebilmesi için mukozal iltihabın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. En derin periodontal cepte ve cebin en apikal kısmında gözlenen artmış apoptoz ve azalmış proliferasyon ise periodontitisin ilerlemesinde önemli bir faktör olabilir[204,205]. Periodontopatojenler, hücre apoptozu ve nekroz ile birlikte bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile ilişkilidir[206,207]. Çeşitli iltihaplanma süreçleri ayrıca çevre doku hücrelerini, granülositleri ve makrofajları apoptoza sürükleyebilmektedir ve böylece iltihabı artırabilmekte ve sürdürebilmektedir[208]. Nekrotik hücreler tarafından proinflamatuar sitokinlerin ve DAMP'ların salınımı apoptozu indükleyebilmekte ve ardından apoptotik hücrelerin artması, diğer bazı inflamatuar hastalıklarda bildirildiği gibi periodontitiste sekonder nekroza yol açabilmektedir[209]. Bununla birlikte, apoptozun periodontitiste iltihaplanma ve yıkıma tam olarak nasıl neden olduğu belirsizliğini korumaktadır.

2.3.1. Apoptoz sinyal yollarının moleküler mekanizması

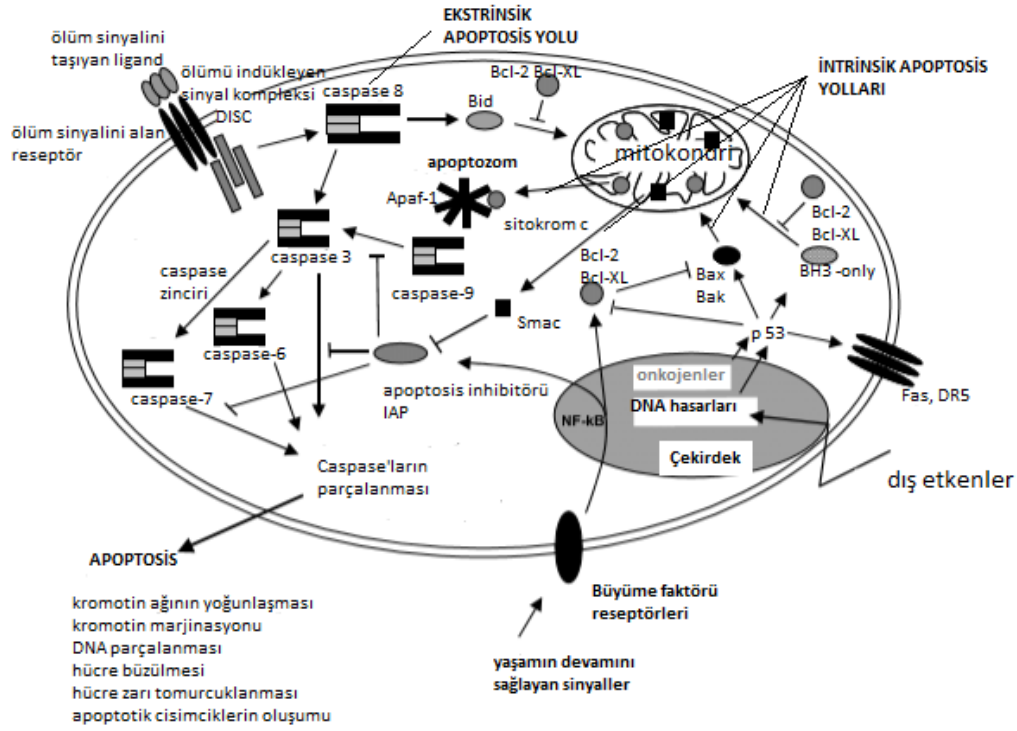
Hücre ölümü ile ilgili çoğu bilgi *C.elegans*'lar üzerinde yapılan genetik çalışmalar sonucu elde edilmiştir[210]. *C.elegans*'lardaki apoptozun son basamağının sistein proteaz

ced-3 aktivasyonu ile gerçekleştiği, ced-3 aktivasyonunun ced-4 ile kompleks oluşturduğunu ve bu kompleksin, apoptoz inhibitörü ced-9 ve apoptoz indükleyeci egl-1 ile regüle olduğu belirtilmiştir. Bratton, *C.elegans*'lardaki sistein proteaz homoloğunun kaspaz ailesi olduğunu ve bunun apoptotik hücre ölümünde görev aldığını ortaya koymuştur[211].

Gewies konuyla ilgili 2003 yılında yayınladığı derlemesinde, hücrede kaspazların inaktif olarak sentezlendiklerini ve prokaspaz olarak adlandırıldıklarını, proapoptotik kaspazların, başlatıcılar (prokaspaz -2, -8, -9 ve –10) ve sonlandırıcılar (prokaspaz -3, -6, and –7) olarak ikiye ayrıldığını bildirmiştir. Başlatıcı kaspazların uzun ek parçalara, sonlandırıcıların ise kısa ek parçalara sahip olduklarını, prokaspaz 8 ve 10'un ölüm bölgesi 'death effector domains (DED)' parçasına ve prokaspaz 2 ile 9'un 'caspase recruitment domains (CARD)' parçasına sahip olduğunu belirtmiştir. Başlatıcı kaspazların, sinyal kompleksinin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıyorsa ekstrinsik apoptoz yolu ile, hücre içinden köken alıyorsa intrensik apoptoz yolu ile aktive olduklarından bahsetmiştir[198].

Ekstrensik yolda, prokaspaz 8'in DED parçasıyla hücre yüzeyinde bulunan tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesinden olan ölüm uyaran sinyal kompleksine 'death inducing signalling complex (DISC)in ' bağlandığı ve bağlanmasının birçok prokaspaz 8 molekülünün yakınlaşmasını sağlayarak otoproteoliz ile aktivasyonlarına sebep olduğu gösterilmiştir[212,213].

Apoptozom, çatısını Apaf-1 denilen protein yapının oluşturduğu, mitokondriden salınan sitokrom c ile bu proteinlerin birleşerek, tekerlek benzeri yapının meydana geldiği bir protein kompleksidir[214]. Intrensik yolda prokaspaz 9'un mitokondrial proapoptotik olaylar sonucu gelişen apoptozom tarafından uyarıldığı ve apoptozom ile aktif hale gelen prokaspazların, sonlandırıcı kaspaz olan prokaspaz 3, 6, 7'yi uyararak apoptoz sürecinin devamını sağladığı ortaya konmuştur[215] (Şekil 9).



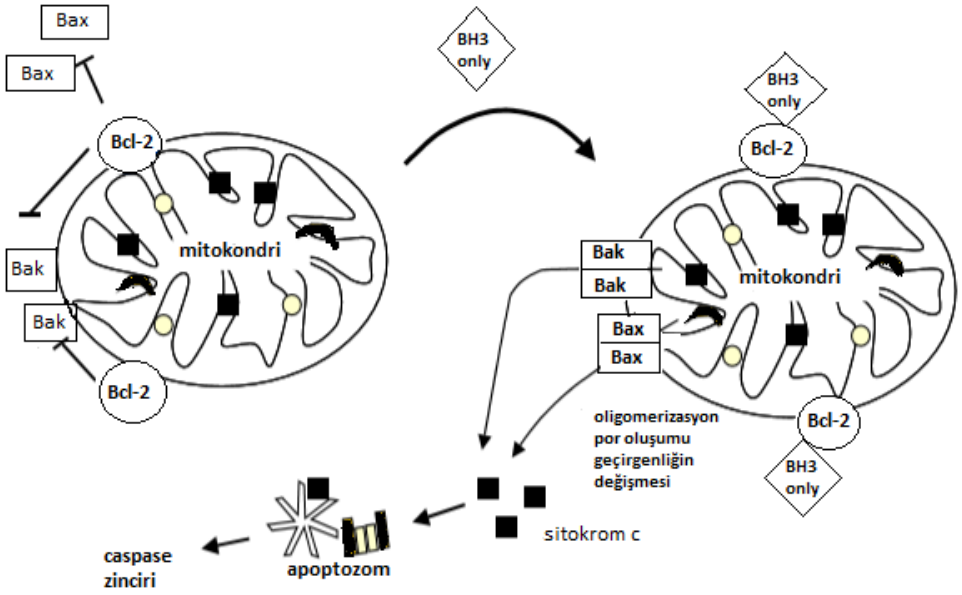
Şekil 8. Apoptoz mekanizmaları ile ekstrensik ve intrensik yolların şematik gösterimi[215].

2.3.2. Apoptoz düzenlenme mekanizması

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynamaktadır (Şekil 8). Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olmaktadır. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol almaktadır. Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşmaktadır; Proapoptotik üyeler ve Antiapoptotik üyeler. Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir.

Chao ve Korsmeyer,hücre ölümünde gelişimsel proteinler ailesinden olan Bcl-2 ailesinin apoptoz sürecinde regülatör olarak görev üstlendiklerini belirttikleri bir derlemede, bu proteinlerin, mitokondrial dış zarın geçirgenliğini(MOMP) kontrol ettiğini ve hem proapoptotik (Bax, BAD, Bak ve Bok gibi) hem de antiapoptotik (Bcl-2 nin kendisi , Bcl-xL, Bcl-w gibi) gruplara sahip olduklarını vurgulamışlardır[216].

Cory de, Bcl-2'nin kendisine ek olarak yaşamsal devamlılığın öncüsü olan Bcl-XL, Bcl-w, A1, ve Mcl-1 gibi antiapoptotik proteinlerin BH1, BH2, BH3, ve BH4 gibi yapısal parçalara sahip olduğunu, Bcl-2 ailesinin proapoptotik kümesinin iki alt gruba ayrıldığını, Bax alt grubunun; Bax, Bak, ve Bok proteinlerinden oluşup bunların BH1, BH2 ve BH3'ün hepsini içerdiğini, BH3 alt grubunun ise (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 ve Spike) sadece kısa olan BH3'ü taşıdığını ve BH3'ün, hücre ölümünde gerekli ve yeterli bir etkileşim parçası olduğunu derlemesinde belirtmiştir.



Şekil 9. Bax ve Bcl-2'nin intrinsik yoldaki etki mekanizmaları.

Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırmaktadırlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olmaktadırlar. 3 tip kaspaz ailesi bulunmaktadır; başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10), efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7), ve iltihapsal kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar. Apoptoz aktive

edildikten 1 saat ya da daha uzun bir süre sonra DNA da tek iplikte bir çentikle başlayan çok karakteristik ve geri dönüşümsüz bir parçalanma görülmektedir.

Apoptoz iki yolla gerçekleşmektedir; I- İntrinsik (Mitokondriyal) yol II- Ekstrinsik yol (a- Direkt mekanizma b- Dolaylı mekanizma)

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon). Her 2 sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklemektedir.

İntrinsik Yol

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirmektedir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirmektedir (Şekil 9). Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarmaktadır. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşımaktadır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe ederek apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engellemektedir. AIF, çekirdeğe transloke olarak çekirdeği parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz9'u aktifleştirir. Kaspaz-9 prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmante olmasına neden olur.

Ekstrinsik Yol

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-α, TRAİL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde

trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing singnaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive edebilmektedir. Ya direkt kapsaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak instrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna neden olmaktadır. Ekstrinsik yollardan biriside sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre zarı yapı taşlarından biridir. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşür. Sfingozin de Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler. Ayrıca patojenle enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili bir diğer yol ise Granzim-Perforin sistemidir. Perforinler ve Granzim B birer serin proteaz'dır. Sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunurlar. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlandığında perforinler salınır. Perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru hücre içine Ca^{++} girişini artırır. Vezikülden Granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B de kaspaz aktivasyonunun ardından DNA fragmantasyonu sonucu apoptoza neden olmaktadır[217].

2.4. Hipoksi

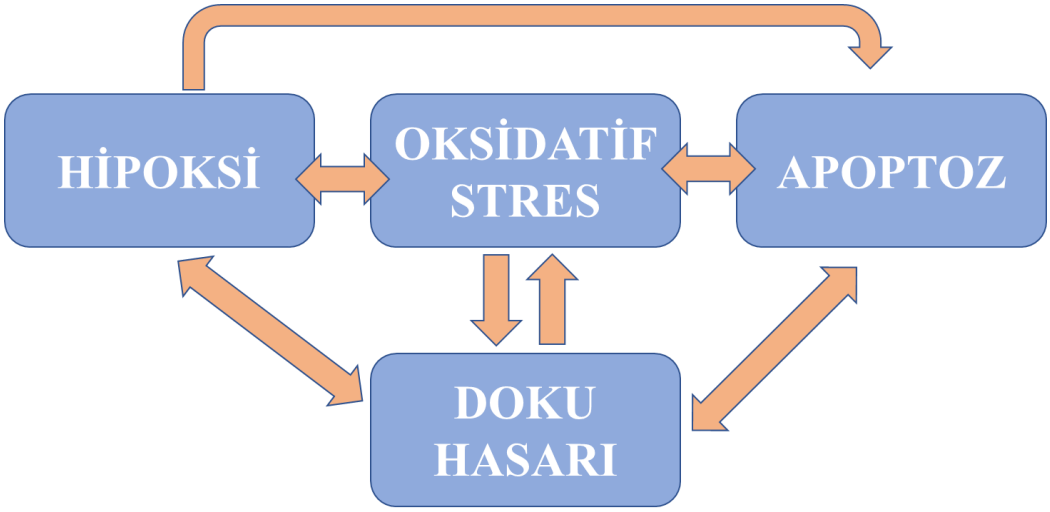
Çok hücreli canlıların yaşamında oksijen dengesi şarttır. Hipoksiye kronik şekilde maruz kalma ve anjiyogenezdeki değişiklikler, iltihapsal hastalıklar(ör: romatoid artrit), iskemik hastalıklar, kemik ve doku yaralanmaları, tümörler ve metastatik genişlemeler dahil birçok patolojik durumla yakından ilişkilidir[29,218–220].

Hipoksi ve iltihap kronik iltihapsal hastalıklarda genellikle bir arada bulunur ve birbirlerini modüle ettiği gösterilmiştir[221,222]. Hipoksi, vaskülarize diş destek dokularında kronik iltihap ile karakterize olan periodontitis için patojenik faktör olarak kabul edilmektedir[223,224].Gram negatif anareobik patojenler hastalıklı periodontal ceplerde çoğalırken tedavi edilmemiş periodontal ceplerin tabanında daha düşük oksijen seviyelerine sebep olmaktadır[225,226].İltihaplanmış periodontal dokularda konak hücre artışı ve artmış iltihapsal hücre infiltrasyonu, oksijen tüketiminin de artmasına sebep olmaktadır[225,227]. Diğer yandan, iltihapsal dokulardaki endoteliyal hasar ve doku ödemi,

mikrodolaşım ve oksijenlenmenin azalması ile sonuçlanmaktadır[227]. Periodontal dokulardaki düşük oksijen düzeyi muhtemel bir immunomodulatör sinyal olabilir ve proenflamatuar gen ekspresyonunu modüle etmektedir. Hipoksik şartlar altında insan periodontal ligament hücreleri Il-1β, Il-6, PG-E2, nukleer faktör-kappa B'nin reseptör aktivatörü ve osteoprotegerin salgılamaktadır[223], ki bunlar periodontal doku yıkımı ile yakından ilişkilidir[228,229].

İlthaplanmış dokulardaki oksijen yetersizliğine adaptif cevap,temel transkripsiyonal düzenleyici olanhipoxia-inducible factor-1 alpha(HIF-1α) nın birikmesi ve aktive olmasıdır. HIF-1α proteininin salınımının varlığı periodontitisli hastaların dişeti doku örneklerinde yakın zamanda gösterilmiştir. Hasarlı periodontal dokularda HIF-1α proteini salınımını ilk kez Ng ve ark. tarafından gösterilmiştir[230]. Shi ve ark.nın bir çalışmasında kronik periodontitisin değişik safhalarında olan hastaların dişeti doku örneklerinde HIF-1α salınımının önemli şekilde arttığı gösterilmiştir[231]. HIF-1α nın periodontitisli hastaların doku örneklerindeki immunoreaktivitesi, gingivitisli ve sağlıklı kontrollere oranla, periodontal iltihabın ilerlemesiyle bağlantılı olarak daha yoğun bulunmuştur[232,233].

Anjiyogenez ve primer aracı vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), iltihap, yara iyileşmesi ve kemik remodelinginin önemli özelliklerindendir[234,235].HIF, hipoksinin aracılık ettiği olayların önemli düzenleyici proteinlerinden biridir[236]. HIF transkripsiyon faktörleri ailesi, hücre proliferasyonu, apoptoz, metabolizma, immün yanıt, genomik instabilite ve vaskülarizasyon dahil hipoksiye adaptasyonu sağlayan süreçlerde yer alan çoklu genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. HIF, VEGF, nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu ve anjiyogenezi düzenleyen sitokin salımını modüle etmektedir[44].Bu bulgular hipoksinin bakteri kolonizasyonu için çevresel bir değişiklik sunmasının yanı sıra, iltihabın önemli bir düzenleyicisi olanbileceğini ve HIF-1α nın periodontal hastalıktaki muhtemel rolünü göstermektedir[237].



Şekil 10. Hipoksi, apoptoz, oksidatif stres ve doku hasarı arasındaki ilişkiyi gösteren şematik çizim.

2.5. Periodontal Hastalık Sınıflaması

2017 yılında Dünya Çalıştayında yeni bir periodontal hastalık sınıflaması önerilmiştir.Sınıflamanın değişmesinin temel sebeplerinden biri hastalıkları aynı kategoriye sınıflamadığımız zaman bu hastalıklara getirilen çözümlerde bilimsel kanıtlara ulaşılamamasıdır. Dolayısıyla bu hastalıklar üzerinde yapılacak çalışmalara rahat ulaşabilmek adına yeni bir sınıflama kabul edilmiştir.

Periodontal Sağlık

"Sağlık, hastalığın veya sakatlığın tamamen yokluğu değil, tam bir fiziksel, zihinsel ve sosyal refah halidir"[238]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bu tanımına dayanarak, periodontal sağlık, bireyin normal fonksiyonuna izin veren ve mevcut veya geçmiş hastalıklardan kaynaklanan sonuçlardan (zihinsel veya fiziksel) kaçınmasını sağlayan, iltihapsal periodontal hastalık içermeyen bir durum olarak tanımlanmıştır[239].

Periodonsiyumun normal ataşman kemik seviyesine veya azalmış desteğe sahip olmasına ve modifiye edici faktörleri ve göreceli tedavi sonuçlarını kontrol etme yeteneğine bağlı olarak 4 periodontal sağlık seviyesi olduğu önerilmiştir[240]. Bu 4 seviye;

1)Bozulmamış periodontal sağlık, kayıba uğramamış periodontal dokularda klinik iltihabın ve fizyolojik immün yanıtın tamamen yokluğu ile tanımlanır. Bozulmamış periodontal sağlığın klinik olarak gözlemlenmesi olası değildir;

2)Klinik periodontal sağlık, kayıba uğramış periodontal dokularda klinik iltihabın yokluğu veya minimal düzeyde olması ile tanımlanır;

3) Kayıba uğramış periodontal dokularda periodontal hastalık stabilitesi;

4) Kayıba uğramış periodontal dokularda periodontal hastalık remisyonu/kontrolünü içermektedir.

Periodontal hastalık stabilitesi ile periodontal hastalık remisyonu/kontrol, arasındaki ayrım, modifiye edici risk faktörleri ve tedaviye yanıtı kontrol edebilme yeteneğine göre yapılmaktadır. Stabilite, minimal iltihap ve tedaviye optimal yanıt ile kontol edilebilir, değiştirilebilir risk faktörlerinin varlığı ile karakterizedir. Periodontitis tedavisi için ana hedeftir. Risk faktörlerinin tamamen kontrol edilemediği hastalar için, remisyon/kontrol daha gerçekçi ve ulaşılabilir tedavi hedefidir[239].

Gingivitis

İltihabı bölge düzeyinde tanımlamak, gingivitis vakasını tanımlamaktan oldukça farklıdır. Evrensel bir vaka tanımı, popülasyon gözetimi için, tedavi hedefleri belirleyen hekimler için, ve önlem ve/veya tedavi yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesini sağlamayı kolaylaştırmak için gereklidir.

Genel olarak iki dişeti hastalığı kategorisi vardır:

• Dental plak kaynaklı dişeti iltihabı

• Dental plak kaynaklı olmayan dişeti hastalıkları

Gingivitis mikro çevresel koşulları farklı olduğundan (sağlam veya desteği azalmış bir periodonsiyumda veya periodontitis tanısı konulan hastada olmasına göre) kategorilendirilmiştir.

Gingivitis kendi içinde alt gruplara ayrılır:

- Sağlam Periodontal yapılarda görülen gingivitis
- Hasarlı ancak periodontitis geçirmemiş yapılarda görülen gingivitis (ör: Kuron Boyu Uzatma operasyonu yapılan vakalar)
- Başarılı bir şekilde tedavi edilmiş hasarlı periodontal yapılarda görülen gingivitis

olarak sınıflandırılmıştır[239].

2.5.1. Periodontitis

Periodontitis, bakteri ilişkili, konak aracılı olan ve periodontal ataşman kaybı ile sonuçlanan iltihaptır. Bu periodontal ataşman kaybı, mine-sement seviyesi (MSS) referans alınarak, sürmüş dişlerin etrafında standart periodontal sonda ile çevresel sondalama yapılarak tespit edilmektedir[241].

Periodontitis için, periodontitis hastalığının gelişim süreci değil de başka nedenlerle yıkım görülen hastalıkları elemek adına ön koşullar getirilmiştir[241].

Periodontitis Tanısı Ön Koşulları;

- Komşu olmayan en az iki veya daha fazla dişin ara yüzünde ≥2 mm ataşman kaybı olması (Ör: Dolgular arasında temas noktası iyi ayarlanmadığında besin gömülmesi olabilmektedir, bunları elemek adına bu ön koşul getirilmiştir)
- İki veya daha fazla dişin lingual veya bukkalinde ≥3 mm klinik ataşman kaybına eşlik eden 3mm yi aşan sondalama derinliği varlığı (Ör: Dişin yalnızca bir yüzünde görülen dişeti çekilmelerini periodontitis olarak sınıflamamak adına getirilmiştir)

2017 Dünya Çalıştayı verilerine göre Periodontitis Türleri;

- Nekrotizan Periodontitis

- Sistemik hastalığın bulgusu olan periodontal yıkım (Plağa bağlı olarak gelişen değil sistemik olarak başlamış olan yıkım türü)
- Periodontitis

olarak sınıflandırılmıştır.[242]

Periodontitis tanısında istisnalar;

- Travma nedeniyle çekilen dişeti
- Subgingival sonlanan çürük kavitesi
- İkinci büyük azının distalinde komşu 20 yaş dişinin konumundan veya çekiminden kaynaklanan klinik ataşman kaybı
- Dişeti kenarından drene olan endodontik lezyon
- Vertikal kök kırığından kaynaklanan sorunlar

Periodontitis olarak nitelendirilmemektedir.[243]

Bu sınıflamaya göre, gerçekten periodontal yıkımdan (dental plak + plağın uzaklaştırılmaması ve konak yanıtının bununla başa çıkamaması gibi hastalıklardan) söz ettiğimiz periodontal hastalıklarla, tesadüfi hastalıkların ayrımı yapılmaktadır.

Periodontitis sınıflamasında, kanser sınıflamasından örnek alınarak evre ve derecelendirmeye geçilmiştir[241]. Buna göre

EVRE: (I-IV) arasında skorlanmıştır. Hastalığın yapmış olduğu hasarın boyutunu belirtmektedir.

DERECE: (A-C) olarak kodlanmıştır. Hastalığın ve tedavinin seyrini etkileyebilecek unsurları belirtmektedir.

PERIODONTITIS EVRESİ		EVRE I	EVRE II	EVRE III	EVRE IV
ŞİDDETİ (Severity)	En fazla kaybın olduğu dişte interdental KAK	1-2mm	3-4mm	≥5mm	≥5mm
	Radyografik Kemik Kaybı	Koronal 1/3 (< %15)	Koronal 1/3 (%15 - %33)	Kökün yarısından fazla	Kökün yarısından fazla
	Diş Kaybı	Periodontal hastalık kaynaklı diş kaybı YOK		Periodontitise bağlı ≤4 diş kaybı	Periodontitise bağlı ≥5 diş kaybı
KARMAŞIKLIK ZORLUK (Complexity)	Lokal	Cep derinliği maksimum ≤4mm Çoğunlukla horizontal kemik kaybı	Cep derinliği maksimum ≤5mm Çoğunlukla horizontal kemik kaybı	EVRE II karmaşıklığına ek olarak: • Cep derinliği ≥ 6mm • Vertikal kemik kaybı ≥3mm • Furkasyon katılımı Sınıf II veya III • Orta düzeyde kemik defekti	EVRE III karmaşıklığına ek olarak: İleri bir rehabilitasyona ihtiyaç sebebi olarak: • Çiğneme fonksiyon bozukluğu • İkincil oklüzal travma • (Diş mobilitesi ≥2) • İleri düzeyda kemik defekti • Dikey boyut değişimi, dişlerde uzama, yer değiştirme mevcut • Diş sayısı 20den az (10 karşıt çift)
KAPSAM VE DAĞILIM (Extent and Distribution)	Tanımlayıcı olarak Evre'ye ek	Her EVRE için, kapsamını: -Lokalize (Dişlerin <%30u etkilenmişse), -Generalize(Dişlerin ≥%30u etkilenmişse), -Molar/kesici modeli olarak tanımlayınız.			

Tablo 2. Periodontitis Evrelerinin (I-IV) gösterimi.

Evre I ve Evre II daha erken dönem Periodontitisi belirtirken Evre III ve Evre IV geç dönem Periodontitisi belirtmektedir.

1-2mmlik ataşman kaybını fark etmek zordur. Evre I ve Evre II benzerdir. Ataşman kaybı miktarı ile ayrılır.

Evre III ve Evre IV ayrımı ise diş kaybı miktarı ile yani çiğneme fonksiyonunda yaşanan kayıp ile yapılmaktadır.

PERİODONTİTİS DERECESİ			DERECE A: Yavaş hızda ilerleyen hastalık	DERECE B: Orta hızda ilerleyen hastalık	DERECE C: Hızlı İlerleyen hastalık
Primer Kriter	İlerleme hızının direkt belirteci	Longitudinal Veri (Radyografik kemik kaybı veya KAK	Son 5 yıl içinde kayıp olmaması	Son 5 yıl içerisinde <2mm kayıp olması	Son 5 yıl içerisinde ≥2mm kayıp olması
	İlerleme hızının indirekt belirteci	%Kemik kaybı /yaş	<0.25	0.25 - 1.0	>1.0
		Olgu Fenotipi	Yoğun Plak birikimi Az hasar	Plak birikimi ile orantılı hasar	Plak birikimi ile orantısız düzeyde fazla hasar. Hastalığın hızlı ilerlediğini ve / veya erken başlangıç dönemini düşündüren spesifik klinik modeller (ör: molar/kesici modeli; standart bakteri kontrolü sağlanan tedavilerde beklenen cevabın alınmaması)
Derece Değişkenleri	Risk Faktörleri	Sigara	Sigara kullanmayan	<10 Sigara kullanımı/Gün	≥10 Sigara kullanımı/Gün
Kapsam ve Dağılım		Diabet	Normoglisemik/Diabet teşhisi yok	Diabetli hastada HbA1C < %7.0	Diabetli hastada HbA1C ≥ %7.0

Tablo 3. Periodontitis derecelendirmesinin (A-C) gösterimi

Derecelendirmede hasardan ziyade hasarın nasıl ortaya çıktığı, hangi hızda ortaya çıktığı faktörleri değerlendirilmektedir. Bu faktörler bizlere engel oluşturacağından tedavi güçlüğünü etkilemektedir[241].

Dişeti Oluğu Sıvısı

Dişeti sürekli olarak mekanik ve bakteriyel iritasyonlarla karşı karşıyadır, özellikle de oral kavitede kolonize olan mikroorganizmalar konak dokuları için sürekli bir tehdit unsuru oluştururlar. Sağlıklı bir ağızda konak defans mekanizmaları mikroorganizmaların saldırılarını göğüsler ve onları zararsız hale getirmeye çalışır, ancak herhangi bir sahada mikroorganizmalar bu defansı aşmayı başarırlarsa doku hasarına neden olabilecek bir enfeksiyonun gelişmesi kaçınılmaz olmaktadır.

Konağın savunması çeşitli seviyelerde etkindir. Mikroorganizmalara karşı ilk etkin defans epitel yüzeyi, tükürük ve lokal konak yanıtın ilk basamakları ile olmaktadır. Epitelin rolü genellikle müköz membranların bütünlüğü, epitelyal hücrelerin deskuamasyonu, keratinizasyon derecesi ve turnover hızı ile ilgilidir. Bunun yanısıra bağlantı epitel permeabilitesi, DOS, tükürük akışı ve tükürükteki çeşitli maddeler de savunmada etkilidirler. Ayrıca mukozal yüzeyin bütünlüğü bozulduğunda vücut sıvılarının çeşitli elemanları ve fagositik hücreler de ek savunma desteği sağlamaktadırlar. Ancak dentogingival sahada durum biraz daha farklıdır ve konak

defansına daha yüksek oranda ihtiyaç söz konusudur. Bunun da en temel nedenini gingival epitelyal tabakanın zaten dişler tarafından delinmiş olması teşkil etmektedir. Bu durum başka hiçbir bölgede olmayan hassas morfolojik bir özelliğin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dişler ve yumuşak doku arasındaki bağlantı epiteli oldukça hassas ve mikrobiyal saldırılardan kolayca etkilenebilir özelliğe sahiptir[244].

Dişler üzerine kolonize olan bakterilere karşı gelişen defans mekanizmalarının ilki gingival marjindeki damarların genişlemesidir. Bu durumu vasküler permeabilite artışı, dişeti sıvısının eksüdasyonu ve gingival sulkusa polimorfonükleer lökositler (PMNL)'in epitelyal transmigrasyonu takip etmektedir ve doku iltihapsal hale gelmektedir.

Özellikle iltihap başladığında gingival sulkustan çıkan DOS kan serumunda mevcut bulunan hemen hemen tüm maddeleri içermektedir, ancak maddeler burada daha düşük konsantrasyonlardadır. DOS un kompleman sisteminin elemanlarını ve spesifik antikorları içerdiği de bilinmektedir. Bu antikorların bir bölümü kan plazmasından diğer bir bölümü ise lokal olarak cebin yumuşak duvarındaki plazma hücreleri tarafından yapılmaktadır. Ayrıca DOS'un tek yönlü akışı sürekli bir yıkama sağlamaktadır.

Dişeti oluk sıvısının varlığı 19.yüzyıldan beri bilinmektedir. İçeriği ve lokal defans mekanizmalarındaki rolü 1950'li yıllarda Waerhaug, Brill ve Krasse'nin yaptıkları bir dizi çalışma sonucunda ortaya konmuştur[245].

1958'de Brill ve Krasse köpeklerde öncelikle intramüsküler olarak florasan madde verilmesini takiben 3 dakika sonunda filtre kağıtları ile oluk sıvısı toplamışlar ve toplanan oluk sıvısında florasan madde varlığı göstermişlerdir. Böylece kan akımından doku içerisine ve dişeti oluğuna doğru bir akışın olduğunu belirtmişlerdir[246].

Brill daha sonra insanlarda da oluk sıvısının varlığını ortaya koymuş ve bu sıvının fizyolojik olarak oluşan normal bir sıvı (transüda) olduğunu belirtirken, diğer araştırıcılar DOS'un iltihapsal bir sıvı olduğunu öne sürmüşlerdir. Günümüz bilgileri dahilinde sağlıklı dişetinde oluk sıvısı ya yoktur ya da çok azdır. Daha sonraları periodontal hastalığın incelenmesine yönelik çeşitli testlerin geliştirilmesi ile birlikte dişeti oluk sıvısının içeriği, kaynağı ve fonksiyonlarını ortaya koymaya yönelik birçok araştırma yapılmıştır[247].

DOS toplamada belirlenmiş başlıca üç yöntem mevcuttur:

I. Kapiller tüp yöntemi (Mikropipet): Bu yöntemde belirli çap ve uzunluğa sahip tüpler dişeti oluğuna konumlandırılır ve sıvı aspire edilmeye çalışılır. Tüp, dişeti oluğuna konumlandırılarak, tüpün 2–4 kez mezial ve distal yöne hareket ettirilmesi ve bu sırada aspirasyon yapılması önerilmiştir[248]. Periodontal hastalıklı bireylerde hacmi artan DOS bu yöntem ile seyreltilmemiş olarak elde edilebilmektedir. Fakat sağlıklı dişetinde sıvının elde edilmesi oldukça zor olabilmektedir.

II. Dişeti Oluğu Yıkama Yöntemi: Bu yöntemde, dişeti oluğu bilinen özellikte ve miktarda bir sıvı ile yıkanaraksıvı geri toplanmaktadır, seyreltilmiş DOS elde edilmiş olur. Bu teknikte örnekleme bölgesi pamuk rulolar ile izole edilerek özel solüsyonlarla yıkanır ve bir mikro şırınga aracılığıyla DOS ve bölgeye verilen sıvı geri kazanılır[249].

III. Kağıt şerit yöntemi: Bu yöntemde dişeti oluğuna farklı şekillerde konumlandırılan kağıt şeritler kullanılmaktadır. Günümüzde sıkça bu yöntem kullanılmaktadır. Yöntem oluk dışı ve oluk içi olarak ikiye ayrılmaktadır. Oluk dışı yöntemde, kağıt şerit genelde dişin bukkal yüzeyinde oluk girişine yakın şekilde konumlandırılmaktadır[250]. Bu yöntemde örnekleme süresi uzun ve elde edilen sıvı miktarı azdır. Kontaminasyon riski vardır. Oluk içi yöntemler de kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan biri derin oluk içi yöntemdir, kağıt şerit oluk içinde tabanda direnç hissedilene kadar ilerletilmektedir[251]. Diğer oluk içi yöntem olan sığ oluk içi yöntemde ise kağıt şeritler sulkus girişine (yaklaşık 1 mm derinliğe) konumlandırılmaktadır[249].

Henüz standart veya ideal DOS örnekleme süresi saptanamamıştır. Örnekleme süreleri literatürde 3 saniye ve 3 dakika aralığında değişkenlik gösterdiği gibi görsel olarak belirli DOS miktarı elde edildiği görülene kadar örneklemenin devam ettirildiğiçalışmalar da mevcuttur.

Yöntemlere bakıldığında mikropipet yönteminde küçük hacimli sıvıların elde edilmesi esnasında kapiller tüplerin bölgede uzun zaman konumlandırılması gerekliliği ve diğer yöntemlere oranla travma oluşturma riski mevcuttur. Dişeti oluğu yıkama yönteminde ise sıvının yıkama sonrası tam olarak elde edilmesi mümkün olmayabilmekte ve DOS hacmi ve içeriği doğru olarak ölçülemeyebilmektedir. Kağıt şeritlerin sulkus içine yerleştirilmesinde ve ilerletilmesinde epitele zarar verilebileceği, sıvının eksuda özelliğindeki akışını tetikleyebileceği ileri sürülmektedir. Oluk içi yönteminde dento-gingival damarlardaki geçirgenlik reaksiyonlarının daha iyi ortaya koyulabileceği

yönünde bilgi de mevcuttur. Burada süre ve yerleştirme derinliği mekanik irritasyon ve kontaminasyon riski açısından önemlidir.

2.6. Tükürük

İnsan tükürüğü, noninvaziv ve tekrarlı örneklemeye yatkınlığı, toplama ve işleme kolaylığı ve tekli analit veya metabolomik ölçümler için uygunluğu nedeniyle biyobelirteç araştırmaları için giderek daha çok kullanılmaktadır. OS nin tükürük biyobelirteçleri lokal ve sistemik patolojileri yansıtmaktadır ve çok sayıda hastalığın teşhisi, prognozu ve tedavi duyarlılığı hakkında bilgi verebilmektedir. Bununla birlikte, araştırılan hastalıkların birçoğu için tükürük redoks homeostazındaki değişikliklere ilişkin veri raporları genellikle çalışmalar arasında oldukça çelişkilidir[252].

Tükürük, %99u sudan oluşan ekzokrin bir sıvıdır. Kalan %1, çeşitli elektrolitler ve proteinlerden oluşmaktadır. Bunlar, tükürüğe atfedilen çeşitli işlevlerden sorumludur.

Tükürük birincil olarak (yaklaşık %90) üç çift ana tükürük bezinin, submandibuler (yaklaşık %65), parotis (yaklaşık %20) ve dil altı (yaklaşık %5-7) salgılarından oluşmaktadır. Bu bezler otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Kalan tükürük(<% 10) ise ağız boşluğu etrafına dağılan küçük bezler (labial, lingual, bukkal ve palatinal) tarafından üretilmektedir.

Dinlenirken, eksojen veya farmakolojik uyarı olmadan, ağız dokularını örten, nemlendiren ve yağlayan bir film tabakası şeklinde mevcut olan az miktarda, sürekli bir tükürük akışı, uyarılmamış bir salgı mevcuttur. Dinlenme halindeki bu tükürük akışı sağlıklı kişilerde dakikada 0,4-0,5 mL civarındadır[253].

Tanı aracı olarak tükürük, kokain, etanol ve MDMA dahil olmak üzere en az 24 ilacı saptamada HIV, hepatit C ve insan papilloma virüsü gibi virüslerin araştırılmasında ve genetik analiz için kullanılmaktadır[254].

Tükürük homojen bir sıvı değildir. Genomik, epigenomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve mikrobiyomik, tükürük araştırmalarını oluşturan anahtar bileşenlerdir.

Tükürük örneği kaynağına göre bütün (tam) tükürük ve spesifik glandüler tükürük olarak ikiye ayrılmaktadır. Tükürük salgısının uyarılmasına göre ise uyarılmış tükürük ve uyarılmamış/pasif tükürük şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Salgılanan tükürüğün kalitesini ve miktarını etkileyen çeşitli faktörler olması nedeniyle tükürük toplama yöntemlerini standartlaştırmak önemlidir. Her bezin salgıladığı tükürük kendine has özelliklere sahiptir. Protein içeriği türünde ve iyonik içerikte farklılıklar gözlenmektedir. Örneğin Sistatin C, tüm submandibuler sıvılarda bulunduğu ancak sublingual beze özgü tükürükte saptanmadığı için submandibuler tükürük bezi seçici protein olarak bulunan bir biyobelirteçtir. Diğer yandan MUC5B müsin ve kalgranülin B ise sublingual seçici proteinlerdir.

Tükürüğün bileşimi, bazal veya uyarılmış olmasına göre değişmektedir. Düşük seviyelerde organik ve inorganik bileşiklerle parasempatik uyarımı takiben yüksek tükürük akışı bildirilmiştir.

Sempatik stimülasyonu takiben protein ve K^+ bakımından zengin az miktarda tükürük görülmektedir. Tükürük bileşimi ayrıca ağızda yiyecek varlığından da etkilenmektedir. Yemekten sonra tükürükteki toplam protein ve α-amilazın arttığı görülmüştür[255].

Bütün tükürük

Bütün tükürük, esas olarak su ve epitel hücreleri, mikroplar ve bunların ürünleri ile birlikte tüm bezlerden çeşitli konsantrasyonlarda tükürük salgılarının bir karışımından oluşmaktadır[256].

Tüm ağız ortamının bir temsili olan bütün tükürük, tükürük örneği toplamanın en kolay, uygulanabilir ve en uygun şeklidir. Personelin ek eğitimine gerek yoktur ve hatta çalışma katılımcısı tarafından toplanabilmektedir.

Tüm tükürük, uyarılmamış veya uyarılmış olabilmektedir. Uyarılmamış tüm tükürük, pasif tükürük veya tükürme yoluyla toplanabilmektedir, ancak tükürme yöntemi sırasında kan ve balgam kontaminasyonunu önlemek için özen gösterilmelidir. Araştırmalar, tükürük örnekleme yönteminin, pasif tükürük yoluyla toplanandan 14 kat daha fazla bakteri içerdiğini göstermektedir. Bu, numunenin depolanmasını ve daha fazla analiz edilmesini etkileyebilmektedir.

Uyarılmış tükürük

Tükürük üretmekte güçlük çeken hastalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem spesifik olarak salgı bezine elle masaj yapılarak veya parafin mumu, sakız veya steril pamuk ruloları çiğneme eylemi ile tükürük üretimini indüklemektedir. Bu tür bir indüksiyon genellikle tükürüğün miktarını ve pH'ını etkilemektedir[256]

.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Şubat 2019 tarihli 2019/12 dosya nolu ve 371 sayılı İstanbul Üniversitesi Klinik Çalışmalar Yerel Etik Kurulu izniyle gerçekleştirilmiştir. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş olan bireyler arasından çalışma kriterlerine uygun toplam 59 gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir.

Bireyler çalışmanın hedefi ve uygulanacak yöntem konusunda bilgilendirilerek bilgilendirilmiş onamları yazılı olarak alınmıştır.

2.7. Çalışma planı

Çalışmaya dahil edilen bireylerden; kişisel bilgileri (yaş, eğitim düzeyi, medeni durum, sosyo-ekonomik düzey vs.), medikal anamnezi, diş hekimine gitme sıklığı, diş fırçalama ve olumsuz alışkanlıkları özel hazırlanan anamnez formuna kayıt edilmiştir. Sistemik ve oral anamnezin ayrıntılı olarak kaydedilmesini takiben hastaların klinik muayeneleri ve periodontal ölçümleri yapılmıştır, bunu takiben örneklerin etkilenmemesi adına ayrı bir seansta, tüm hastalardan sabah erken saatlerde aç karnına tükürük ve DOS örnekleri alınmıştır.

Tükürük örneklerinde Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Il-1β, TNF-α, HIF-1α, TAS, TOS ölçümleri yapılmıştır.

DOS örneklerinde ise Luminol ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile reaktif oksijen moleküllerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.7.1. Çalışma gruplarının tanımlanması

Çalışma grubu; İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş olan 18 - 45 yaş arasındaki, sistemik olarak sağlıklı, 2017 sınıflamasına göre Evre III ve Evre IV, Derece C Periodontitis[241] teşhisi koyulmuş bireylerden oluşmaktadır. Çalışma grubuna toplam 30 birey dahil edilmiştir.

Kontrol grubu; İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş olan 18 - 45 yaş arasındaki, sistemik ve periodontal olarak sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Kontrol grubuna toplam 29 birey dahil edilmiştir.

Çalışmaya, periodontitise bağlı diş kaybı 4 ve üzeri olan ve radyografik kemik kaybının en fazla olduğu dişte, kemik kaybının dişin kökünün uzunluğuna yüzdesi/ yaş formülüne göre >1.0 olan bireyler dahil edilmiştir. Bu kriterlere göre, çalışma grubu Evre III ve Evre IV, Derece C periodontitise sahip bireylerden oluşmaktadır.

2.7.1.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. 1.molar ve kesicilerde ataşman kaybı ile kemik yıkımı olması
2. Ailesel olarak periodontal hastalık hikayesi olması
3. Bireyin 18-45 yaş aralığında olması
4. Bireyin herhangi bir sistemik hastalığının bulunmaması
5. Son 6 ay içinde antiinflamatuar, oral kontraseptif, antibiyotik ve immün

   Sistemi veya iltihapsal yanıtı etkileyebilecek (immunsupresif) ilaç kullanmamış olması.
6. Son 6 ay içinde periodontal tedavi uygulanmamış olması.
7. Düzenli olarak kullanılan herhangi bir ilaç bulunmaması.
8. Bireyin en az 10 dişe sahip olması

2.7.1.2. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

1. Sistemik hastalığa sahip bireyler
2. Çalışma döneminde iltihapsal yanıtı etkileyebilecek ilaç kullanılmış olması
3. Bireyin tedavi ve kontrol randevularına uymaması
4. Hareketli protez kullanımı
5. Çalışma döneminde sistemik hastalık teşhisi koyulması
6. Gebelik ve/veya laktasyon döneminde olmak

2.7.2. Tükürük Örneklerinin toplanması

Tükürük örnekleri, belirteçlerin seviyeleri üzerinde sirkadiyan ritminin etkisini azaltmak için klinik ölçümlerden bağımsız olarak ayrı bir seansta alınmıştır. Örnekler sabahın erken saatlerinde ve aç karnına alınmıştır. Navazesh tarafından tanımlanmış yöntemle hastalardan falcon tüplerine 5-10 dk boyunca stimülasyon olmadan tükürmeleri istenmiştir[257].Örnekler ependorf tüplerine aktarılarak analiz gününe kadar -80˚C'de saklanmıştır.

2.7.3. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin toplanması

DOS örnekleri, klinik ölçümlerden ayrı bir seansta tükürük örnekleri alındıktan hemen sonra alınmıştır. Dişeti oluğuna yerleştirilen kağıt şerit (Periopaper ®, Proflow Inc., Amitiyville, NY, USA) örnekleri laboratuvar incelemesi için seçilmiş ve ependorf tüplerine alınmıştır.

DOS örneklerinin alınması için tek köklü dişler tercih edilmiş ve her dişin mesiobukkal veya distobukkal yüzeyi kullanılmıştır. DOS örnekleri elde edilirken bölge, pamuk tamponlarla izole edilip, tükürük kontaminasyonu engellenerek ekartasyon sağlanıp hava spreyi ile 20 cm uzaklıktan dik açı ile kısa süreli kurutma işlemi yapılmıştır.

2x8mm standardize edilmiş kağıt şeritler (Periopaper ®, Proflow Inc., Amitiyville, NY, USA), bukkal serbest dişeti kenarından cep içerisine yerleştirilmiş ve 30 saniye süre ile bekletildikten sonra her bir kağıt şerit ayrı ependorf tüpüne konularak analiz gününe kadar -80˚C'de saklanmıştır. Her hastada 6 dişten örnek alınmıştır.

2.7.4. Periodontal Ölçümler

Periodontal durum tespiti için her dişte 6 noktadan olacak şekilde (bukkal:mesial, orta, distal; palatinal/lingual:mesial, orta, distal) Sillness&Loe Plak İndeksi(PI)[258], Loe&Sillness Gingival İndeks(GI)[259], Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD)[260] ölçümü, Klinik Ataşman Düzeyi (KAD)[260] ölçümü ve Sondalamada Kanama (SK)[261] yüzdesi ölçümleri elde edilmiştir. Ayrıca dişlerin mobilite[262] düzeyleri kaydedilmiştir.

Tüm periodontal ölçümler ucunun çapı 0,5mm olan Williams tipi Periodontal Sonda (Hu-Friedy, ABD) kullanılarak tüm ağızda gerçekleştirilmiştir.

2.7.4.1. Plak İndeksi (PI, Silness & Löe 1964)

Dişeti kenarı boyunca uzanan plağın varlığı belirlenmiştir. 4 derecelendirmesi vardır.

0- Plak yok

1- Dişeti kenarına yakın çok ince, çıplak gözle tespit edilemeyen ancak sonda ile kazınınca görünen plak.

2- Dişeti kenarında orta derecede, gözle tespit edilebilen ancak interdental bölgeye uzanmayan plak varlığı.

3- Dişeti kenarı ve interdental bölgede yoğun plak varlığı.

2.7.4.2. Gingival İndeks (GI, Löe & Silness 1964)

Periodontal sonda, dişeti kenarı boyunca hafif bir basınçla dokunularak gezdirilerek 30 saniye beklenir. Dişetinin iltihabı, rengi, kanaması değerlendirilir. 4 derecelendirmesi vardır:

0- Normal dişeti, iltihap, kanama ve renk değişikliği yok.

1- Az iltihap, çok az renk değişkliği, dişeti yüzeyinde az değişiklik, kanama yok

2- Orta derecede iltihap, eritem, şişlik, sondalama veya basınçla kanama.

3- İleri iltihap, ciddi eritem ve şişlik, spontan kanamaya meyil, ülserasyon.

2.7.4.3. Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD) Ölçümü

Periodontal sonda dişin uzun aksına paralel şekilde tutularak hafif bir kuvvet ile serbest dişeti kenarı ve cep tabanı arasındaki mesafe yani cep derinliği kaydedilmiştir. SCD ölçümleri periodontal sonda üzerindeki en yakın işaretli milimetreye yuvarlanmıştır.

2.7.4.4. Sondalamada Kanama (SK) Yüzdesi (Ainamo J, Bay I,1975)

Her diş sondalanmış ve sondalanabilir cep derinliği tayin edilmiştir. SCD ölçümü sonrası ölçülen her bölge için Sondalamada Kanama, kanama olan bölgelerde (+) veya

kanama olmayan bölgelerde (-) şeklinde kaydedilmiştir. Her hasta için ortalama kanama yüzdesi hesaplanmıştır.

2.7.4.5. Klinik Ataşman Düzeyi (KAD)

Klinik ataşman düzeyi, mine sement çizgisinden cep tabanına olan mesafenin ölçülmesiyle elde edilmiştir. KAD ölçümleri periodontal sonda üzerindeki en yakın işaretli milimetreye yuvarlanmıştır.

2.7.4.6. Mobilite (Miller)

Mobilitesi bulunan dişler kaydedilmiştir. Yatay mobilite ölçülürken; iki el aletinin sap kısımları dişin bukkal ve lingual/palatinal yüzüne yerleştirilip dişe bu yönlerde kuvvet uygulanır. Dişin fasiyolingual yönde göstermiş olduğu toplam hareketlilik, mobilite değerini vermektedir.

Dikey mobiliteyi saptamak için tek alet kullanılarak aletin sap kısmı dişin oklüzaline dik gelecek şekilde yerleştirilir. Mobilite derecelendirmesi:

0: Fizyolojik sınırlarda mobil diş (Kuvvet uygulandığında 0.2 mm'yi geçmeyen hareket)

1: derecede mobilite gösteren diş (1mm'den daha az hareket)

2: Orta derecede mobil olan diş (1-2mm arası)

3: Şiddetli mobilitesi mevcut diş. Dikey mobilite mevcut olabilir.

şeklindedir.

2.8. Biyokimyasal Belirteçlerin Değerlendirme Yöntemleri

2.8.1. Tükürük Örneklerinin Değerlendirilmesi

Analiz gününe kadar -80 ˚C de bekleyen hasta ve kontrol gruplarının tükürük örneklerinde Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, IL-1β ve TNF-α (Invitrogen, Viyana, Avusturya), TAS ve TOS düzeyleri (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) ticari olarak sağlanan kitler aracılığı ile ELISA yöntemi kullanılarak, önerilen çalışma yöntemine bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

Kaspaz 9 Düzeyinin Belirlenmesi

Kaspaz 9 ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0 ve 100.0 ng/ml standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Test içi CV % 6.6, testler arası CV % 9.0 olarak belirlenmiştir.

Kaspaz 3 Düzeyinin Belirlenmesi:

Kaspaz 3 ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 ve 10.0 ng/ml standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Test içi CV % 7.7, testler arası CV % 5.4 olarak belirlenmiştir.

Kaspaz 8 Düzeyinin Belirlenmesi:

Kaspaz 8 ölçümü kontrol ve hasta tükürük örneklerinde 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 ve 10.0 ng/m standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde tayin edilmiştir. Test içi CV % 6.7, testler arası CV % 8.5 olarak belirlenmiştir.

HIF- 1α Düzeyinin Belirlenmesi:

HIF- 1α ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 81.92, 204.8, 512, 1280, 3200, 8000 ve 20000 pg/mL standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 550 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Test içi CV < % 10, testler arası CV < % 10 olarak belirlenmiştir.

IL-1β Düzeyinin Belirlenmesi:

IL-1β ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0 ve 250.0 pg/mL standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Test içi CV % 5.1, testler arası CV % 8.6 olarak belirlenmiştir.

TNF- α Düzeyinin Belirlenmesi:

TNF-α ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 ve 500.0 pg/mL standart konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga

boyu 450 nm, referans dalga boyu 620 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Test içi CV % 6.0, testler arası CV % 7.4 olarak belirlenmiştir.

TAS Ölçümü Belirlenmesi:

TAS ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 1mmol/L standart konsantrasyon ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 660 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Sonuçlar belirlenen formül ile hesaplanmıştır. Test içi CV % 3.3, testler arası CV % 2.8 olarak belirlenmiştir.

TAS (mmol/L) = (ΔAbs Std1-ΔAbs Örnek) / (ΔAbs Std1-ΔAbs Örnek) x 20

TOS Ölçümü Belirlenmesi:

TOS ölçümü kontrol ve periodontitis grubu tükürük örneklerinde 10 mmol/L standart konsantrasyon ile karşılaştırılarak, ölçüm dalga boyu 530 nm olacak şekilde düzeyi belirlenmiştir. Sonuçlar belirlenen formül ile hesaplanmıştır. Test içi CV % 3.9, testler arası CV % 3.2 olarak belirlenmiştir.

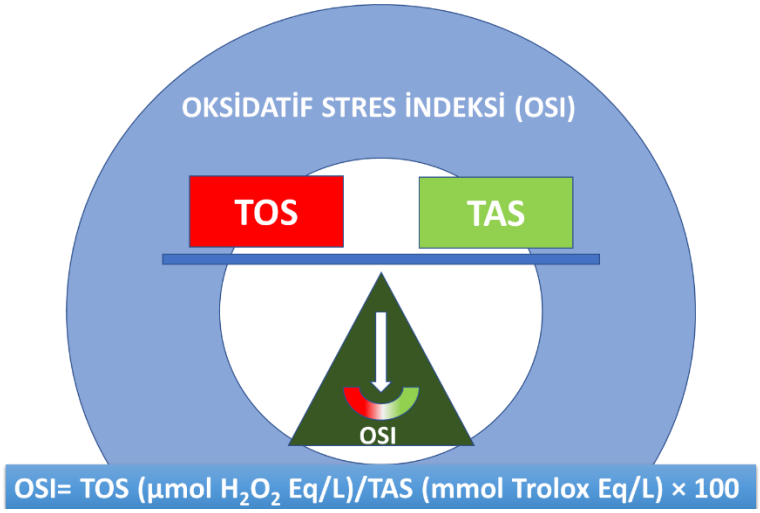
TOS (μmol/L) = (Örnek absorbansı / Standard absorbansı) x 20 (Standard Değeri) (Standard Değeri = 20 μmol H_2O_2Ekiv./L)

OSI Hesaplanması:

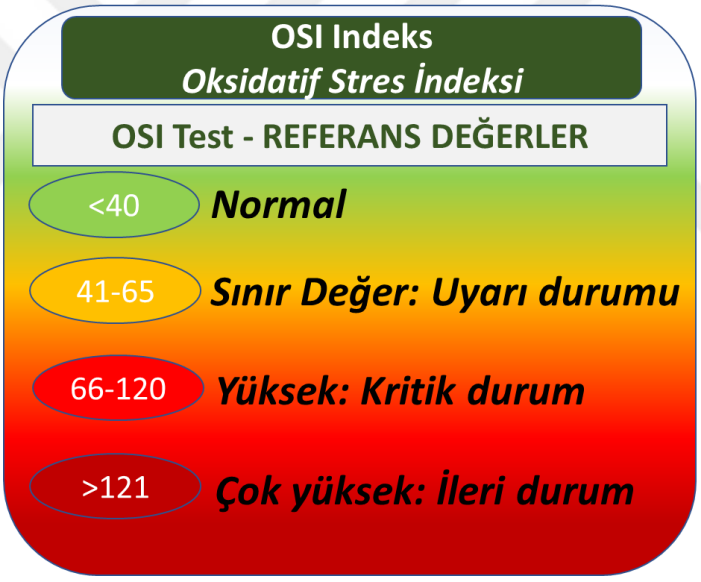
Oksidatif Stres İndeksinin hesaplanması:

Total oksidan seviyenin(TOS) total antioksidan seviyeye(TAS) oranı oksidatif stress indeksi (OSI) olarak kabul edilmiştir. Hesaplama için TAS birimi mmol/L'ye çevrilerek OSI değeri Harma ve ark.nın belirlediği formüle göre hesaplanmaktadır:

OSI (arbitrary unit) = TOS (μmol H_2O_2 Eq/L)/TAS (mmol Trolox Eq/L)



Şekil11. OSI hesaplama formülü.



Şekil12. OSI referans değerleri.

2.8.2. DOS Örneklerinin Değerlendirilmesi

Analiz gününe kadar -80 ˚C de bekleyen DOS örnekleri 1 mL PBS + HEPES (0.5M fosfatla tamponlanmış % 0,9'luk NaCl ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine aktarılmıştır. ROM tespiti Kobayashi ve ark.'nın tanımladığı yöntem kullanılarak minör değişikliklerle kemiluminesans ölçümleri ile yapılmıştır[263].

2.9.2.1 ROM ve antioksidanların in vivo olarak ölçülmesi

Kemilüminesans (KL), ROM oluşumunu tahmin etmek için kullanılan güvenilir bir yöntemdir[264]. Oksidatif metabolizmanın bir yan ürünü olarak ışık üretimini ölçen bu teknik, ROM'un çeşitli hastalıklardaki rolünü göstermek için kullanılmıştır. Luminol ve lusigenin, yaygın olarak kullanılan farklı seçiciliğe sahip KL problarıdır[265].

Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiyon) ve lusigenin (bis-N-metilakridiniumnitrat), sırasıyla 3-aminoftalat ve N-metilakridon oluşturmak üzere ROM gibi oksidanlarla reaksiyona girer. Bu bileşiklerdeki uyarılmış elektronlar, temel durumlarına dönerken, bir sintilasyon sayacının foto-çoğaltıcı tüpleri tarafından tespit edilebilen ışık olarak enerji yayarlar (KL). Düşük seviyeli ışık tespiti için şu anda fotomultiplikatör tüplerine alternatif yoktur.

İki KL probu, luminol ve lusigenin, seçicilik açısından farklılık gösterir. Luminol, H_2O_2, OH, hipoklorit, peroksinitrit ve lipid peroksit radikallerini tespit ederken, lusigenin özellikle süperoksit radikaline duyarlıdır. Bu tekniklerin özgüllüğü önceden belirlenmiştir. ROM salımı, spin yakalama teknikleri, elektron spin rezonansı (ESR) ve kolorimetrik saptamalar dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak da değerlendirilebilmektedir. Fizyolojik koşullarda ESR ile doğrudan ölçüm imkansız değilse de zordur. Spin yakalama teknikleri, bozulmamış organın incelenmesine hemen izin vermemektedir. Kolorimetrik yöntemler daha az duyarlı ve spesifiktir

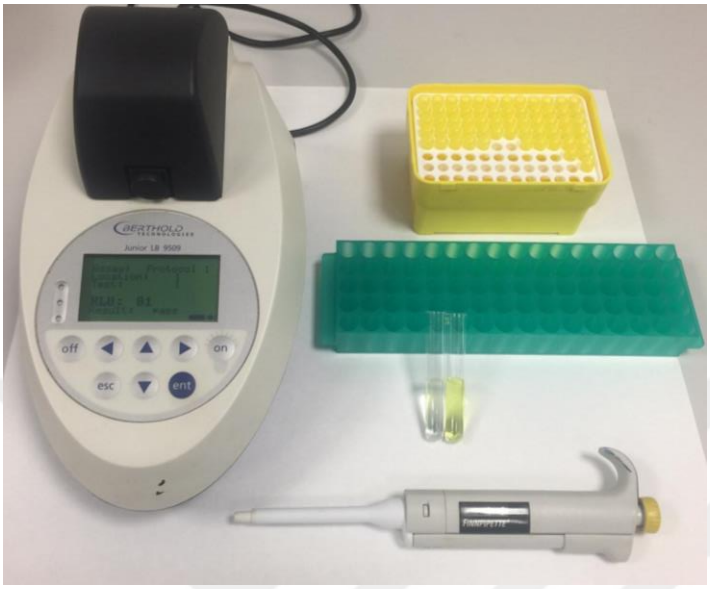
KL ölçümleri luminol ve lusigenin (Final konsantrasyon: 0.2 mM) eklenerek oda sıcaklığında, Mini Lumat LB 9509 (EG&G Berthold, Almanya) luminometrede ölçülmüştür.

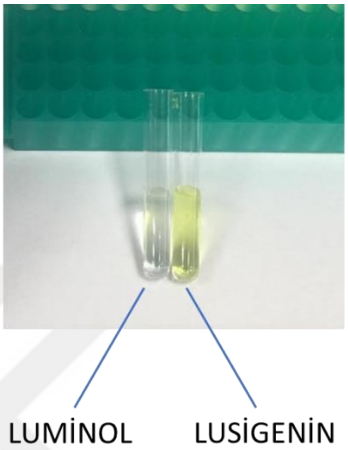
Luminol probu ile seçici olarak hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit radikalleri, lusigenin probu ile süperoksit radikali tayin edilmiştir.

Prob eklenen sayım tüpleri 1 dakikalık aralıklarla 5 dakika süreyle ölçülmüştür. Ölçüm sonunda eğri altında kalan alan (AUC) hesaplanarak reaktif oksijen türleri salınımı, rölatif ışık ünitesi (rlu- relative light units) tayin edilmiştir[266].

Kolajen üzerindeki prolin bölgeleri özellikle hidroksil radikali aracılı bozulmaya eğilimlidir[117] ve kolajen %16 prolin kalıntısı içerdiğinden periodontal ligamentin tip 1 kollajeni oksidatif bozulmaya karşı özellikle duyarlı olabilmektedir[119]. Dolayısıyla

Luminol aracılı KL sonuçlarının yüksek olması olası periodontal ligament hasarı hakkında bilgi edinmemizi sağlayacaktır.





Resim 1. Luminometre(Berthold Junior LB 9509, Almanya).

Resim 2. Luminol ve Lusigenin içeren tüpler.

2.8.3. İstatistiksel değerlendirme yöntemleri

Çalışmamızda gerekli minimum denek sayısını belirlemek adına yapılan güç analizinde tip 1 hata %5, Tip 2 hata %20 ve %80 güç düzeyinde olacak şekilde kabul edildiğinde her bir alt grubun örneklem büyüklüğü 24 olarak tespit edilmiştir. Olabilecek kayıplar düşünülüp grupların 30 kişiden oluşması ve çalışmaya toplam 60 birey dahil edilmesi planlanmıştır. Örneklem sayısı belirlenirken "Macrophage Inflammatory Protein-1α Shows Predictive Value as a Risk Marker for Subjects and Sites Vulnerable to Bone Loss in a Longitudinal Model of Aggressive Periodontitis." seçilmiştir (Fine DH, Markowitz K, Fairlie E, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godboley D, Furgang D, Gunsolley J, Best A. 2014) çalışmasındaki referans değerler dikkate alınarak güç analizi yapılmıştır. Deney grubuna 30 kişi dahil edilirken kontrol grubuna 30 kişi dahil edilmiştir. Ancak çalışma döneminde kontrol grubundaki 1 bireyin sonradan öğrenilen sistemik hastalık varlığı

nedeniyle kişi çalışma dışı bırakılmıştır. Böylece çalışma toplam 59 birey ile tamamlanmıştır.

Klinik parametreler için veriler ortalama ± standard sapma olarak ifade edilmiştir.

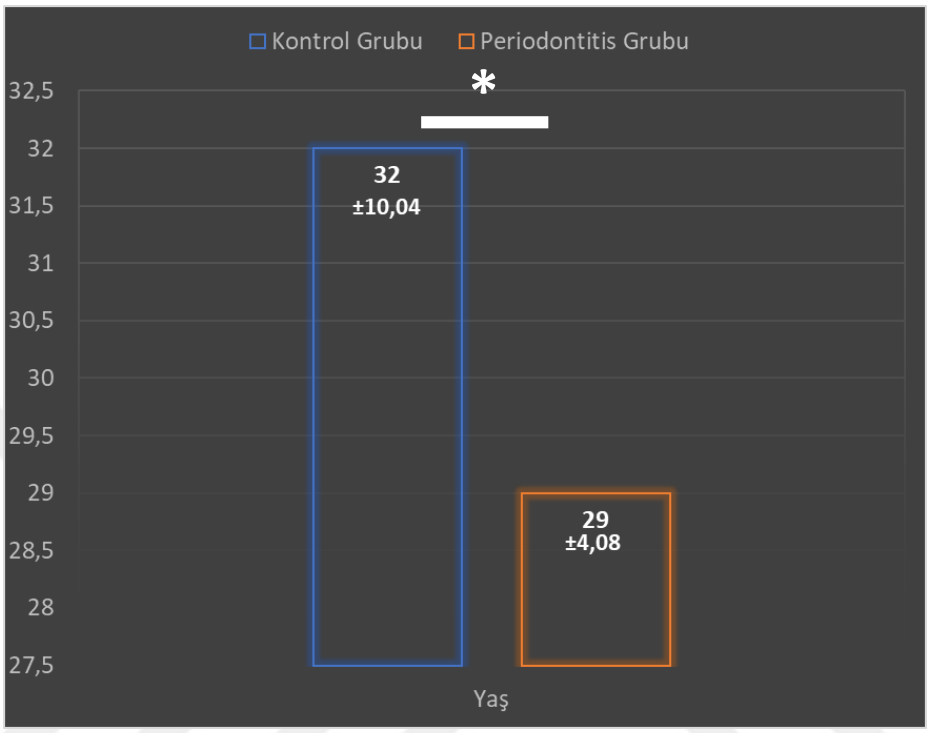
Verinin dağılımını incelemek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. Verinin normal dışı dağılım gösterdiği izlenmiştir. Klinik parametreler ve biyokimyasal bulguların periodontitis ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Klinik ve biyokimyasal değişkenler arasındaki bağlantı ilişkisini incelemek için Pearson Korelasyon Analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmadaki tüm istatistiksel analizler SPSS, v.22.0 istatistik yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (IBM, SPSS Inc., Chicago, IL.) Değerlendirmelerde $p<0.05$ olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Demografik Verilere Ait Bulgular

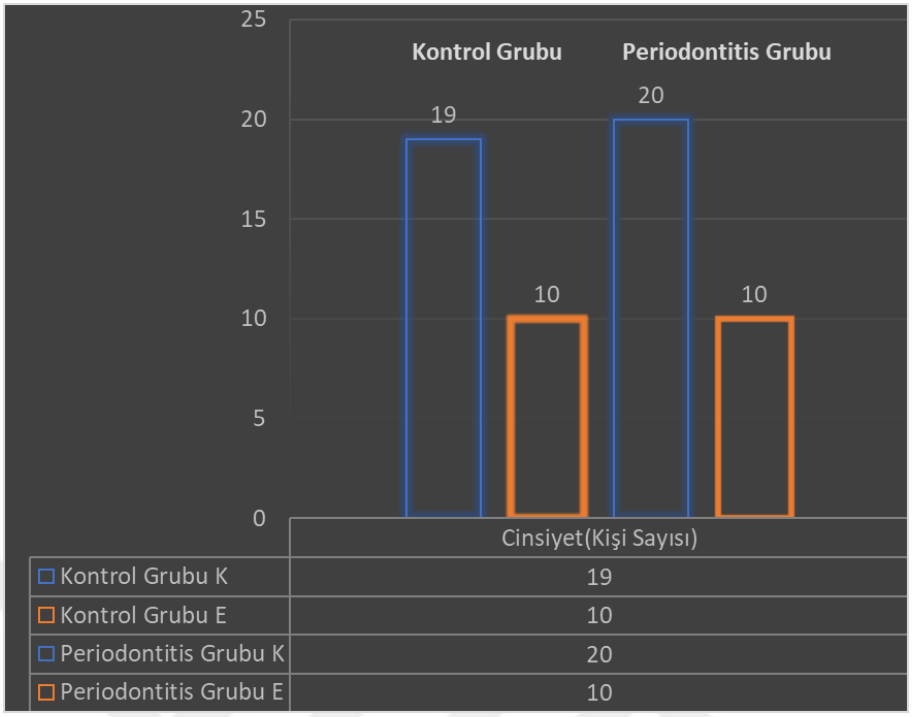
3.1.1. Yaş Bulguları



Şekil 13. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait yaşbulguları (median± standart sapma).

Kontrol grubu ve periodontitis grubu, yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p:0.030).

3.1.2. Cinsiyet Dağılımına ait Bulgular

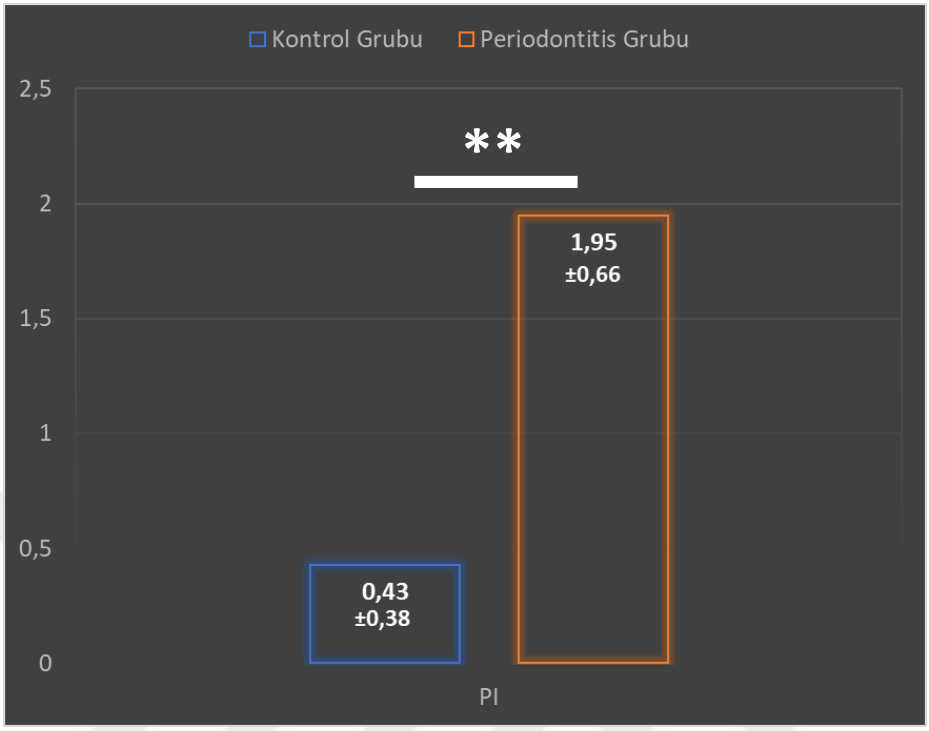


Şekil 14. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait cinsiyetbulguları(kişi sayısı).

Kontrol grubu ve periodontitis grubu, cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3.2. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi

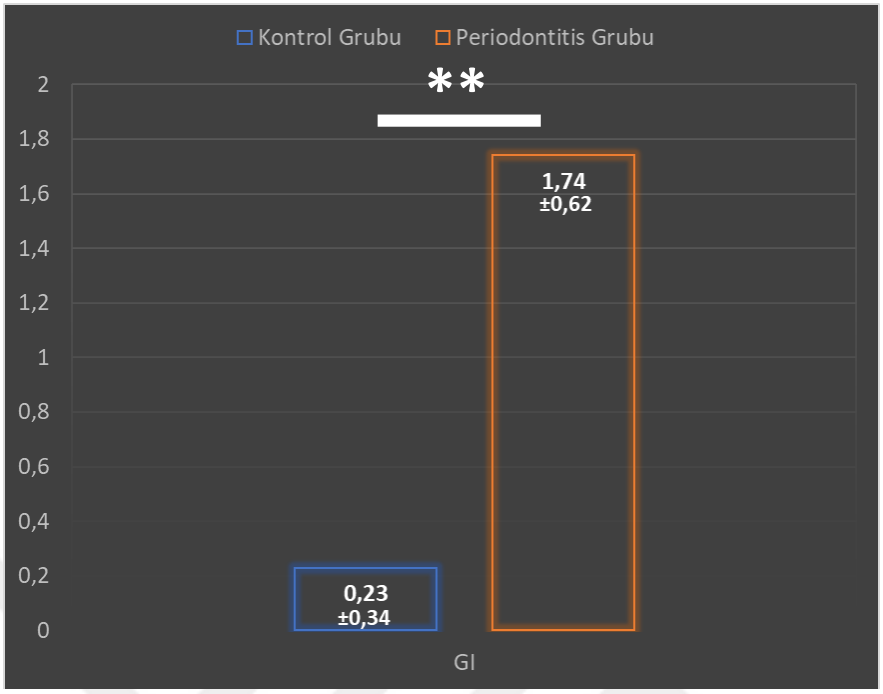
3.2.1. Plak Indeksi (PI) Bulguları



Şekil 15. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait PI bulguları (median± standart sapma).

Plak Indeksi ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur(p:0,000).

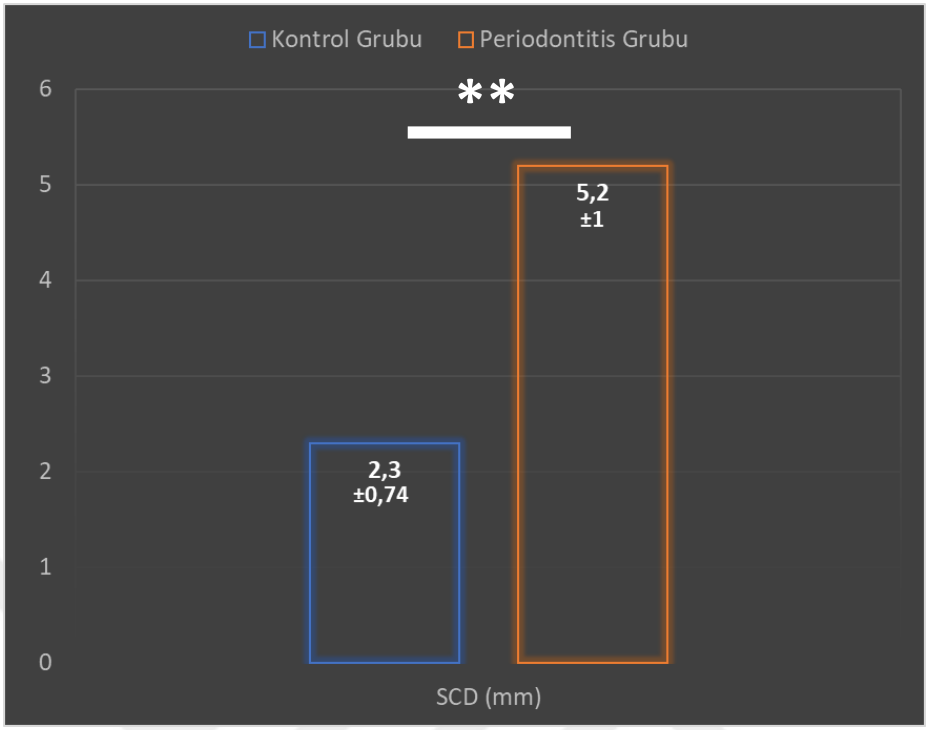
3.2.2. Gingival Indeks (GI) Bulguları



Şekil 16. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait GI bulguları (median± standart sapma).

Gingival Indeks ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur(p:0.000).

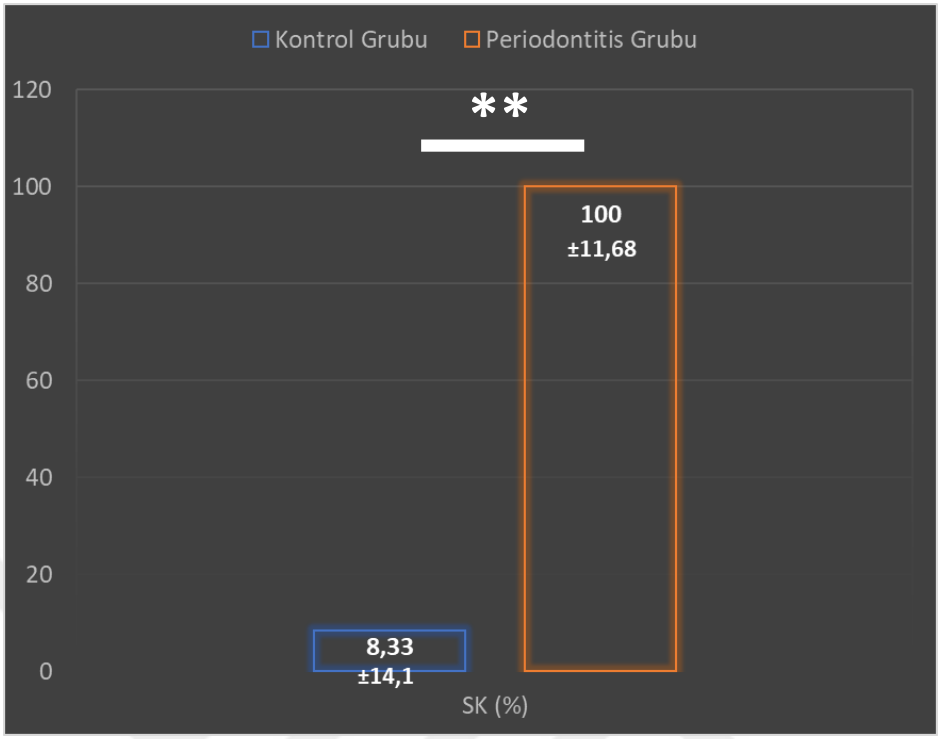
3.2.3. Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD) Bulguları



Şekil 17. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait SCD bulguları (median± standart sapma, mm).

Sondalanabilir Cep Derinliği ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0.000).

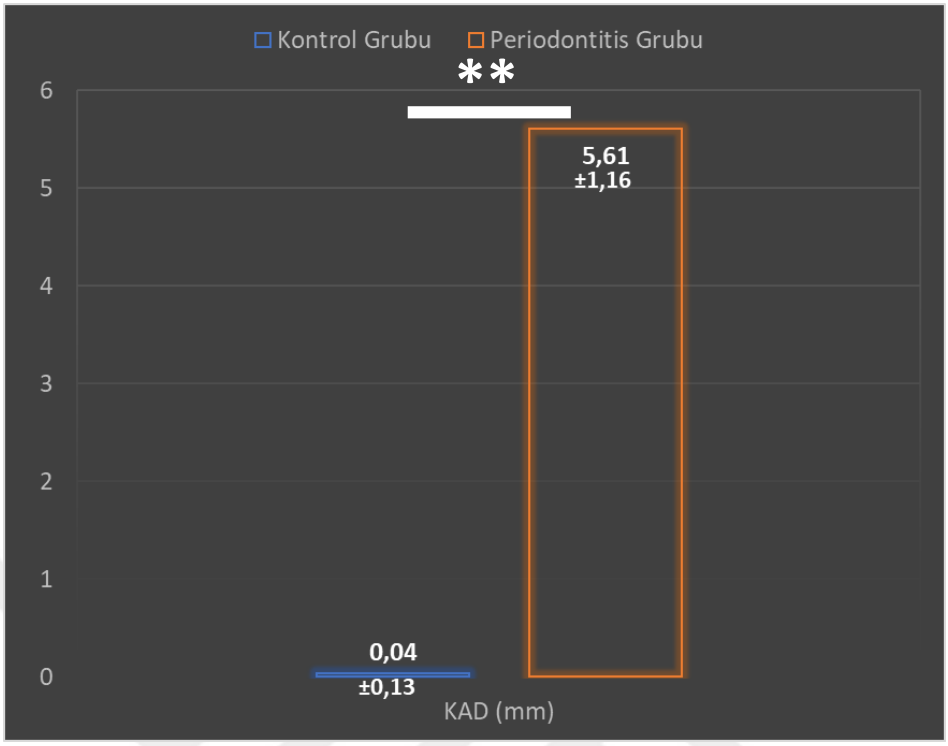
3.2.4. Sondalamada Kanama (SK) Bulguları



Şekil 18. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait SK bulguları(median± standart sapma, %).

Sondalamada Kanama ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0.000).

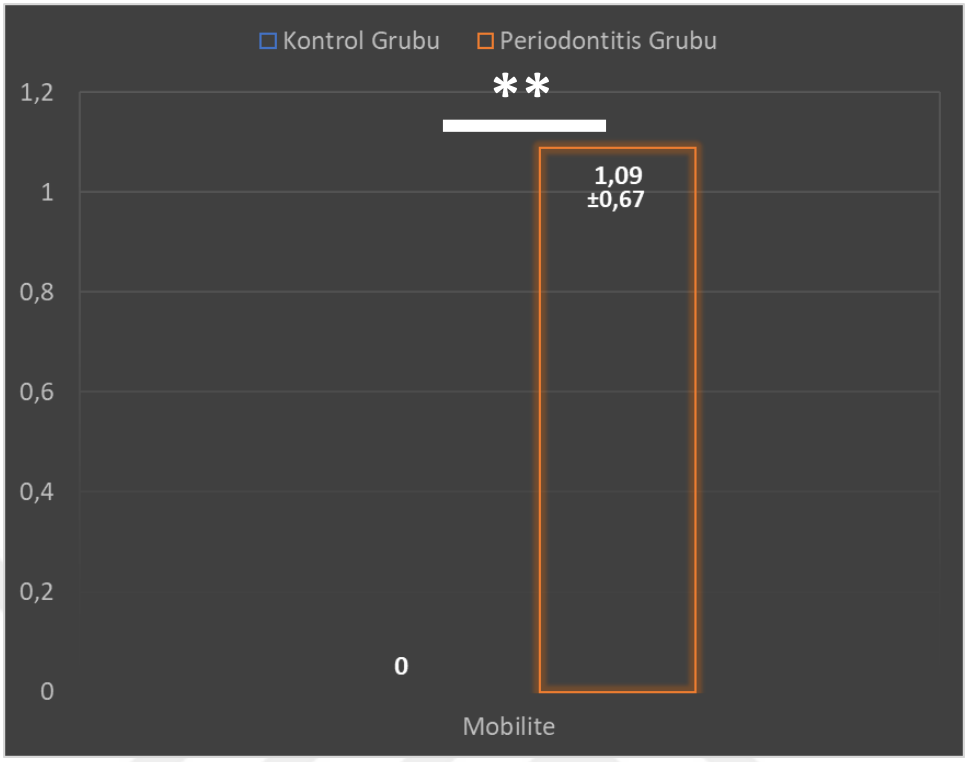
3.2.5. Klinik Ataşman Düzeyi (KAD) Bulguları



Şekil 19. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait KAD bulguları (median± standart sapma, mm).

Klinik Ataşman Düzeyi ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0.000).

3.2.6. Mobilite Bulguları

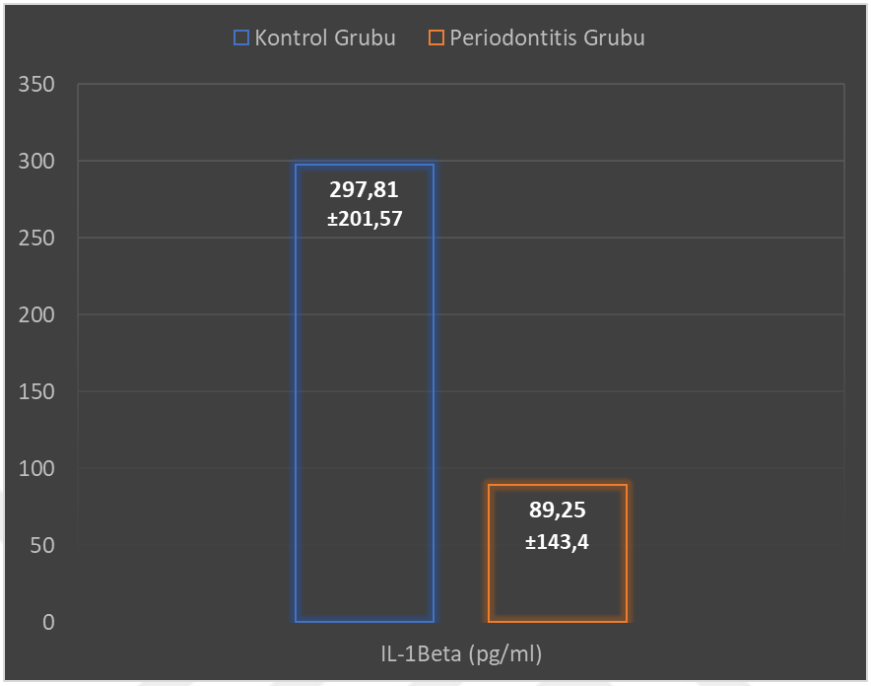


Şekil 20. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait mobilite bulguları (median ± standart sapma).

Mobilite ortalama değeri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur(p:0.000).

3.3. Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

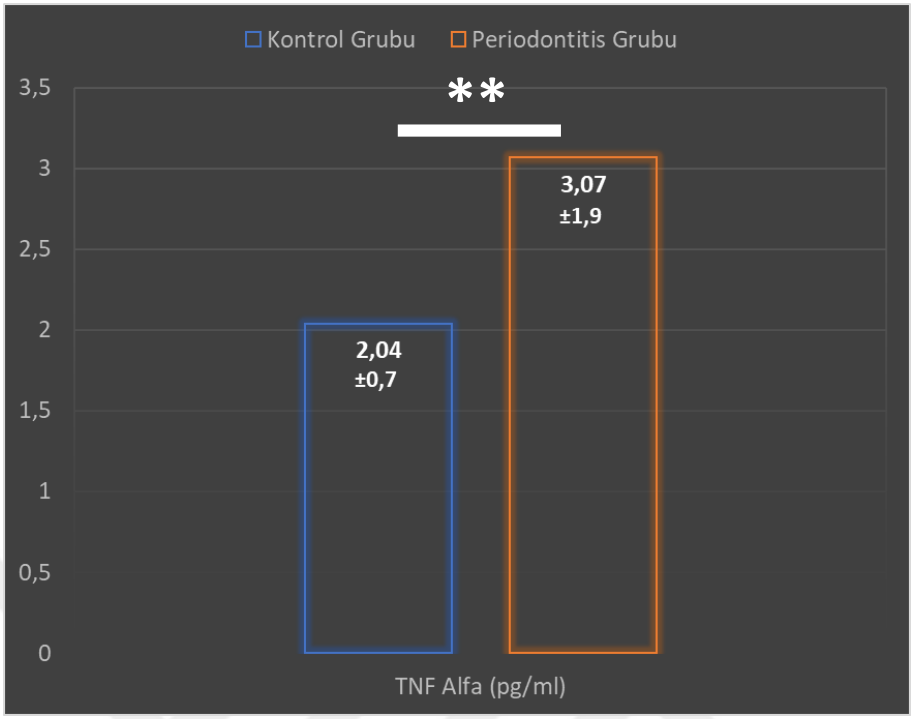
3.3.1. Tükürük IL-1β Düzeyi



Şekil 21. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük IL-1β düzeyleri (median± standart sapma, pg/ml).

Tükürük IL-1β düzeyininkontrol grubunda periodontitis grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.05).

3.3.2. Tükürük TNF-αDüzeyi

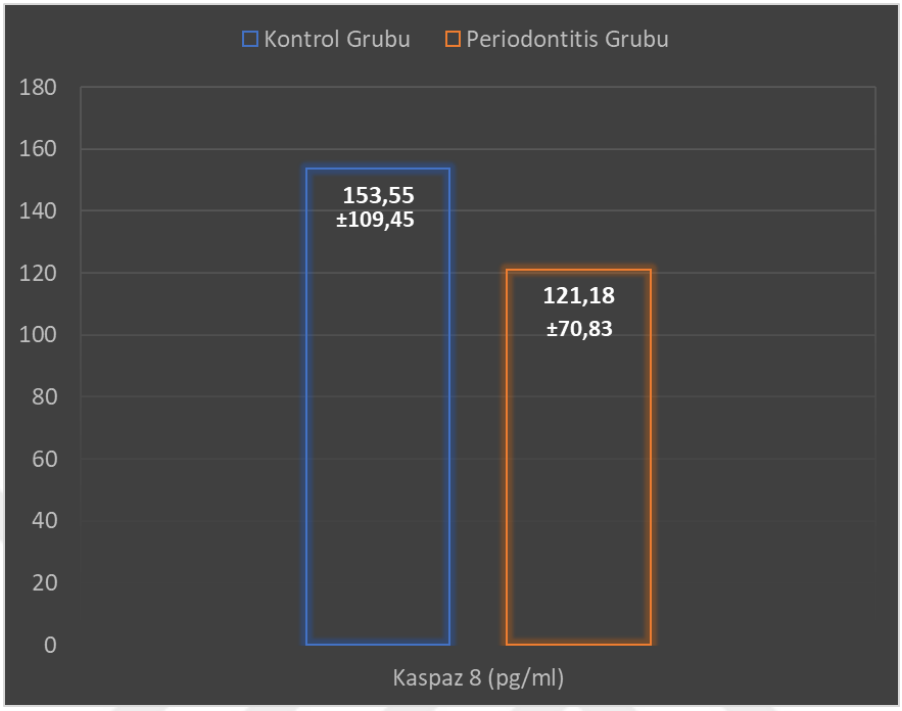


Şekil 22. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TNF-α düzeyleri (median± standart sapma, pg/ml).

Tükürük TNF-α düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.002).

3.3.3. Apoptoz Belirteci Bulguları

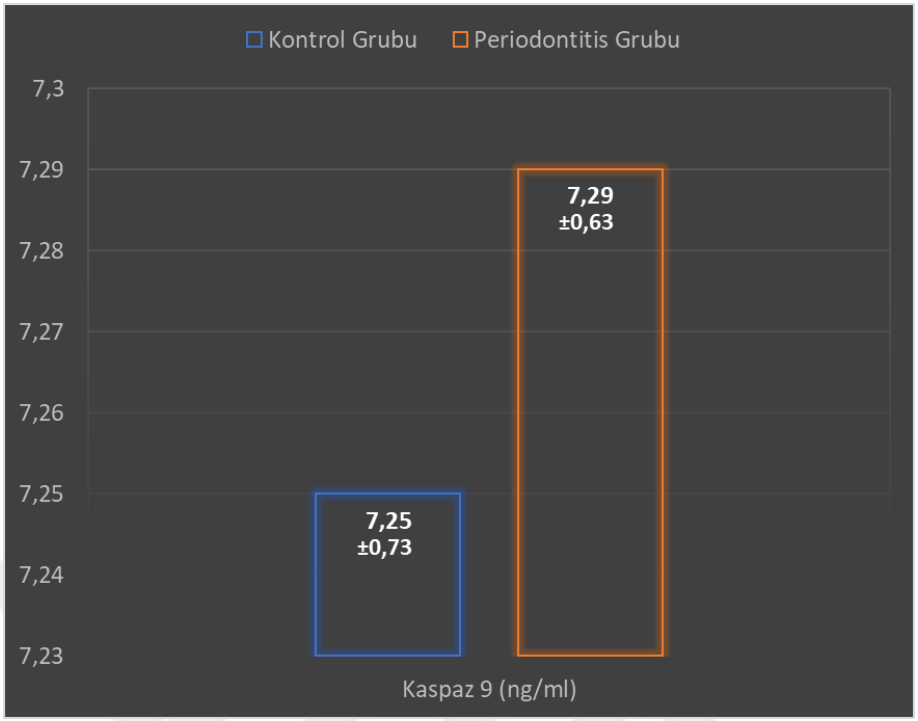
3.3.3.1. Tükürük Kaspaz 8 Düzeyi



Şekil 23. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz-8 düzeyleri (median± standart sapma, pg/ml).

Tükürük Kaspaz 8 düzeyinin kontrol grubunda periodontitis grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.089).

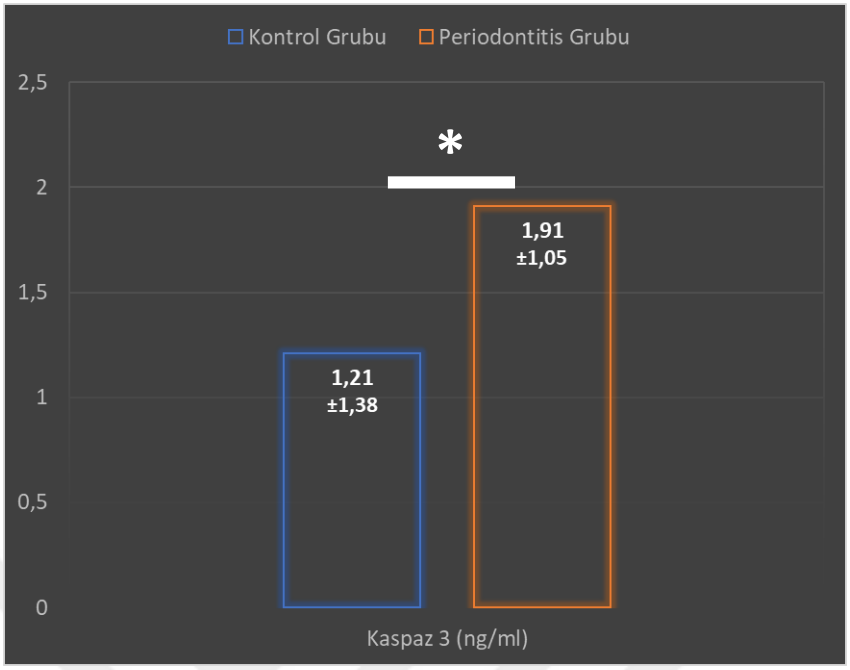
3.3.3.2. Tükürük Kaspaz 9 Düzeyi



Şekil 24. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz 9 (median ± standart sapma, ng/ml).

Tükürük Kaspaz-9 düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,927).

3.3.3.3. Tükürük Kaspaz 3 Düzeyi

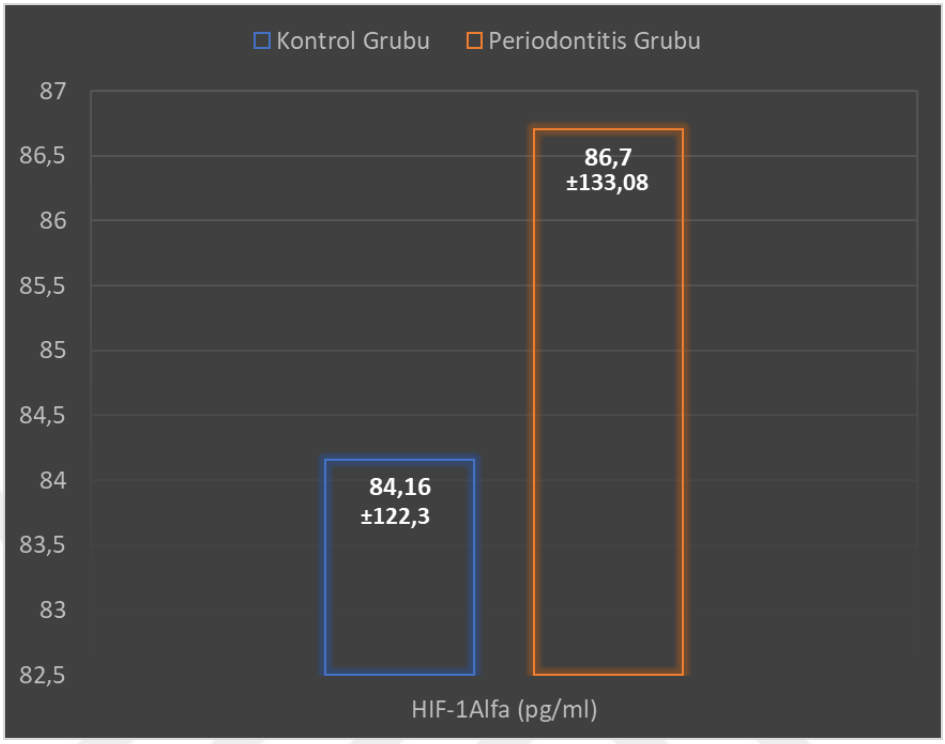


Şekil 25. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük Kaspaz 3 düzeyleri(median± standart sapma, ng/ml).

Tükürük Kaspaz-3 düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.041).

3.3.4. Hipoksi Belirteci Bulguları

3.3.4.1. Tükürük HIF-1αDüzeyi

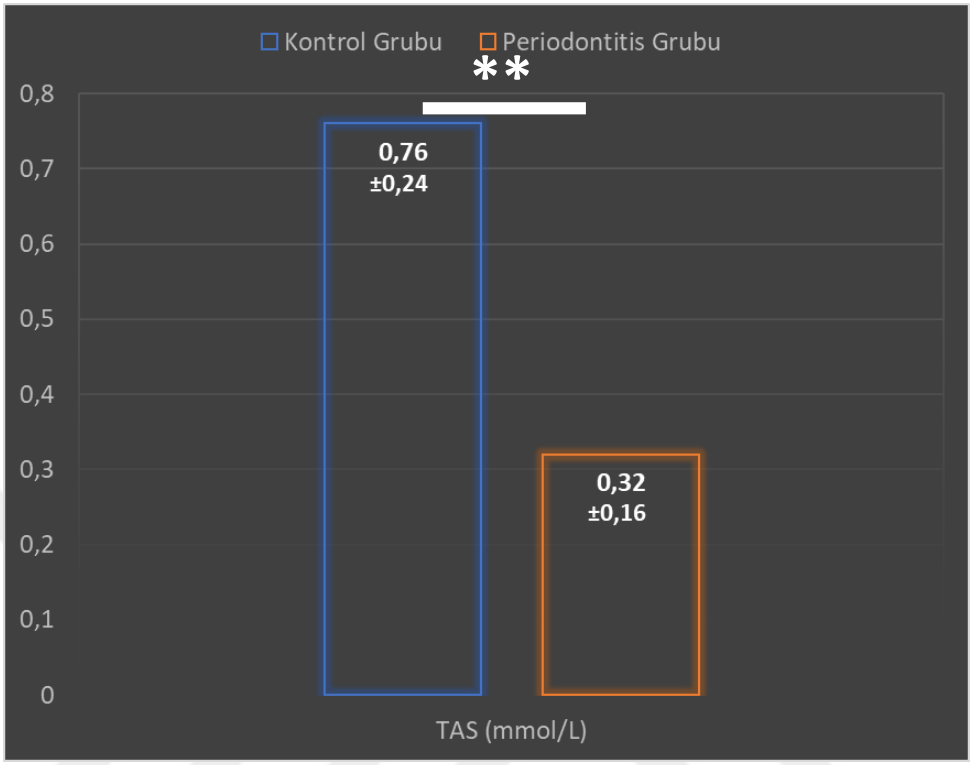


Şekil 26. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük HIF-1α düzeyleri (median± standart sapma, pg/ml).

Tükürük HIF-1α düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0.125).

3.3.5. Oksidatif Stres Belirteci Bulguları

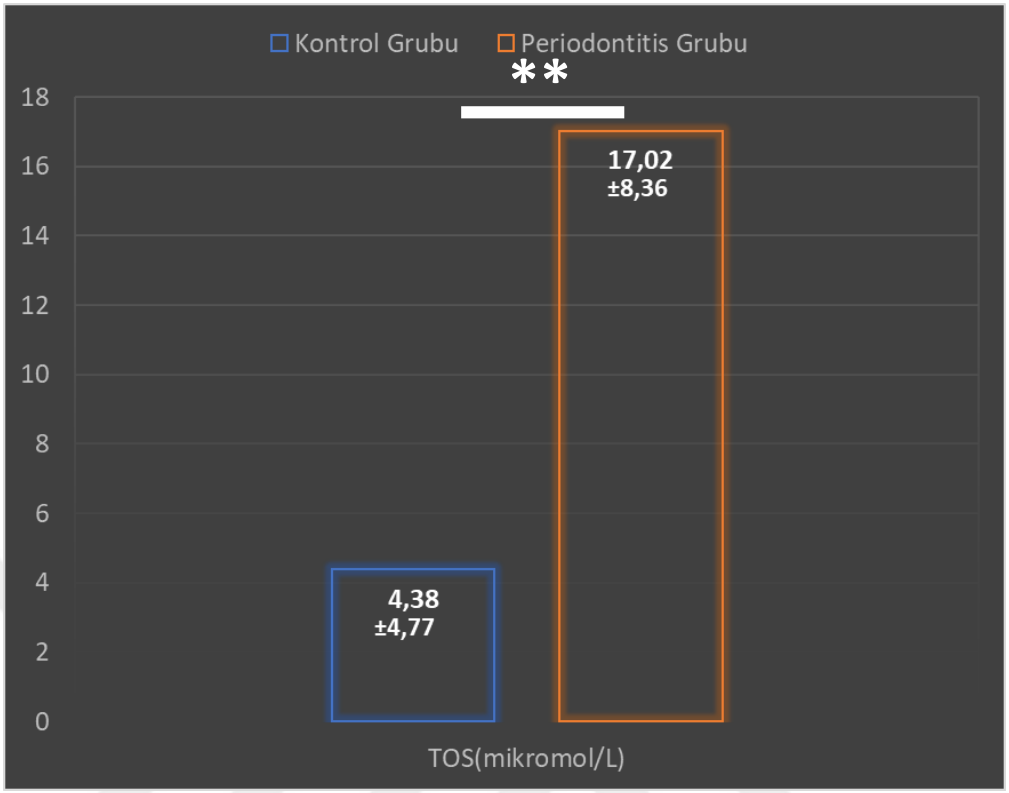
3.3.5.1. Tükürük Total Antioksidan Düzeyi



Şekil 27. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TAS düzeyleri(median± standart sapma, mmol/L).

Tükürük Total Antioksidan Seviye düzeyinin kontrol grubunda periodontitis grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır(p:0.000).

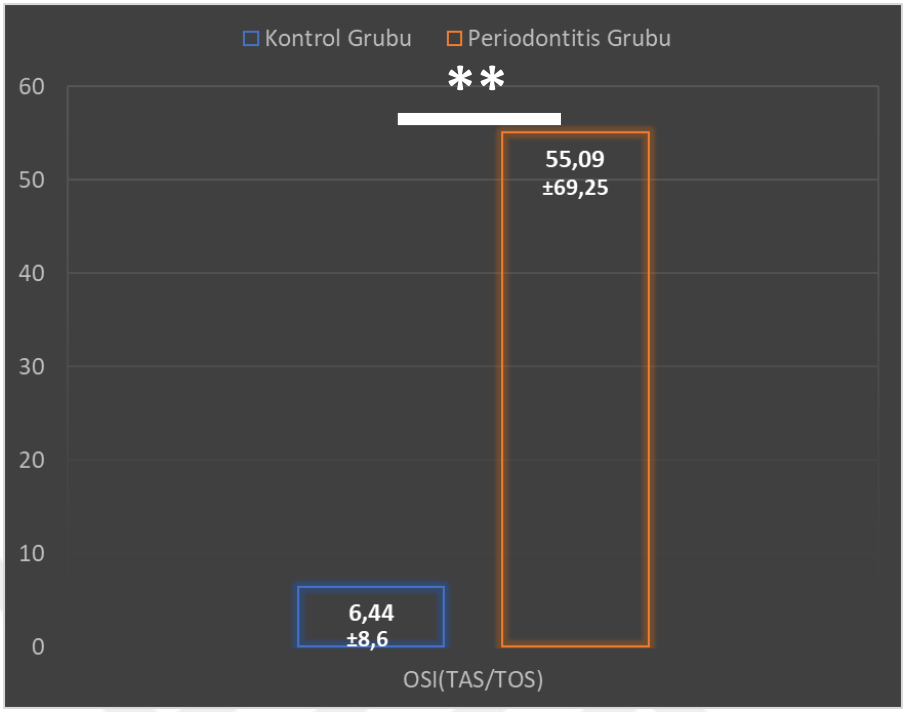
3.3.5.2. Tükürük Total Oksidan Düzeyi



Şekil 28. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük TOS düzeyleri (median ± standart sapma, µmol/L).

Tükürük Total Oksidan Seviye düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.000).

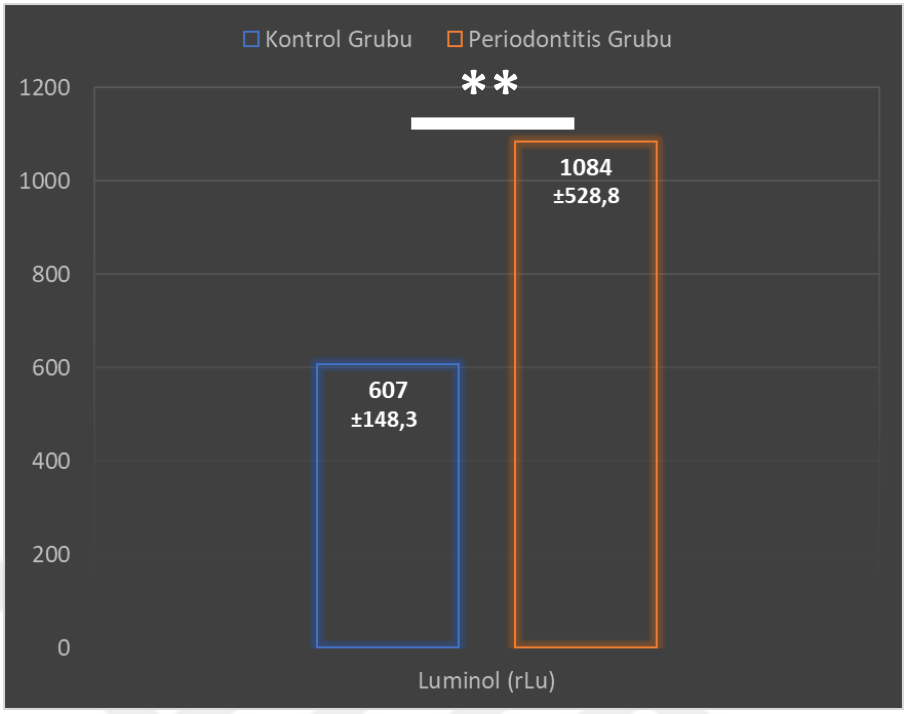
3.3.5.3. Tükürük Oksidatif Stres Indeksi(OSI)Düzeyi



Şekil 29. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait tükürük OSI düzeyleri (median ± standart sapma,OSI=TOS/TAS).

Tükürük OSI düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.000).

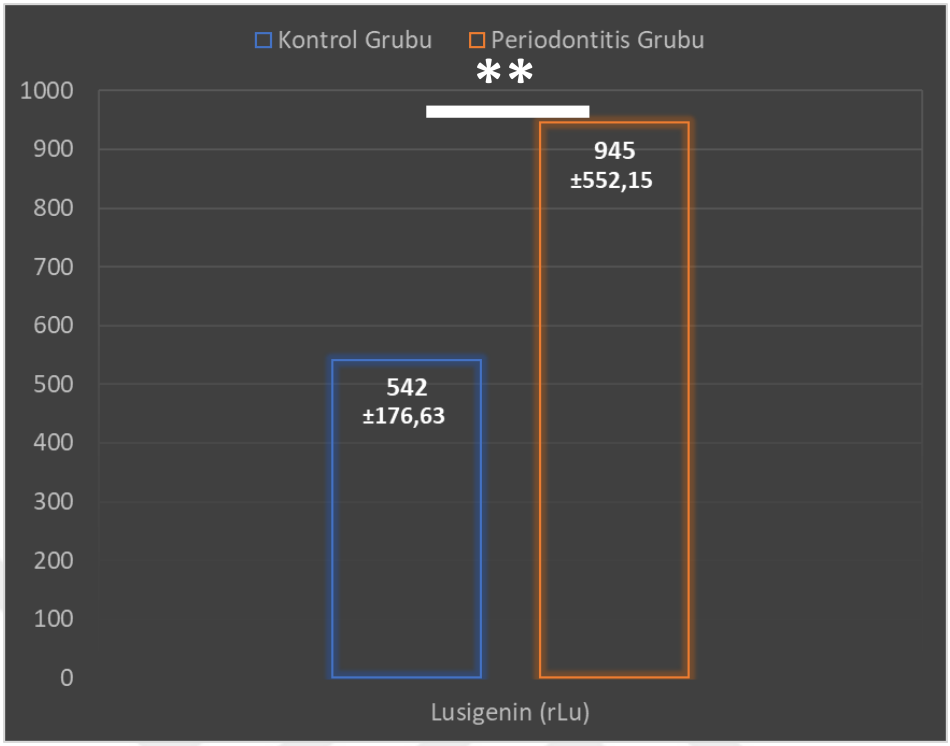
3.3.5.4. DOS Luminol aracılı Kemiluminesans Düzeyi



Şekil 30. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait DOS Luminol aracılı KL düzeyleri(median± standart sapma, rLu).

Dişeti oluğu sıvısı Luminol aracılı kemiluminesans düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.000).

3.3.5.5. DOS Lusigenin aracılı Kemiluminesans Düzeyi



Şekil 31. Periodontitis ve Kontrol gruplarına ait DOS Lusigenin aracılı KL düzeyleri (median ± standart sapma, rLu).

Dişeti oluğu sıvısı Lusigenin aracılı kemiluminesans düzeyinin periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır(p:0.000).

3.4. Korelasyon Analizi

Tüm gruplar dahil olacak şekilde 59 hasta değerlendirilerek korelasyon analizi yapılmıştır.

KORELASYONLAR									
		IL1-β	**TNF-α**	**Kasp-8**	**Kasp-9**	**Kasp-3**	**HIF-1α**	**LUM**	**LUC**
IL1-β	Pearson Korelasyonu	1	-,166	**,442****	,020	**,328***	-0,15	-,157	-,218
	Sig. (2-uçlu)		,210	,000	,879	,011	,907	234	,097
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
TNF-α	Pearson Korelasyonu	-,166	1	-,143	,090	,076	**,257***	,096	,112
	Sig. (2-uçlu)	,210		,280	,497	,567	,049	,471	,398
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
Kasp-8	Pearson Korelasyonu	**,442****	-,143	1	-,021	**,412****	,030	-,209	-,085
	Sig. (2-uçlu)	,000	,280		,873	,001	,822	,111	,524
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
Kasp-9	Pearson Korelasyonu	,020	,090	-,021	1	,168	,024	-,082	-,190
	Sig. (2-uçlu)	,879	,497	,873		,203	,854	,536	,150
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
Kasp-3	Pearson Korelasyonu	**,328***	,076	**,412****	,168	1	,246	,245	,060
	Sig. (2-uçlu)	,011	,567	,001	,203		,060	,061	,652
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
HIF-1α	Pearson Korelasyonu	-,015	**,257***	,030	,024	,246	1	,061	,214
	Sig. (2-uçlu)	,907	,049	,822	,854	,060		,647	,104
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
LUM	Pearson Korelasyonu	-,157	,096	-,209	-,082	,245	,061	1	**,354****
	Sig. (2-uçlu)	,234	,471	111	,536	,061	,647		,006
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
LUC	Pearson Korelasyonu	-,218	,112	-,085	-,190	,060	,214	**,354****	1
	Sig. (2-uçlu)	,097	,398	,524	,150	,652	,104	,006	
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
PI	Pearson Korelasyonu	-,193	**,319***	-,175	,102	,133	,241	**,490****	**,442****
	Sig. (2-uçlu)	,142	,014	,185	,443	,314	,066	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
	Pearson Korelasyonu	-,149	,226	-,169	,072	,095	,081	**,497****	**,531****

GI	Sig. (2-uçlu)	,261	,085	,200	,590	,476	,541	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
SCD	Pearson Korelasyonu	-,165	**,338****	-,170	,057	,119	,238	**,431****	**,478****
	Sig. (2-uçlu)	,212	,009	,197	,670	,370	,070	,001	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
SK	Pearson Korelasyonu	-,211	**,357****	**-,283***	,131	,181	,218	**,584****	**,560****
	Sig. (2-uçlu)	,109	,005	,030	,323	,170	,096	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
KAD	Pearson Korelasyonu	-,221	**,356****	-,256	,013	,123	,182	**,538****	**,554****
	Sig. (2-uçlu)	,092	,006	,050	,922	,354	,168	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
MOB	Pearson Korelasyonu	-,127	**,407****	-,207	,057	,018	**,260***	**,327***	**,423****
	Sig. (2-uçlu)	,337	,001	,115	,667	,892	,047	,012	,001
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
YAŞ	Pearson Korelasyonu	**,563****	-,025	,173	,010	,211	,083	-,131	-,184
	Sig. (2-uçlu)	,000	,851	,190	,940	,110	,530	,323	,164
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
TAS	Pearson Korelasyonu	,012	**-,305***	,130	-,165	-,122	-,072	**-,574****	**-,373****
	Sig. (2-uçlu)	,931	,019	,326	,212	,356	,590	,000	,004
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
TOS	Pearson Korelasyonu	**-,286***	**,271***	-,233	,050	-,050	-,039	**,461****	**,285***
	Sig. (2-uçlu)	,028	,038	,076	,706	,705	,768	,000	,029
	N	59	59	59	59	59	59	59	59
OSI	Pearson Korelasyonu	-,157	,148	-,209	-,037	-,049	-,015	**,526****	**,317***
	Sig. (2-uçlu)	,235	,263	,113	,782	,715	,913	,000	,014
	N	59	59	59	59	59	59	59	59

Tablo 4. Korelasyon analizi verileri.

**. Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

*. Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

		PI	GI	SCD	SK	KAD	MOB	YAŞ	TAS	TOS	OSI
IL1-β	Pearson Korelasyonu	-,193	-,149	-,165	-,211	-,221	**-,127****	,563	**,012***	-,286	-,157
	Sig. (2-uçlu)	,142	,261	,212	,109	,092	,337	,000	,931	,028	,235
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
TNF-α	Pearson Korelasyonu	**,319***	,226	**,338****	,357	,356	,407	-,025	-,305	**,271***	,148
	Sig. (2-uçlu)	,014	,085	,009	,005	,006	,001	,851	,019	,038	,263
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Kas-8	Pearson Korelasyonu	-,175	-,169	-,170	**-,283****	-,256	-,207	,173	**,130****	-,233	-,209
	Sig. (2-uçlu)	,185	,200	,197	,030	,050	,115	,190	,326	,076	,113
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Kas-9	Pearson Korelasyonu	,102	,072	,057	,131	,013	,057	,010	-,165	,050	-,037
	Sig. (2-uçlu)	,443	,590	,670	,323	,922	,667	,940	,212	,706	,782
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
Kas-3	Pearson Korelasyonu	,133	,095	,119	**,181***	,123	**,018****	,211	-,122	-,050	-,049
	Sig. (2-uçlu)	,314	,476	,370	,170	,354	,892	,110	,356	,705	,715
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
HIF-1α	Pearson Korelasyonu	,241	,081	,238	,218	**,182***	,260	,083	-,072	-,039	-,015
	Sig. (2-uçlu)	,066	,541	,070	,096	,168	,047	İ530	,590	,768	,913
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
LUM	Pearson Korelasyonu	**,490****	**,497****	**,431****	,584	,538	,327	-,131	-,574	,461	,526
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,001	,000	,000	,012	,323	,000	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
LUC	Pearson Korelasyonu	**,442****	**,531****	**,478****	,560	,554	,423	-,184	-,373	,285	**,317****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,164	,004	,029	,014
	N	59	59	59	59	59	59	59	59		
PI	Pearson Korelasyonu	1	**,846****	**,821****	,786	**,833***	,841	-,221	-,573	,457	**,444****
	Sig. (2-uçlu)		,000	,000	,000	,000	,000	,093	,000	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
GI	Pearson Korelasyonu	**,846****	1	**,744****	,833	,828	,730	-,256	-,614	,465	**,407****
	Sig. (2-uçlu)	,000		,000	,000	,000	,000	,051	,000	,000	,001
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
SCD	Pearson Korelasyonu	**,821****	**,744****	1	,850	**,925****	,820	-,252	-,600	-,515	**,498****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000		,000	,000	,000	,054	,000	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59

SK	Pearson Korelasyonu	**,786****	**,833****	**,850****	1	**,944****	**,770***	-,256	-,730	,645	**,552****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000		,000	,000	,050	,000	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
KAD	Pearson Korelasyonu	**,833****	**,828****	**,925****	,944	**1****	,862	-,294	-,720	,620	**,566****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000	,000		,000	,024	,000	,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
MOB	Pearson Korelasyonu	**,841****	**,730****	**,820****	,770	**,862****	1	-,194	-,562	**,435***	**,451***
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000	,000	,000		,141	,000	,001	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
YAŞ	Pearson Korelasyonu	-,221	-,256	-,252	**-,256****	-,294	-,194	1	,045	-,220	-,119
	Sig. (2-uçlu)	,093	,051	,054	,050	,024	,141		,737	,094	,371
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
TAS	Pearson Korelasyonu	**,573****	**,614****	**,600****	-,730	**-,720***	-,562	,045	1	-,641	**-,665****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,737		,000	,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
TOS	Pearson Korelasyonu	**,457****	**,466****	**,515****	**,645***	**,620***	,435	-,220	-,641	1	**,825****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,094	,000		,000
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
OSI	Pearson Korelasyonu	**,444****	**,407****	**,498****	,552	,566	,451	-,119	-,665	,825	**1****
	Sig. (2-uçlu)	,000	,001	,000	,000	,000	,000	,371	,000	,000	
	N	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59

Tablo 5. Korelasyon analizi verileri (devam).

**. Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır.

*. Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Yaş, Il-1β ile pozitif yönlü, Sondalamada Kanama ile negatif yönlü $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü ilişkili bulunmuştur.

Plak Indeksi, Luminol aracılı Kemilüminesans, Lusigenin aracılı Kemiluminesans, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği ve Oksidatif Stres Indeksi ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili TNF-α ve Klinik Ataşman Düzeyi ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Gingival Indeks, Plak Indeksi, Sondalanabilir Cep Derinliği, Oksidatif Stres Indeksi, Luminol aracılı Kemilüminesans ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Sondalanabilir Cep Derinliği, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Klinik Ataşman Düzeyi, Oksidatif Stres Indeksi, TNF-α, Luminol aracılı Kemilüminesans ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Sondalamada Kanama, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği , Klinik Ataşman Düzeyi, Oksidatif Stres Indeksi, TNF-α, Luminol aracılı Kemilüminesans ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, Kaspaz-8 ile negatif yönlü ve mobilite ile pozitif yönlü $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde ilişkili bulunmuştur.

Klinik Ataşman Düzeyi, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği, Oksidatif Stres Indeksi, TNF-α, Luminol aracılı Kemilüminesans ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif ilişkili bulunmuştur.

Mobilite, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği , Klinik Ataşman Düzeyi, TNF-α, ve Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, Luminol aracılı Kemilüminesans, HIF-1α, Total Oksidan Seviye ve Oksidatif Stres Indeksiile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

IL-1β, Kaspaz-8 ile pozitif yönlü, mobilite ile negatif yönlü $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü ilişkili, Kaspaz 3 ve Total Antioksidan Seviye ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

TNF-α,Sondalanabilir Cep Derinliği ilep<0.01 anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, HIF-1α, Plak Indeksive Total Oksidan Seviye ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Kaspaz-8, IL-1β, Kaspaz-3ve Total Antioksidan Seviye ile pozitif yönlü, Sondalamada Kanama ile negatif yönlüp<0.01 anlamlılık düzeyinde güçlü ilişkili bulunmuştur.

Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve mobilite ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, Il-1β ve Sondalamada Kanama ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

HIF-1α, TNF-α ve Klinik Ataşman Düzeyiile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Total Antioksidan Seviye, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği , Luminol aracılı Kemilüminesans, Lusigenin aracılı Kemiluminesans ve Oksidatif Stres Indeksi ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü negatif yönlü ilişkili, Klinik Ataşman Düzeyi, Il-1β, TNF-αve ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde negatif yönlü ilişkili bulunmuştur.

TOS, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği , Oksidatif Stres Indeksive Luminol aracılı Kemilüminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, Il-1βile negatif yönlü, TNF-α, Sondalamada Kanama, Klinik Ataşman Düzeyive Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile pozitif yönlü $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde ilişkili bulunmuştur.

Oksidatif Stres Indeksi, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği , Luminol aracılı Kemilüminesans ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili, Lusigenin aracılı Kemiluminesans ile $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Luminol aracılı Kemilüminesans, Lusigenin aracılı Kemilüminesans, Plak Indeksi, Gingival Indeks ve Sondalanabilir Cep Derinliği ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

Lusigenin aracılı Kemilüminesans, Luminol aracılı Kemilüminesans, Plak Indeksi, Gingival Indeks, Sondalanabilir Cep Derinliği ve Oksidatif Stres Indeksi ile $p<0.01$ anlamlılık düzeyinde güçlü pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

4.1. Yöntemin Tartışması

Periodontal hastalığın birçok etyolojik etkeni olduğu bilinmektedir, ancak periodontal yıkımın başlama mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Doku yıkımı bakteriler ve yan ürünlerine karşı oluşan kontrolsüz konak yanıtının sonucu olarak ortaya çıkmaktadır[4]. Yıkım mekanizmalarından birinin proteolitik enzim ve inhibitörleri ile ROM ve antioksidan sistem arasındaki homeostatik dengenin bozulması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir[21,22].

ROM, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_20_2), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) ve tekli oksijen ($^1O_2$) gibi kısa ömürlü, son derece reaktif oksijen ürünleridir[13]. Hücresel düzeydeki ROM un, hücresel sinyal iletimi, hücresel farklılaşma ve apoptoz da dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerin fizyolojik süreçleri için gerekli olduğu gösterilmiştir [13,19,20]. Antioksidan yanıt sistemi dengelenmediği durumlarda OS durumu ortaya çıkmaktadır.

Bu tezin temel amacı, sistemik olarak sağlıklı Evre III ve Evre IV, Derece C Periodontitis hastalarında oksidasyon ve apoptoz mekanizmaları arasındaki ilişkiyi tükürük Il-1β, TNF-α, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, HIF-1α, total antioksidan ve total oksidan düzeyleri ile ve DOS örneklerinde reaktif oksijen metabolitlerini inceleyerek karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir.

Serbest radikaller ve diğer reaktif türler, in vivo 10^{-6}-10^{-9} saniye ile son derece kısa yarı ömüre sahiptir ve doğrudan ölçülememektedir. Bu nedenle ROM ölçümü, doku yıkımının son ürünlerinin biyobelirteçlerinin konsantrasyonu ölçülerek yapılmaktadır.

Kemilüminesans (KL) yöntemi, ROM' u ölçmek için doğrudan invaziv olmayan bir yöntem olarak kullanılabilmektedir. KL, bir yayılım durumu oluşturmak için yeterince ekzotermik bir oksidatif reaksiyona girebilen organik maddelerin evrensel bir özelliğidir. Genellikle üretilen ışık 400-600 nm arasında bir dalga boyuna sahiptir ve görülebilmektedir. Bununla birlikte, bu ışık, sırasıyla görünür ışıktan daha kısa veya daha uzun dalga boyuna sahip UV veya kızılötesi bölgede de olabilmektedir[267].

Periodontal araştırmalarda; hastalıkları, yeni tedavi modellerini, hastalıkların oluşma ve ilerleme mekanizmalarını incelemek amacıyla kişilerden tükürük ve DOS örneklerinin alınarak, bu örneklerin çalışılması, biyobelirteçlerin incelenmesi tercih

edilen non invaziv bir tekniktir. Tükürük ve DOS örnekleri, ortaya konulan hipotezin incelenmesini, tedavi modelinin güvenilirliğini ve etkinliğinin incelenmesini mümkün kılar[268].

Multifaktöriyel etyolojiye sahip olan periodontal hastalıklarda, periodontal doku yıkımının başlama mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak; bu mekanizmalardan birinin üretimi artan ROM ile antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması olabileceği ileri sürülmektedir. Bu konuda yapılan araştırmalarda, periodontal hastalıklar lokal ve sistemik olarak genellikle azalmış antioksidan ve yükselmiş oksidan değerler ile ilişkilendirilmiştir.OS ile ilgili yapılan bu çalışmaların çoğu kesitsel çalışmalar olup, periodontal hastalıkta düşük olan antioksidan değerlerinin, periodontal tedavi sonrasında ne gibi değişimler gösterdiği gözlenememektedir. Çalışmamızın amacı, ileri düzey periodontitisli hastalarda oksidasyon, hipoksi ve apoptoz mekanizmaları arasındaki ilişkiyi incelemektir.

Oksidatif stresin lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere oluşturduğu hasar tükürükte tespit edilebilmektedir. OS nin tükürük belirteçleri arasında lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren sübstanslar, DNA'nın oksidatif hasarının bir belirteci olarak 8-hidroksi-29-deoksiguanosin (8-OHdG) bulunmaktadır. Protein oksidasyonu belirteci olarak gelişmiş oksidasyon protein oksidasyon ürünleri ve ile sıkıca bağlantılı olan karbonil stresin bir belirteci olarak gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE) bulunmaktadır[269]. Yüksek biyolojik değişkenliklerine rağmen, bu belirteçlerin tükürük konsantrasyonları ağız sağlığı hakkında değerli bilgiler sağlayabilmektedir[270].

Çalışmamızda hem lokal hem de sistemik oksidatif durumu yansıtma potansiyeline sahip olduğu düşünülerek, uyarılmamış tam tükürük örnekleri kullanılmıştır[252]. Uyarıyla tükürükte antioksidan üretiminin arttığı fakat konsantrasyonunun azaldığı ve DOS'da ortama antioksidan girişini artırarak yalancı bir antioksidan değeri ölçülmesine neden olacağı bildirilmiştir[16,178]. Uyarılmamış tükürüğün ise genel ağız içi durumu temsil ettiği ve antioksidan kompozisyonun değerlendirilmesinde daha doğru sonuç verdiği gösterilmiştir[271]. Tükürükteki biyobelirteç miktarlarının çoğu serumda bulunan düzeyinden daha düşüktür. Ancak gelişen teknoloji ile bunun artık bir sınırlama olarak görülmesine gerek kalmamıştır.

Ancak klinik uygulamalarda geçerliliği olan güvenilir, hassas ve spesifik bir cihaza hala ihtiyaç duyulmaktadır[272].

Novakovic ve arkadaşları periodontal tedavi sonrasında tükürük TAS değerlerinde artış olduğunu ve periodontal durumun belirlenmesinde tükürük antioksidanlarının önemli birer biyobelirteç olduğunu belirtmişlerdir[273,274].

Bu çalışmada güç hesaplamasına göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmek için yeterli sayıya ulaşılmıştır. Ek olarak, bu çalışmanın kesitsel bir çalışma dizaynına sahip olması, değerlendirilen biyobelirteçler ile periodontal durum arasında nedensel ilişki kurmayı mümkün kılmamaktadır.

Çalışmamızda 59 kişi ile klinik analizler; periodontal durum tespiti için her dişte 6 noktadan olacak şekilde (bukkal:mesial, orta, distal; palatinal/lingual:mesial, orta, distal) Sillness&Loe Plak İndeksi(PI)[258], Loe&Sillness Gingival İndeks(GI)[259], Sondalanabilir Cep Derinliği(SCD)[260] ölçümü, Klinik Ataşman Düzeyi(KAD)[260] ölçümü ve Sondalamada Kanama(SK)[261] yüzdesi ölçümleri elde edilmiştir. Ayrıca dişlerin mobilite[262] düzeyleri kaydedilmiştir.

Tüm periodontal ölçümler ucunun çapı 0,5mm olan Williams tipi Periodontal Sonda(Hu-Friedy, ABD) kullanılarak tüm ağızda gerçekleştirilmiştir.

Biyokimyasal analizler ise; Analiz gününe kadar -80 ˚C de bekleyen hasta ve kontrol gruplarının tükürük örneklerinde Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, IL1-β ve TNF-α Invitrogen, Viyana, Avusturya), TAS ve TOS düzeyleri (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) ticari olarak sağlanan kitler aracılığı ile ELISA yöntemi kullanılarak, önerilen çalışma yöntemine bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir.

Analiz gününe kadar -80˚C de bekleyen DOS örnekleri ise 1 mL PBS + HEPES (0.5M fosfatla tamponlanmış % 0,9'luk NaCl ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine aktarılmıştır. ROM tespiti Kobayashi ve ark.'nın tanımladığı yöntem kullanılarak minör değişikliklerle kemiluminesans ölçümleri ile yapılmıştır[263].

Şu ana kadar insan biyolojisinde antioksidan kapasiteyi veya ROM aracılı doku hasarını ölçmek için belirlenmiş olan yöntemler içerisinde altın standart olarak kabul edilmiş bir yöntem yoktur. Çalışmamızda Chapple ve ark.nın çalışmasında olduğu gibi Kemilüminesans değerlendirme yöntemi tercih edilmiştir[275].

Çalışmamızda tükürük örneklerinde ELISA ile genel durumun değerlendirilmesi hedeflenirken, DOS örneklerinde KL aracılığı ile spesifik ROM ölçümleri gerçekleştirilmiştir. DOS örneklerinin dişe özgü bölgeye dair bilgi vermesi, aynı bölgeden aynı zaman diliminde tekrar elde edilmesinin mümkün olmaması, miktarının azlığı, kontamine olması riski gibi sebeplerle DOS örnekleri KL ile çalışılarak detaylı ROM değerlendirilmesi yapılmıştır.

4.2. Bulguların Tartışması

Evre III ve IV Derece C periodontitis, periodontal hastalıkların göreceli olarak az bir bölümünü oluşturmakla birlikte, ilerlemiş doku yıkımı nedeniyle bireylerin ağız ve genel sağlığı açısından önemli etkileri olan durumlardır. Periodontal hastalıkların başlaması için bakteriyel patojenlerin varlığı gerekli olmakla birlikte, kompleks iltihapsal ve konak yanıtı da hastalığın ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır.

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, iltihabın düzenlenmesinde ve konak iltihapsal yanıtta kritik bir rol oynamaktadır. Bu işlem sırasında, etkilenen hücrede bir dizi koordine edilmiş morfolojik ve biyokimyasal olay indüklenir, bu da ölümüne ve ardından çöpçü fagositler tarafından uzaklaştırılmasına neden olur. Apoptoz iki yolla olabilmektedir. İntrinsik yoldan Kaspaz-9 prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de İnaktif kaspaz aktive edici DNaz'ı inaktifleştirerek Kaspaz aktive edici DNaz'ı (CAD) serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde parçalanmasına neden olmaktadır. Ekstrinsik yoldan ise aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive edebilmektedir. Ya direkt kapsaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'I keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA parçalanmasına neden olmaktadır (Şekil 9).

İnsanda nikotin ve elektronik sigara maruziyetinde, dişetinde fibroblastların apoptozu artmaktadır ve fibroblastların nikotine bağlı apoptozu kaspaz-3'e bağlıdır. Bu nedenle, çalışmamızda sigara içenler dışlanmadığı için kaspaz-8 ve kaspaz-9'un kaspaz-

3 aktivasyonu üzerindeki etkilerinin sigara nedenli de olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yaş, hücre apoptozu için bir risk faktörü olabilmektedir[276] ve periodontal dokulardaki apoptotik olaylar yaşlanma ile azalabilmektedir[277].

Çalışmamızda periodontal durum (PI, GI, SK, SCD, KAD, Mob), KL aracılı luminol ve KL aracılı lusigenin düzeylerinde şiddetli periodontitis grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyde ilişkiler tespit edilmiştir (Tablo 4 ve 5).

Tamaki N ve ark nın yaptığı bir çalışmada periodontal idame fazında olan hastalarda plazma oksidatif durumu ile KAD arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. OS'deki sistemik artışın periodontal hastalığın ilerlemesini etkileyebileceğini belirtmişlerdir[278]. Çalışmamızda KAD ve oksidatif stres belirteci bulguları arasındaki ilişki bu bilgiyi destekleyerek güçlendirmektedir .Evre III ve IV periodontitisli hastalarda klinik durum ile oksidan durum ilişkisini göstermektedir

TNF-α, endotel hücre apoptozuna ve endotel bariyerin bozulmasına neden olduğu bilinen güçlü bir proinflamatuar mediyatördür[279]. Kaspaz 3'ün de içinde bulunduğu kaspazların aktivasyonu, TNF-α' nın permeabilite artışına sebep olması gibi endotel hücre disfonksiyonunu indüklemesine katkıda bulunmaktadır. Kaspaz aktivasyonu apoptotik sinyale ve hücre bağlantı kompleksinin bozulmasına aracılık ederek endotel bariyer fonksiyonunun TNF-α ile indüklenen parçalanmasında rol oynamaktadır[280].

TNF-α, hipoksik olmayan bir uyarı olarak hareket edebilmekte ve normoksik koşullar altında HIF-1α'yı indükleyebilmektedir[281]. Ng ve ark., periodontitiste HIF-1α protein düzeylerinin TNF-α fonksiyonu ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir[230]. Çalışmamızın bulguları tükürük TNF-α ve HIF-1α ilişkisini gösterek bu bilgiyi desteklemektedir (Tablo 4).

Çalışmamızda hücre ölümü mekanizmasını incelemek amacıyla tükürükte Kaspaz-3, -8 ve -9 düzeyleri değerlendirilmiştir. Kaspaz-8 ve -9 salınımı için periodontitisli ve sağlıklı gruplar arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, tükürük Kaspaz-3 Periodontitis örneklerinde kontrollere göre anlamlı derecede farklılık bulunmuştur(Şekil 23, 24, 25).

Abuhussein ve ark.[192] Kronik Periodontitise (KP) sahip olan ve olmayan hastaların serum, tükürük ve DOS'daki kaspaz-3 düzeylerini araştırmışlardır. Bu çalışma,

KP hastalarının DOS'daki kaspaz-3'ün sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu (P <0.05), ancak kaspaz-3'ün tükürük veya serumda tespit edilemediğini göstermiştir. Yazarlar, kaspaz-3'ün periodonsiyumu çevreleyen hücreler tarafından lokal olarak aktive edilebileceğini ve DOS içine salgılanabileceğini ve herhangi bir sistemik katkı veya tükürük kontaminasyonundan kaynaklanmadığını açıklamışlardır. Çalışmamızda Kaspaz-3 tükürükte istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde farklı bulunmuştur. Bulut ve ark. generalize agresif periodontitisli ve sağlıklı bireylerden aldıkları dişeti doku örneklerinde Kaspaz-3 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Ayrıca kaspaz-3'ün, tükürük veya serumdaki uzak bölgelerden ziyade hücrelerin apoptoz geçirdiği bölgenin yakınındaki DOS'da daha kolay tespit edilebilen daha kısa bir yarı ömre sahip olabileceği öne sürülmüştür. Çalışmamızda serum analizi yapılmamıştır, DOS örneklerinde ise yalnızca KL ölçümleri gerçekleştirilmiştir, bu durum çalışmamızın sınırlamaları kapsamında değerlendirilebilir fakat tükürük örneklerinde anlamlı düzeyde farklılık bulunmakla beraber Kaspaz-3, Kaspaz-8 ile güçlü pozitif yönlü ilişkili bulunmuştur. Evre III ve IV periodontitisli hastalarda intrinsik yolak aktivasyonunu gösteren ilişkilerden biridir.

Manosudprasit ve ark.[282], KP ve tip 2 Diabetes mellitus (T2DM) hastalarının serum örneklerinde kaspaz-3, -8 ve -9 seviyelerini değerlendirmiştir. Kaspaz-3'ün KP'li ve KP'li olmayan T2DM hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (P <0.05). Kaspaz-8, T2DM'li ve T2DM'siz KP hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (P <0.05), ancak T2DM hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla hiçbir farklılık bildirilmemiştir (P> 0.05).

Aral ve ark.[283], yaptıkları çalışmada, KP'li hastalar ile sağlıklı kontrollerin DOS kaspaz-8 ve kaspaz-9 (P> 0.05) yani yürütücü kaspaz'ı(kaspaz-3) etkinleştiren başlatıcı kaspazların seviyelerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir. Bunun DOS'un doğası gereği PMNL dahil birçok hücre tipinden oluşmasından kaynaklanıyor olabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı çalışmada Agresif Periodontitis hastalarında daha yüksek kaspaz-9 ve AIF seviyeleri ve daha düşük kaspaz-8 seviyeleri bulunmuştur. Bu sonuçlar, agresif periodontitiste apoptotik yolakların hem intrensik hem de ekstrensik yolları kullanabileceği görüşünü güçlendirmektedir.

Apoptoz, hem hücresel düzeydeki artışı hem de iltihapsal infiltrasyonun kapsamını etkilemesiyle kronik bakteri birikimine karşı iltihapsal yanıtın düzenlenmesinde önemli bir olaydır[284]. Apoptoz süreci, katabolik özelliklerinden dolayı kaspaz olarak adlandırılan bir dizi sistein tipi proteazın aktivasyonunu içermektedir. Bu enzimler, inaktif proenzimler olarak sentezlenmektedir ve daha sonra apoptoz geçiren hücrelerde işlenmektedir. Kaspaz-3, apoptoz sırasında aktive olan önemli bir proteazdır. Kaspaz 3 ün saptanması, apoptotik mekanizmaların muhtemelen devam etmekte olduğunun kanıtıdır. Bununla birlikte, bu apoptoz belirteçlerinin azlığı, meydana gelen doku tahribatının uzun bir evrim süresinden sonra meydana gelebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, periodontitis grubunda apoptoz mekanizmasının değerlendirilmesi amaçlanmış olsa da, her iki grupta kaspaz-8 ve kaspaz-9 bulguları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Subgingival mikrobiyotaya yanıt olarak konak tarafından çeşitli iltihapsal sitokinler ve enzimler salınmaktadır ve bu da periodontal hastalığın; dişeti iltihabı, ataşman kaybı, alveolar kemik rezorpsiyonu ve cep oluşumu gibi klinik ve radyografik belirtilerine yol açmaktadır[224,228]. Önceki çalışmalarda, derin periodontal ceplerde büyüyen anaerobik bakteriyel biyofilm, artmış iltihapsal hücre infiltrasyonu ve mikrotromboz nedeniyle hipoksik bir gradyan geliştiği gösterilmiştir[221,226].

D'Aiuto ve ark. nın 210 birey üzerinde yaptıkları çalışmada şiddetli periodontitisin, artmış OS ve düşük antioksidan kapasite ile bağımsız olarak ilişkili olduğunu belirtmişlerdir[148].

Suresh ve ark. nın obez bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada periodontitise sahip obez bireylerin sağlıklı periodonsiyuma sahip obez bireylere oranla OS daha fazla olduğu belirlenmiştir[285].

Çalışmamıza göre periodontitisli hastalarda apoptoz tetiklenmesi birkaç yolla gerçekleşmiştir. Hücre içi ROM daki artış ve hipoksi ile hücre içi sinyal uyaranlarıyla mitokondriyel yolak aktifleşmektedir. Apoptozu tetikleyebilecek diğer hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Mitokondrilerdeki dejenerasyon ve elektron taşıma zincirinin bozulması ile hipoksi artışı tetiklenerek doku hücresel oksidasyona maruz kalmaktadır. ROM patofizyolojik sinyalleşmede önemli rollere sahiptir ve artmış oksijen miktarının artmış mitokondriyal ROM üretimiyle sonuçlandığı gösterildiği gibi hipoksinin OS e yol

açtığı ve bunun da mitokondriyal elektron taşıma sistemi yoluyla aşırı ROM üretimine yol açtığı bilinmektedir. Serbest radikaller, normal metabolizma sırasında üretilirken ve birçok biyolojik reaksiyonda ara ürün olarak gerekli olurken, bir eşik değerinin üzerinde, makromoleküllere zarar vererek OS e yol açmaktadır. Hipoksi stresi HIF-1α ekspresyonunu arttırmaktadır, Akut hipoksinin, mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan sorumlu sitokrom zincirinin aktivitesini değiştirerek doğrudan ROM üretimini uyardığı gösterilmiştir. Bu, normal hücresel antioksidan sistemin aktivitesini azaltırken ATP sentezinde bir azalmaya ve ROM birikiminin artmasına ve Bcl-2 protein ailesi bozukluğuna neden olmaktadır. Buna paralel olarak, artan ROM oluşumu, pro-apoptotik proteinleri artırıcı ve anti-apoptotik proteinler Bcl-xL ve Bcl-2'yi azaltıcı aktiviteyi de teşvik eder. OS nin neden olduğu anti-apoptoz proteinlerinin ve pro-apoptoz proteinlerinin bozulması, hipokside gözlemlenen nöronal hücre ölümüne önemli ölçüde katkıda bulunan apoptozu tetiklemektedir. Hipoksiden iyileşme ve etkilenen nöronların hayatta kalması reoksijenasyona bağlıdır, Ancak reoksijenasyonun oksidatif stres seviyeleri ve ROM / antioksidan sistem dengesi üzerindeki etkileri ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Buna göre doku hasarında, ROM merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil 10).

Hipoksi ve iltihap kronik iltihapsal hastalıklarda genellikle bir arada bulunarak birbirlerini modüle etmektedir[221,222]. Gram negatif anaerobik patojenler hastalıklı periodontal ceplerde çoğalırken tedavi edilmemiş periodontal ceplerin tabanında daha da düşük oksijen seviyelerine sebep olmaktadırlar[225,226]. İltihaplanmış periodontal dokularda konak hücre artışı ve artmış iltihapsal hücre infiltrasyonu, oksijen tüketiminin de artmasına sebep olmaktadır[225,227]. İltihabi dokulardaki endoteliyal hasar ve doku ödemi, mikrodolaşım ve oksijenlenmenin azalması ile sonuçlanmaktadır[227]. Periodontal dokulardaki düşük oksijen düzeyi ile hipoksik şartlar altında periodontal ligament hücreleri Il-1β , Il-6, PG-E2, nukleer faktör-kappa B'nin reseptör aktivatörü ve osteoprotegerin salgılamaktadır[223], bunlar da periodontal doku yıkımı ile yakından ilişkilidir[228,229].

Periodontitis sürecinde mitokondriyon permeabilitesinin bozulması ile Sitokrom-C membrandan sitoplazmaya geçerek Apaf-1 ve Kaspaz-9 ile birleşerek apoptozom oluşturur. Apoptozom diğer kaspazları active ederek hücreyi ölüme götürmektedir. Kaspazlar doğrudan mitokondriyon proteinleri ile etkileşmekedir. Bu etkileşim ile mitokondriyon homeostazı etkilenerek, porlar oluşur ve oligomerizasyon denilen iyon

kanalları oluşur. Hücre içi kalsiyum iyonlarındaki artış ile kaspazlar aktifleşerek hücre iskeletinin yıkılmasına sebep olurlar. Burada aktiflenen diğer enzim sistemi endonuklezlar ile birlikte kaspazlar oligonukleozomu parçalayarak DNA kırılmalarına sebep olmaktadır. Çalışmamızda başlatıcı kaspaz ailesinde yer alan Kaspaz-8 ve -9 un istatistiksel anlamlılık düzeyinde olmaması fakat efektör kaspaz ailesinde yer alan ve apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren Kaspaz-3 ün anlamlı değerlerde olması periodontitiste aktif yıkım sürecinin gerçekleştiğini göstermektedir. Efektör kaspazlar active edildiğinde; endonükleaz aktivasyonu, DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin imhası, fagositik hücreler için ligand ekspresyonu ve apoptotic cisimlerin oluşumu gerçekleşmektedir. Hipoksinin artışı ile HIF-1α ekspresyonu gerçekleşerek hücresel oksidasyon artmış olup reaktif oksijen metabolitleri salınımı ile total oksidan seviye artmaktadır. Oksidanların artışı hücre içi sinyal olup mitokondriyel yolağı uyarmaktadır, apoptoz süreci döngüsel devam etmektedir. Elektron taşıma zinciri bozulmasına bağlı ROM hidroksil salınımındaki artış ve antioksidan dengenin bozularak serbest oksijen hasarıyla nötrofiller ve diğer hücrelerin göçüne bağlı enflamasyon kaskadı başlamaktadır. Apoptozda görülmeyen iltihapsal durum burada hücresel oksidasyona bağlı olarak başlamaktadır. Oksidatif stres koşulları altında mitokondriyal fonksiyonun durması, hücresel enerjinin birden azalması nedeniyle apoptoza katkıda bulunmaktadır. ROM hücrenin biyokimyasal savunmasını bastırdığında ise hücresel yaralanma meydana gelmektedir. Reaktif oksijen türleri (özellikle hidroksil radikalleri) tüm biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilmektedir. İlk reaksiyon, ikinci bir radikal üreterek devam eden bir zincirleme reaksiyonda ikinci bir makromolekül ve benzeri ile reaksiyona girmektedir. Kolajen üzerindeki prolin bölgelerinin özellikle hidroksil radikali aracılı bozulmaya eğilimli olması nedeniyle periodontal ligamentin tip 1 kollajeni oksidatif bozulmaya karşı özellikle duyarlı olabilmektedir[119]. Dolayısıyla Luminol aracılı KL sonuçlarının yüksek olması Evre III ve IV periodontitisin klinik bulguları ile paralellik göstererek periodontal ligament hasarını göstermektedir. Luminol aracılı KL ölçümlerinin ileri düzeydeki artışı şiddetli periodontitis hastalarının DOS örneklerinde iltihap kaynaklı serbest radikallerin arttığını göstermiştir. Korelasyon tablosuna bakıldığında (Tablo 4 ve 5) Luminol aracılı kemilüminesans sonuçlarının plak indeksi, gingival indeks, sondalanabilir cep derinliği ve lusigenin aracılı kemilüminesans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir Süperoksit radikalinin ölçümünü sağlayan lusigenin aracılı KL düzeylerinin yüksek olması ise iskemik hasarın varlığını da göstermiştir. Lusigenin

aracılı kemilüminesans ise Luminol aracılı KL korelasyonlarına ek olarak Oksidatif stres indeksi ile de ilişkili olup ROM oksidasyon ilişkisini göstermektedir.

TNF-α'nın periodontitisli hastalarda anlamlı derecede yüksek çıkması ile apoptozda dış uyaran rolü üstlenen TNF-α nın ekstrinsik yolağı aktive ettiği görülmektedir. Çeşitli iltihapsal hastalıklarda görülen TNF-α hem apoptoz, hem de iltihap uyarıcı olarak görev almıştır. Ekstrinsik apoptotik yol; aktive edilmiş T hücreler, doğal öldürücü [Natural killer (NK)] hücreler ve makrofajların hedef hücrenin zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatılmaktadır. Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü integral proteinlerdir. Kompleman ölüm aktivatörleri olan FasL ve TNF-α'nın bağlanması ile prokaspaz-8 kaspaz-8'e dönüşmektedir. Böylece kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılmış olur.TNF-α endotel hücrelerinin adezyon moleküllerini üretmek üzere uyararak ve sitokinler için kemotaktik olan kemokinleri üreterek iltihapsal bölgelere nötrofil ve makrofajların yapışmasına aracılık etmektedir. Özellikle son zamanlarda otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler hücreyi apoptoza götürmektedir. Periodontal hastalık sürecinde bu dejenerasyona maruz kalan dişetinde ve kemikte mekanizma tam olarak açıklanamasa da Evre III ve IV periodontitiste apoptotik yolların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ile otoimmün hastalık sürecindeki gibi apoptozun patofizyolojik rolünün keşfedilmesi sağlanabilecektir.

5. SONUÇ

Periodontal hastalığın periodontal yıkım başlama mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Yıkım mekanizmalarından birinin proteolitik enzim ve inhibitörleri ve antioksidan sistem arasındaki homeostatik dengenin bozulması nedeniyle gerçekleştiği düşüncesi[21,22] çalışmamızın sonuçlarıyla desteklenmektedir. Çalışmamızda, Evre III ve IV periodontitis hastalarında hipoksinin ROM artışı ile, ROM artışının apoptoz ile ve tüm bunların periodontal verilerle ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Luminol aracılı kemilüminesans ölçümlerinin ileri düzeydeki artışı şiddetli periodontitis hastalarının DOS örneklerinde serbest radikallerin arttığını göstermiştir. Luminol aracılı kemilüminesans sonuçlarının plak indeksi, gingival indeks, sondalanabilir cep derinliği ve lusigenin aracılı kemilüminesans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir Süperoksit radikalinin yüksek bulunması iskemik hasarın varlığını göstermiştir. Lusigenin aracılı KL ise Luminol aracılı KL korelasyonlarına ek olarak Oksidatif stres indeksi ile de ilişkili olup ROM oksidasyon ilişkisini göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızın bulgularına göre periodontitisli hastalarda apoptozda intrinsik ve ekstrinsik yolaklar aktiftir. Hipoksi, oksidatif stres, apoptoz birbirini birçok yolla tetikleyen bir döngüye sahiptir. Son yıllarda apoptozu düzenleyen birçok proapoptotik ve antiapoptotik protein tanımlanmış olmasına rağmen, apoptotik yolların moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, periodontitis mekanizmasının tam olarak anlaşılması ile hücresel düzeyde hasar meydana gelmeden oksidasyon ve apoptoz mekanizmalarına etki eden tedavi seçeneklerinin ve kullanılacak terapötik ajanların keşfedilmesini de sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Dumitrescu, A. L. *Etiology and pathogenesis of periodontal disease*. *Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease* (2010). doi:10.1007/978-3-642-03010-9
2. Slots, J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontology 2000* (2005). doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00109.x
3. Consensus Report Periodontal Diseases: Pathogenesis and Microbial Factors. *Ann. Periodontol.* (2010). doi:10.1902/annals.1996.1.1.926
4. Lamster, I. B. & Novak, M. J. Host mediators in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (1992). doi:10.1177/10454411920030010501
5. Michalowicz, B. S. *et al.* Periodontal Findings in Adult Twins. *J. Periodontol.* (2012). doi:10.1902/jop.1991.62.5.293
6. Palmer, R. M., Wilson, R. F., Hasan, A. S. & Scott, D. A. Mechanisms of action of environmental factors - Tobacco smoking. in *Journal of Clinical Periodontology* (2005). doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00786.x
7. Hajishengallis, G. Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology* (2015). doi:10.1038/nri3785
8. Costerton, J. W. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* (1995). doi:10.1007/BF01569816
9. Gotsman, I. *et al.* Periodontal Destruction Is Associated With Coronary Artery Disease and Periodontal Infection With Acute Coronary Syndrome. *J. Periodontol.* (2007). doi:10.1902/jop.2007.060301
10. Khader, Y. S., Dauod, A. S., El-Qaderi, S. S., Alkafajei, A. & Batayha, W. Q. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: A meta-analysis. *J. Diabetes Complications* (2006). doi:10.1016/j.jdiacomp.2005.05.006
11. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.***186**, 1–85 (1990).
12. Scandalios, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2005). doi:10.1590/S0100-879X2005000700003
13. Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P. & Victor, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell.*

Longev.(2016). doi:10.1155/2016/1245049

14. Shapira, L., Borinski, R., Sela, M. N. & Soskolne, A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* (1991). doi:10.1111/j.1600-051X.1991.tb01118.x
15. R.E., M. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J. Ind. Microbiol.* (1995). doi:10.1007/BF01569826
16. Chapple, I. L. C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.* (1997). doi:10.1111/j.1600-051X.1997.tb00760.x
17. Chapple, I. L. C. & Matthews, J. B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol. 2000* (2007). doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00178.x
18. Nibali, L., Farias, B. C., Vajgel, A., Tu, Y. K. & Donos, N. Tooth loss in aggressive periodontitis: A systematic review. *Journal of Dental Research* (2013). doi:10.1177/0022034513501878
19. McClean, C., Harris, R. A., Brown, M., Brown, J. C. & Davison, G. W. Effects of Exercise Intensity on Postexercise Endothelial Function and Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2015). doi:10.1155/2015/723679
20. Liu, C. *et al.* The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage. *Frontiers in Physiology* (2017). doi:10.3389/fphys.2017.00439
21. Chapple, I. L. C., Milward, M. R. & Dietrich, T. The Prevalence of Inflammatory Periodontitis Is Negatively Associated with Serum Antioxidant Concentrations. *J. Nutr.* (2018). doi:10.1093/jn/137.3.657
22. Brock, G. R., Butterworth, C. J., Matthews, J. B. & Chapple, I. L. C. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J. Clin. Periodontol.* (2004). doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00509.x
23. Polson, A. M. & Goodson, J. M. Periodontal Diagnosis: Current Status and Future Needs. *J. Periodontol.* (2012). doi:10.1902/jop.1985.56.1.25
24. Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A. & Crawford, A. Studies of the Microbiology of Periodontosis. *J. Periodontol.* (2010). doi:10.1902/jop.1976.47.7.373
25. Kolenbrander, P. E. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and

Genetic Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* (2002). doi:10.1146/annurev.micro.54.1.413

26. Lourenço, T. G. B. *et al.* Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J. Clin. Periodontol.* (2014). doi:10.1111/jcpe.12302
27. Pérez-Chaparro, P. J. *et al.* Newly identified pathogens associated with periodontitis: A systematic review. *Journal of Dental Research* (2014). doi:10.1177/0022034514542468
28. Pérez-Chaparro, P. J. *et al.* The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J. Periodontol.* (2016). doi:10.1902/jop.2016.160184
29. Darveau, R. P. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* (2010). doi:10.1038/nrmicro2337
30. Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* (1999). doi:10.1902/annals.1999.4.1.1
31. Okuda, K., Kato, T. & Ishihara, K. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Diseases* (2004). doi:10.1046/j.1354-523X.2003.00979.x
32. Palmer, J. *et al.* Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol.* (2001). doi:10.1016/S0076-6879(01)37028-3
33. Swift, S. *et al.* Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in Microbial Physiology* (2001). doi:10.1016/S0065-2911(01)45005-3
34. Wade, W. G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* (2013). doi:10.1016/j.phrs.2012.11.006
35. Haubek, D. *et al.* Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* (2008). doi:10.1016/S0140-6736(08)60135-X
36. Amaliya, A. *et al.* Java project on periodontal diseases: Periodontal bone loss in relation to environmental and systemic conditions. *J. Clin. Periodontol.* (2015). doi:10.1111/jcpe.12381
37. Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive

periodontitis? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* (2002). doi:10.1034/j.1600-051X.29.s3.1.x

38. Mäntylä, P. *et al.* Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J. Periodontal Res.* (2003). doi:10.1034/j.1600-0765.2003.00677.x
39. Kinane, D. F., Demuth, D. R., Gorr, S.-U., Hajishengallis, G. N. & Martin, M. H. Human variability in innate immunity. *Periodontol. 2000* (2007). doi:10.1111/j.1600-0757.2007.00220.x
40. Kinane, D. F. & Hajishengallis, G. Polymicrobial infections, biofilms, and beyond. *J. Clin. Periodontol.* (2009). doi:10.1111/j.1600-051x.2009.01396.x
41. Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* (2012). doi:10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x
42. Feres, M., Teles, F., Teles, R., Figueiredo, L. C. & Faveri, M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontology 2000* (2016). doi:10.1111/prd.12136
43. Benakanakere, M. & Kinane, D. F. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. in *Periodontal Disease* (2011). doi:10.1159/000329670
44. Graves, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J. Periodontol.* (2008). doi:10.1902/jop.2008.080183
45. Gemmell, E., Marshall, R. I. & Seymour, G. J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol. 2000* (1997). doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00194.x
46. Sorsa, T. *et al.* Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival creviclular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000* (2016). doi:10.1111/prd.12101
47. Bruce L Pihlstrom, Bryan S Michalowicz, N. W. J. Periodontal diseases. *Nutr. Asp. Aging Vol. 2* (2018). doi:10.1201/9781351075145
48. Avezov, K., Reznick, A. Z. & Aizenbud, D. Oxidative stress in the oral cavity: Sources and pathological outcomes. *Respir. Physiol. Neurobiol.* (2015). doi:10.1016/j.resp.2014.10.007
49. Nibali, L. & Donos, N. Periodontitis and Redox Status: A Review. *Curr. Pharm.*

Des. (2013). doi:10.2174/1381612811319150003

50. Maekawa, T. *et al.* Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe* (2014). doi:10.1016/j.chom.2014.05.012
51. Wright, C. J., Wu, H., Melander, R. J., Melander, C. & Lamont, R. J. Disruption of heterotypic community development by Porphyromonas gingivalis with small molecule inhibitors. *Mol. Oral Microbiol.* (2014). doi:10.1111/omi.12060
52. Hajishengallis, G., Lamont, R. J. & Graves, D. T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence* (2015). doi:10.4161/21505594.2014.990806
53. Sheikhi, M., Gustafsson, A. & Jarstrand, C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by Fusobacterium nucleatum-activated leukocytes: A possible pathogenic factor in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* (2000). doi:10.1034/j.1600-051x.2000.027010758.x
54. Tang, B. *et al.* Fusobacterium nucleatum-induced impairment of autophagic flux enhances the expression of proinflammatory cytokines via ROS in Caco-2 cells. *PLoS One* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0165701
55. Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. The polymicrobial synergy and dysbiosis model of periodontal disease pathogenesis. in *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology* (2016). doi:10.1002/9781118982907.ch14
56. Shin, J. E., Baek, K. J., Choi, Y. S. & Choi, Y. A periodontal pathogen Treponema denticola hijacks the Fusobacterium nucleatum-driven host response. *Immunol. Cell Biol.* (2013). doi:10.1038/icb.2013.35
57. Eun, M. C., Kim, G. H. & Yong, S. L. Atractylodes japonica root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Phyther. Res.* (2009). doi:10.1002/ptr.2813
58. Burdon, R. H., Gill, V. & Alliangana, D. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free Radic. Res.* (1996). doi:10.3109/10715769609088004
59. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* (1991). doi:10.1016/0002-9343(91)90279-7
60. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P. & Salvemini, D. Antioxidant therapy: A

new pharmacological approach in shock, inflammation, & ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* (2001).

61. Battino, M., Bullon, P., Wilson, M. & Newman, H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* (1999). doi:10.1177/10454411990100040301
62. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, second edition. *Free Radic. Biol. Med.* (1991). doi:10.1016/0891-5849(91)90055-8
63. Sies, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* (1997). doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024
64. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.90.17.7915
65. Ower, P. C., Ciantar, M., Newman, H. N., Wilson, M. & Bulman, J. S. The effects on chronic periodontitis of a subgingivally-placed redox agent in a slow release device. *J. Clin. Periodontol.* (1995). doi:10.1111/j.1600-051X.1995.tb00184.x
66. Çanakçi, C. F., Çiçek, Y. & Çanakçi, V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)* (2005). doi:10.1007/s10541-005-0161-9
67. Waddington, R., Moseley, R. & Embery, G. Periodontal Disease Mechanisms: Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* (2010). doi:10.1111/j.1601-0825.2000.tb00325.x
68. Demple, B. & Harrison, L. Repair of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* (2003). doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.004411
69. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. & Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* (1992).
70. NOHL, H. & HEGNER, D. Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* (1978). doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12051.x
71. Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. & Ames, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994).
72. Satoh, M. S. & Lindahl, T. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. in *Cancer Research* (1994).
73. Weighardt, H. *et al.* Increased Resistance Against Acute Polymicrobial Sepsis in

Mice Challenged with Immunostimulatory CpG Oligodeoxynucleotides Is Related to an Enhanced Innate Effector Cell Response. *J. Immunol.* (2014). doi:10.4049/jimmunol.165.8.4537

74. Segal, A. W. & Abo, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.* (1993). doi:10.1016/0968-0004(93)90051-N
75. Ahluwalia, J. *et al.* The large-conductance Ca2+-activated K+ channel is essential for innate immunity. *Nature* (2004). doi:10.1038/nature02356
76. Reeves, E. P. *et al.* Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K+ flux. *Nature* (2002). doi:10.1038/416291a
77. Skalerič, U., Manthey, C. M., Mergenhagen, S. E., Gašpirc, B. & Wahl, S. M. Superoxide release and superoxide dismutase expression by human gingival fibroblasts. *Eur. J. Oral Sci.* (2000). doi:10.1034/j.1600-0722.2000.90771.x
78. Epstein, F. Tissue Destruction by Neutrophils. *N. Engl. J. Med.* (1989). doi:10.1056/NEJM198902093200606
79. SUOMALAINEN, K. *et al.* Hypochlorous acid induced activation of human neutrophil and gingival crevicular fluid collagenase can be inhibited by ascorbate. *Eur. J. Oral Sci.* (1991). doi:10.1111/j.1600-0722.1991.tb01047.x
80. Schraufstatter, I. U. *et al.* Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J. Clin. Invest.* (1990). doi:10.1172/JCI114472
81. Sutton, H. C. & Winterbourn, C. C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. *Free Radic. Biol. Med.* (1989). doi:10.1016/0891-5849(89)90160-3
82. Aronovitch, J., Godinger, D., Samuni, A. & Czapski, G. Ascorbic acid oxidation and DNA scission catalyzed by iron and copper chelates. *Free Radic. Res.* (1987). doi:10.3109/10715768709065289
83. Krinsky, N. I. Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Exp. Biol. Med.* (2013). doi:10.3181/00379727-200-43429
84. Kanofsky, J. R., Hoogland, H., Wever, R. & Weiss, S. J. Singlet oxygen production by human eosinophils. *J. Biol. Chem.* (1988).
85. Kanofsky, J. R. & Sima, P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* (1991).
86. Foote, C. S. Photosensitized Oxygenations and the Role of Singlet Oxygen. *Acc. Chem. Res.* (1968). doi:10.1021/ar50004a002

87. Miller, D. M., Buettner, G. R. & Aust, S. D. Transition metals as catalysts of 'autoxidation' reactions. *Free Radic. Biol. Med.* (1990). doi:10.1016/0891-5849(90)90148-C

88. Cadenas, E. & Sies, H. The lag phase. *Free Radic. Res.* (1998). doi:10.3109/10715769809065816

89. Kovacic, P., Pozos, R., Somanathan, R., Shangari, N. & O'Brien, P. Mechanism of Mitochondrial Uncouplers, Inhibitors, and Toxins: Focus on Electron Transfer, Free Radicals, and Structure -Activity Relationships. *Curr. Med. Chem.* (2005). doi:10.2174/092986705774370646

90. Ignarro, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* (1991). doi:10.1016/0006-2952(91)90618-F

91. Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* (1991).

92. Chang, Y. C. *et al.* Cytotoxicity and arecoline mechanisms in human gingival fibroblasts in vitro. *Clin. Oral Investig.* (2001). doi:10.1007/s007840000085

93. Castro, L., Rodriguez, M. & Radi, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* (1994).

94. Szabó, C., Day, B. J. & Salzman, A. L. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett.* (1996). doi:10.1016/0014-5793(96)00087-7

95. Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. & Lipton, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1995).

96. Salgo, M. G., Squadrito, G. L. & Pryor, W. A. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995). doi:10.1006/bbrc.1995.2578

97. Droy-lefaix, M. T., Drouet, Y., Geraud, G., Hosford, D. & Braquet, P. Superoxide dismutase (SOD) and the paf-antagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. *Free Radic. Res.* (1991). doi:10.3109/10715769109145852

98. Haglind, E., Xia, G. C. & Rylander, R. EFFECTS OF ANTIOXIDANTS AND PAF RECEPTOR ANTAGONIST IN INTESTINAL SHOCK IN THE RAT. *CIRC.SHOCK* (1994).

99. DEITCH, E. A. *et al.* Hemorrhagic Shock-induced Bacterial Translocation: The Role of Neutrophils and Hydroxyl Radicals. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* (1990). doi:10.1097/00005373-199008000-00002

100. Dix, T. A. & Aikens, J. Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation. *Chem. Res. Toxicol.* (1993). doi:10.1021/tx00031a001

101. Dix, T. A. *et al.* Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydrodioxyl (perhydroxyl) radical. *Biochemistry* (1996). doi:10.1021/bi952010w

102. Halliwell, B., Clement, M. V. & Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* (2000). doi:10.1016/S0014-5793(00)02197-9

103. Abe, J. I. & Berk, B. C. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* (1999). doi:10.1074/jbc.274.30.21003

104. Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κB transcription factor. *Cell* (1988). doi:10.1016/0092-8674(88)90382-0

105. Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* (1991).

106. Roebuck, K. A. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *International journal of molecular medicine* (1999).

107. Clément, M. V., Ponton, A. & Pervaiz, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett.* (1998). doi:10.1016/S0014-5793(98)01410-0

108. Hampton, M. B. & Orrenius, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: Implications for apoptosis. *FEBS Lett.* (1997). doi:10.1016/S0014-5793(97)01068-5

109. Naseem, K. M. & Bruckdorfer, K. R. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets. *Biochem. J.* (2015). doi:10.1042/bj3100149

110. Halliwell, B., Zhao, K. & Whiteman, M. The gastrointestinal tract: A major site of

antioxidant action? *Free Radic. Res.* (2000). doi:10.1080/10715760000301341

111. Carlsson, J. Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J. Oral Pathol. Med.* (1987). doi:10.1111/j.1600-0714.1987.tb02077.x
112. Fu, S., Hick, L. A., Sheil, M. M. & Dean, R. T. Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acid, peptide, and protein molecules. *Free Radic. Biol. Med.* (1995). doi:10.1016/0891-5849(95)00021-O
113. KOPOLDOVA, J. & LIEBSTER, J. THE MECHANISM OF THE RADIATION CHEMICAL DEGRADATION OF AMINO ACIDS. V. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* (1963). doi:10.1016/0020-708X(63)90012-7
114. Jayson, G. G., Scholes, G. & Weiss, J. Formation of formylkynurenine by the action of X-rays on tryptophan in aqueous solution. *Biochem. J.* (2015). doi:10.1042/bj0570386
115. Uchida, K. & Kawakishi, S. 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett.* (1993). doi:10.1016/0014-5793(93)80632-5
116. Mohsenin, V. & Gee, J. L. Oxidation of alpha 1-protease inhibitor: role of lipid peroxidation products. *J. Appl. Physiol.* (2017). doi:10.1152/jappl.1989.66.5.2211
117. Monboisse, J. C., Braquet, P., Randoux, A. & Borel, J. P. Non-enzymatic degradation of acid-soluble calf skin collagen by superoxide ion: Protective effect of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* (1983). doi:10.1016/0006-2952(83)90651-2
118. Doolittle, R. F. The Multiplicity of Domains in Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* (1995). doi:10.1146/annurev.biochem.64.1.287
119. Petersen, S. V. *et al.* Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M310217200
120. Kawai, Y., Kubota, E. & Okabe, E. Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J. Dent. Res.* (2000). doi:10.1177/00220345000790071001
121. Tiku, M. L., Liesch, J. B. & Robertson, F. M. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J. Immunol.* (1990).
122. Henrotin, Y. *et al.* Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Rheumatology* (1993). doi:10.1093/rheumatology/32.7.562

123. Hiran, T. S., Moulton, P. J. & Hancock, J. T. Detection of superoxide and NAPDH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* (1997). doi:10.1016/S0891-5849(97)00054-3

124. Ueno, T., Yamada, M., Sugita, Y. & Ogawa, T. N-acetyl cysteine protects TMJ chondrocytes from oxidative stress. *J. Dent. Res.* (2011). doi:10.1177/0022034510388035

125. Rasik, A. M. & Shukla, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int. J. Exp. Pathol.* (2000). doi:10.1046/j.1365-2613.2000.00158.x

126. Sakallioğlu, U. *et al.* Reactive oxygen species scavenging activity during periodontal mucoperiosteal healing: An experimental study in dogs. *Arch. Oral Biol.* (2005). doi:10.1016/j.archoralbio.2005.03.012

127. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. & Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* (2004).

128. Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Gadbail, A. R., Sharma, A. & Tekade, S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncology* (2014). doi:10.1016/j.oraloncology.2013.09.011

129. Chitra, S., Balasubramaniam, M. & Hazra, J. Effect of α-tocopherol on salivary reactive oxygen species and trace elements in oral submucous fibrosis. *Ann. Clin. Biochem.* (2012). doi:10.1258/acb.2011.011050

130. Trueba, G. P. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Front. Biosci.* (2004). doi:10.2741/1335

131. Barut, O., Vural, P., Şirin, Ş., Aydin, S. & Dizdar, Y. The oxidant/antioxidant status and cell death mode in oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol. Scand.* (2012). doi:10.3109/00016357.2011.600720

132. Yowtak, J. *et al.* Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* (2011). doi:10.1016/j.pain.2010.12.034

133. Mao, Y. F. *et al.* Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. *Brain Res.* (2009). doi:10.1016/j.brainres.2008.10.073

134. Kim, H. K. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* (2004). doi:10.1016/j.pain.2004.06.008

135. Kuhad, A., Sharma, S. & Chopra, K. Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain* (2008). doi:10.1016/j.ejpain.2007.10.008

136. Mika, J., Osikowicz, M., Makuch, W. & Przewlocka, B. Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* (2007). doi:10.1016/j.ejphar.2007.01.013

137. Brotto, M. A. & Nosek, T. M. Hydrogen peroxide disrupts Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* (2017). doi:10.1152/jappl.1996.81.2.731

138. Barclay, J. K. & Hansel, M. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (2011). doi:10.1139/y91-043

139. Frankiewicz-Jóźko, A. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatine kinase during the post exercise period in rats. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* (1996). doi:10.1007/BF02337728

140. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* (1997).

141. Box, H. C., Freund, H. G., Budzinski, E. E., Wallace, J. C. & MacCubbin, A. E. Free Radical-Induced Double Base Lesions. *Radiat. Res.* (2006). doi:10.2307/3579095

142. Halliwell, B. & Dizdaroglu, M. Commentary the measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic. Res.* (1992). doi:10.3109/10715769209049161

143. Ishikawa, I. Host responses in periodontal diseases: A preview. *Periodontology 2000* (2007). doi:10.1111/j.1600-0757.2006.00188.x

144. Kalpakcioglu, B. & Şenel, K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* (2008). doi:10.1007/s10067-007-0746-3

145. Tsimikas, S. Oxidative Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.* (2006). doi:10.1016/j.amjcard.2006.09.015

146. Zhao, Y. *et al.* Unravelling the relationship between macroautophagy and mitochondrial ROS in cancer therapy. *Apoptosis* (2016). doi:10.1007/s10495-016-1236-3

147. Chapple, I. L. C., Brock, G., Eftimiadi, C. & Matthews, J. B. Glutathione in

gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* (2002). doi:10.1136/mp.55.6.367

148. D'Aiuto, F. *et al.* Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J. Dent. Res.* (2010). doi:10.1177/0022034510375830
149. Baltacıoğlu, E. *et al.* Total Oxidant Status and Bone Resorption Biomarkers in Serum and Gingival Crevicular Fluid of Patients With Periodontitis. *J. Periodontol.* (2013). doi:10.1902/jop.2013.130012
150. Thomas, B., Madani, S. M., Prasad, B. R. & Kumari, S. Comparative evaluation of serum antioxidant levels in periodontally diseased patients: An interventional study. *Contemp. Clin. Dent.* (2014). doi:10.4103/0976-237X.137938
151. Patil, V. S., Patil, V. P., Gokhale, N., Acharya, A. & Kangokar, P. Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: Oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury. *J. Clin. Diagnostic Res.* (2016). doi:10.7860/JCDR/2016/17350.7542
152. Zhang, C. Z. *et al.* Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science* (2016). doi:10.1038/ijos.2016.38
153. Diab-Ladki, R., Pellat, B. & Chahine, R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin. Oral Investig.* (2003). doi:10.1007/s00784-003-0208-5
154. Miricescu, D. *et al.* Salivary biomarkers: Relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontol. Scand.* (2014). doi:10.3109/00016357.2013.795659
155. Zhang, T. *et al.* Total Antioxidant Capacity and Total Oxidant Status in Saliva of Periodontitis Patients in Relation to Bacterial Load. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2016). doi:10.3389/fcimb.2015.00097
156. Akalin, F. A., Baltacioğlu, E., Alver, A. & Karabulut, E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* (2007). doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01091.x
157. Wei, D., Zhang, X. L., Wang, Y. Z., Yang, C. X. & Chen, G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust. Dent. J.* (2010). doi:10.1111/j.1834-7819.2009.01123.x

158. Başer, Ü., Gamsız Işık, H., Ateş, G. & Işık, G. The Effect Of İnitial Periodontal Therapy On Saliva And Plasma Total Antioxidant Capacity Of Non-Smoking Periodontitis Patients. *J. Ege Univ. Sch. Dent.* (2016). doi:10.5505/eudfd.2015.59672

159. Mashayekhi, F. *et al.* Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J. Contemp. Dent. Pract.* (2005).

160. Panjamurthy, K., Manoharan, S. & Ramachandran, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* (2005).

161. Tsai, C. C. *et al.* Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.* (2005). doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00818.x

162. Trivedi, S. *et al.* Evaluation of Antioxidant Enzymes Activity and Malondialdehyde Levels in Patients With Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus. *J. Periodontol.* (2013). doi:10.1902/jop.2013.130066

163. Nguyen, T. T., Ngo, L. Q., Promsudthi, A. & Surarit, R. Salivary oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis and acute coronary syndrome. *Clin. Oral Investig.* (2017). doi:10.1007/s00784-016-2029-3

164. Takane, M. *et al.* New Biomarker Evidence of Oxidative DNA Damage in Whole Saliva From Clinically Healthy and Periodontally Diseased Individuals. *J. Periodontol.* (2005). doi:10.1902/jop.2002.73.5.551

165. Sawamoto, Y., Sugano, N., Tanaka, H. & Ito, K. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* (2005). doi:10.1111/j.1399-302X.2005.00215.x

166. Çanakçi, C. F. *et al.* Increased salivary level of 8-hydroxydeoxyguanosine is a marker of premature oxidative mitochondrial DNA damage in gingival tissue of patients with periodontitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* (2009). doi:10.1007/s00005-009-0026-9

167. Su, H. *et al.* Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radic. Biol. Med.* (2009). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.008

168. Mai, S., Muster, B., Bereiter-Hahn, J. & Jendrach, M. Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence life span. *Autophagy* (2012). doi:10.4161/auto.8.1.18174

169. Sezer, U., Çiçek, Y. & Çanakçi, C. F. Increased salivary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine may be a marker for disease activity for periodontitis. *Dis. Markers* (2012). doi:10.3233/DMA-2011-0876

170. Öngöz Dede, F., Özden, F. O. & Avcı, B. 8-Hydroxy-Deoxyguanosine Levels in Gingival Crevicular Fluid and Saliva in Patients With Chronic Periodontitis After Initial Periodontal Treatment. *J. Periodontol.* (2013). doi:10.1902/jop.2012.120195

171. Garrett, I. R. *et al.* Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* (1990). doi:10.1172/JCI114485

172. Fridovich, I. Superoxide Dismutase. in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (2013). doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00129-8

173. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* (1990). doi:10.1016/0003-9861(90)90510-6

174. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1981).

175. Burton, G. W., Joyce, A. & Ingold, K. U. FIRST PROOF THAT VITAMIN E IS MAJOR LIPID-SOLUBLE, CHAIN-BREAKING ANTIOXIDANT IN HUMAN BLOOD PLASMA. *The Lancet* (1982). doi:10.1016/S0140-6736(82)90293-8

176. Stocker, R., Glazer, A. N. & Ames, B. N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1987).

177. Frei, B., England, L. & Ames, B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989). doi:10.1073/pnas.86.16.6377

178. Moore, S., Calder, K. A. C., Miller, N. J. & Rice-Evans, C. A. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic. Res.* (1994). doi:10.3109/10715769409056594

179. Araujo, V., Arnal, C., Boronat, M., Ruiz, E. & Dominguez, C. Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. in *BioFactors* (1998). doi:10.1002/biof.5520080126

180. Kiziltunc, A., Coğalgil, S. & Cerrahoğlu, L. Carnitine and antioxidants levels in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* (1998).

181. Tüter, G., Kurtiş, B. & Serdar, M. Interleukin-1β and Thiobarbituric Acid Reactive

Substance (TBARS) Levels After Phase I Periodontal Therapy in Patients With Chronic Periodontitis. *J. Periodontol.* (2005). doi:10.1902/jop.2001.72.7.883

182. Di Paola, R. *et al.* Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J. Dent. Res.* (2004). doi:10.1177/154405910408300414
183. Di Paola, R. *et al.* Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* (2005). doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00818.x
184. Di Paola, R. *et al.* Reduced development of experimental periodontitis by treatment with M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Eur. J. Pharmacol.* (2005). doi:10.1016/j.ejphar.2005.04.039
185. Lohinai, Z. *et al.* Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J. Dent. Res.* (2001). doi:10.1177/00220345010800021401
186. Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* (2004). doi:10.1038/sj.bjp.0705776
187. Halliwell, B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis.* (2008). doi:10.1111/j.1601-0825.2000.tb00324.x
188. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Klin. Wochenschr.* (1932). doi:10.1007/bf01765224
189. Lockshin, R. A. & Zakeri, Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2001). doi:10.1038/35080097
190. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* (1972). doi:10.1038/bjc.1972.33
191. Renò, F., Sabbatini, M., Massè, A., Bosetti, M. & Cannas, M. Fibroblast apoptosis and caspase-8 activation in aseptic loosening. *Biomaterials* (2003). doi:10.1016/S0142-9612(03)00276-X
192. Abuhussein, H. *et al.* The Role of Factors Associated With Apoptosis in Assessing Periodontal Disease Status. *J. Periodontol.* (2014). doi:10.1902/jop.2013.130095
193. Fischer, U., Jänicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: A comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* (2003). doi:10.1038/sj.cdd.4401160
194. Pileczki, V., Cojocneanu-Petric, R., Maralani, M., Neagoe, I. B. & Sandulescu, R.

MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med.* (2016). doi:10.15386/cjmed-512

195. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010). doi:10.1038/nrm2952
196. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* (2018). doi:10.1038/s41418-017-0012-4
197. Kantari, C. & Walczak, H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2011). doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.026
198. Gewies, A. & Grimm, S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-α-mediated apoptosis. *Br. J. Cancer* (2003). doi:10.1038/sj.bjc.6601297
199. Ellis, R. E., Jacobson, D. M. & Horvitz, H. R. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Genetics* (1991). doi:10.1016/0168-9525(92)90009-s
200. Saraste, A. & Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* (2000). doi:10.1016/S0008-6363(99)00384-3
201. Leist, M. & Jäättelä, M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2001). doi:10.1038/35085008
202. Bantel, H., Beikler, T., Flemmig, T. F. & Schulze-Osthoff, K. Caspase activation is involved in chronic periodontitis. *FEBS Lett.* (2005). doi:10.1016/j.febslet.2005.09.020
203. Tunalı, M., Ataoğlu, T. & Çelik, I. Apoptosis: an underlying factor for accelerated periodontal disease associated with diabetes in rats. *Clin. Oral Investig.* (2014). doi:10.1007/s00784-013-1158-1
204. Tonetti, M. S., Cortellini, D. & Lang, N. P. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infect. Immun.* (1998). doi:10.1128/iai.66.11.5190-5195.1998
205. Jarnbring, F., Somogyi, E., Dalton, J., Gustafsson, A. & Klinge, B. Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and

sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* (2002). doi:10.1034/j.1600-051X.2002.291203.x

206. Uitto, V. J. *et al.* Cytopathic effects of Treponema denticola chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect. Immun.* (1995). doi:10.1128/iai.63.9.3401-3410.1995
207. Leung, W. K., Wu, Q., Hannam, P. M., McBride, B. C. & Uitto, V. J. Treponema denticola may stimulate both epithelial proliferation and apoptosis through MAP kinase signal pathways. *J. Periodontal Res.* (2002). doi:10.1034/j.1600-0765.2002.01007.x
208. Haanen, C. & Vermes, I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm.* (1995). doi:10.1155/S0962935195000020
209. Al-Samadi, A. *et al.* Epithelial cell apoptosis in recurrent aphthous ulcers. *J. Dent. Res.* (2015). doi:10.1177/0022034515581012
210. Hengartner, M. O. Programmed cell death in the nematode C. elegans. in *Recent Progress in Hormone Research* (1999).
211. Bratton, S. B., MacFarlane, M., Cain, K. & Cohen, G. M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* (2000). doi:10.1006/excr.2000.4835
212. Sartorius, U., Schmitz, I. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* (2001). doi:10.1002/1439-7633(20010105)2:1<20::AID-CBIC20>3.0.CO;2-X
213. Denault, J. B. & Salvesen, G. S. Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.* (2002). doi:10.1021/cr010183n
214. Acehan, D. *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* (2002). doi:10.1016/S1097-2765(02)00442-2
215. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* (1999). doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383
216. Chao, D. T. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* (1998). doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395
217. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Chapter 21: Endocrine Organs*. *Histology : a text and*

atlas : with correlated cell and molecular biology (2010).

218. Cudmore, M. J. *et al.* The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat. Commun.* (2012). doi:10.1038/ncomms1977
219. Devine, D. A., Marsh, P. D. & Meade, J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *Journal of Oral Microbiology* (2015). doi:10.3402/jom.v7.26941
220. Du, R. *et al.* HIF1α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* (2008). doi:10.1016/j.ccr.2008.01.034
221. Biddlestone, J., Bandarra, D. & Rocha, S. The role of hypoxia in inflammatory disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine* (2015). doi:10.3892/ijmm.2015.2079
222. Eltzschig, H. K. & Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *New England Journal of Medicine* (2011). doi:10.1056/NEJMra0910283
223. Motohira, H. *et al.* Hypoxia and Reoxygenation Augment Bone-Resorbing Factor Production From Human Periodontal Ligament Cells. *J. Periodontol.* (2007). doi:10.1902/jop.2007.060519
224. Savage, A., Eaton, K. A., Moles, D. R. & Needleman, I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology* (2009). doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01408.x
225. Loesche, W. J., Gusberti, F., Mettraux, G., Higgins, T. & Syed, S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect. Immun.* (1983). doi:10.1128/iai.42.2.659-667.1983
226. Tanaka, M., Hanioka, T., Takaya, K. & Shizukuishi, S. Association of Oxygen Tension in Human Periodontal Pockets With Gingival Inflammation. *J. Periodontol.* (1998). doi:10.1902/jop.1998.69.10.1127
227. Karhausen, J., Haase, V. H. & Colgan, S. P. Inflammatory hypoxia: Role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle* (2005). doi:10.4161/cc.4.2.1407
228. Buduneli, N. & Kinane, D. F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. in *Journal of Clinical Periodontology* (2011). doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x

229. Ghallab, N. A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology* (2018). doi:10.1016/j.archoralbio.2017.12.022

230. Ng, K.-T. *et al.* Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1α in Human Periodontal Tissue. *J. Periodontol.* (2011). doi:10.1902/jop.2010.100100

231. Shi, Q. Y., Huang, S. G., Zeng, J. H. & Fang, X. G. Expression of hypoxia inducible factor-1α and vascular endothelial growth factor-C in human chronic periodontitis. *J. Dent. Sci.* (2015). doi:10.1016/j.jds.2014.09.004

232. Gölz, L. *et al.* Hypoxia and P. gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF-κB activation in PDL cells and periodontal diseases. *Mediators Inflamm.* (2015). doi:10.1155/2015/438085

233. Vasconcelos, R. C. *et al.* Immunoexpression of HIF-1α and VEGF in periodontal disease and healthy gingival tissues. *Braz. Dent. J.* (2016). doi:10.1590/0103-6440201600533

234. Ramakrishnan, S., Anand, V. & Roy, S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (2014). doi:10.1007/s11481-014-9531-7

235. Hu, K. & Olsen, B. R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* (2016). doi:10.1016/j.bone.2016.06.013

236. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* (1992).

237. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. HIF1 α and HIF2 α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer* (2012). doi:10.1038/nrc3183

238. World Health Organization. Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference. *Official Records of the World Health Organization* (1946).

239. Chapple, I. L. C. *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. in *Journal of Clinical Periodontology* (2018). doi:10.1111/jcpe.12940

240. Lang, N. P. & Bartold, P. M. Periodontal health. *J. Clin. Periodontol.* (2018). doi:10.1111/jcpe.12936

241. Tonetti, M. S., Greenwell, H. & Kornman, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Periodontol.* (2018). doi:10.1002/JPER.18-0006

242. Papapanou, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. in *Journal of Clinical Periodontology* (2018). doi:10.1111/jcpe.12946

243. Demirel, K. & Cekici, A. İlk bilen siz olun: Periodontal hastalıkların tanı kriterleri ve sınıflaması çalıştayı. *Quintessence***3**, 73–78 (2020).

244. Carranza, F. A., Newman, M. G., Takei, H. & Klokkedvold, P. Periodontología clínica de Carranza. in *Capitulo 43 - 44* (2014).

245. Brill, N. & Krasse, B. Effect of mechanical stimulation on flow of tissue fluid through gingival pocket epithelium. *Acta Odontol. Scand.* (1959). doi:10.3109/00016355908993927

246. Brill, N. & Krasse, B. O. The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. *Acta Odontol. Scand.* (1958). doi:10.3109/00016355809064110

247. Krasse, B. Serendipity or luck: Stumbling on gingival crevicular fluid. *Journal of Dental Research* (1996). doi:10.1177/00220345960750090201

248. Egelberg, J. Cellular elements in gingival pocket fluid. *Acta Odontol. Scand.* (1963). doi:10.3109/00016356309028193

249. Griffiths, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000* (2003). doi:10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x

250. Cimasoni, G. Crevicular fluid updated. *Monogr. Oral Sci.* (1983).

251. Figueredo, C. M. S., Ribeiro, M. S. M., Fischer, R. G. & Gustafsson, A. Increased Interleukin-1β Concentration in Gingival Crevicular Fluid as a Characteristic of Periodontitis. *J. Periodontol.* (1999). doi:10.1902/jop.1999.70.12.1457

252. Wang, J., Schipper, H. M., Velly, A. M., Mohit, S. & Gornitsky, M. Salivary biomarkers of oxidative stress: A critical review. *Free Radic. Biol. Med.* (2015). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.005

253. De Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. Â. N., De Lima, A. A. S. & Azevedo, L. R. Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice* (2008). doi:10.5005/jcdp-9-3-72

254. Regalado, A. 2017 was the year consumer DNA testing blew up - MIT Technology

Review. *MIT Technology Review: Rewriting Life* (2018).

255. Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H. & Okamoto, A. C. Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases* (2010). doi:10.1016/j.ijid.2009.04.022
256. Lee, Y. H. & Wong, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry* (2009).
257. NAVAZESH, M. Methods for Collecting Saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1993). doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x
258. Silness, J. & Löe, H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* (1964). doi:10.3109/00016356408993968
259. Löe, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J. Periodontol.* (1967). doi:10.1902/jop.1967.38.6.610
260. Badersten, A., Nilveus, R. & Egelberg, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy: II. Severely advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* (1984). doi:10.1111/j.1600-051X.1984.tb01309.x
261. Ainamo, J. & Bay, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.* (1975).
262. Persson, R. & Svensson, A. Assessment of tooth mobility using small loads: I. Technical devices and calculations of tooth mobility in periodontal health and disease. *J. Clin. Periodontol.* (1980). doi:10.1111/j.1600-051X.1980.tb01969.x
263. Kobayashi, H. *et al.* Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J. Androl.* (2001). doi:10.1002/(ISSN)1939-4640
264. Boveris, A. *et al.* Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1980). doi:10.1073/pnas.77.1.347
265. Davies, G. R. *et al.* Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* (1994). doi:10.1136/gut.35.2.179
266. Haklar, G., Sayin-Özveri, E., Yüksel, M., Aktan, A. Ö. & Yalçin, A. S. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Lett.* (2001). doi:10.1016/S0304-3835(01)00421-9
267. Halliwell, B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium* (1995). doi:10.1042/bss0610073

268. Zhang, L., Henson, B. S., Camargo, P. M. & Wong, D. T. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol. 2000* (2009). doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00315.x

269. Celecová, V., Kamodyová, N., Tóthová, Ľ., Kúdela, M. & Celec, P. Salivary markers of oxidative stress are related to age and oral health in adult non-smokers. *J. Oral Pathol. Med.* (2013). doi:10.1111/jop.12008

270. Behuliak, M. *et al.* Variability of thiobarbituric acid reacting substances in saliva. *Dis. Markers* (2009). doi:10.3233/DMA-2009-0606

271. Edgar, W. M. Saliva: Its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.* (1992). doi:10.1038/sj.bdj.4807861

272. Wong, D. T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J. Am. Dent. Assoc.* (2006). doi:10.14219/jada.archive.2006.0180

273. Novaković, N. *et al.* Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srp. Arh. Celok. Lek.* (2013). doi:10.2298/SARH1304163N

274. Novakovic, N. *et al.* Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J. Periodontal Res.* (2014). doi:10.1111/jre.12088

275. Chapple, I. L. C., Brock, G. R., Milward, M. R., Ling, N. & Matthews, J. B. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: Cause or effect? *J. Clin. Periodontol.* (2007). doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01029.x

276. Zhu, C. *et al.* The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* (2005). doi:10.1038/sj.cdd.4401545

277. González, O. A. *et al.* Apoptotic genes are differentially expressed in aged gingival tissue. *J. Dent. Res.* (2011). doi:10.1177/0022034511403744

278. Tamaki, N. *et al.* Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: The Nagasaki Islands study. *Oral Dis.* (2014). doi:10.1111/odi.12127

279. Marcos-Ramiro, B., García-Weber, D. & Millán, J. TNF-induced endothelial barrier disruption: Beyond actin and Rho. *Thrombosis and Haemostasis* (2014). doi:10.1160/TH14-04-0299

280. Sawant, D. A. *et al.* Microvascular endothelial cell hyperpermeability induced by endogenous caspase 3 activator staurosporine. *J. Trauma Acute Care Surg.* (2013). doi:10.1097/TA.0b013e31827a0620

281. Zhou, J., Schmid, T. & Brüne, B. Tumor necrosis factor-α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1α through a nuclear factor-κB-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* (2003). doi:10.1091/mbc.E02-09-0598

282. Manosudprasit, A., Kantarci, A., Hasturk, H., Stephens, D. & Van Dyke, T. E. Spontaneous PMN apoptosis in type 2 diabetes and the impact of periodontitis. *J. Leukoc. Biol.* (2017). doi:10.1189/jlb.4a0416-209rr

283. Aral, K., Aral, C. A. & Kapila, Y. The role of caspase-8, caspase-9, and apoptosis inducing factor in periodontal disease. *J. Periodontol.* (2019). doi:10.1002/JPER.17-0716

284. Bascones, A., Gamonal, J., Gomez, M., Silva, A. & Gonzalez, M. A. New knowledge of the pathogenesis of periodontal disease. *Quintessence Int. (Berl).* (2004).

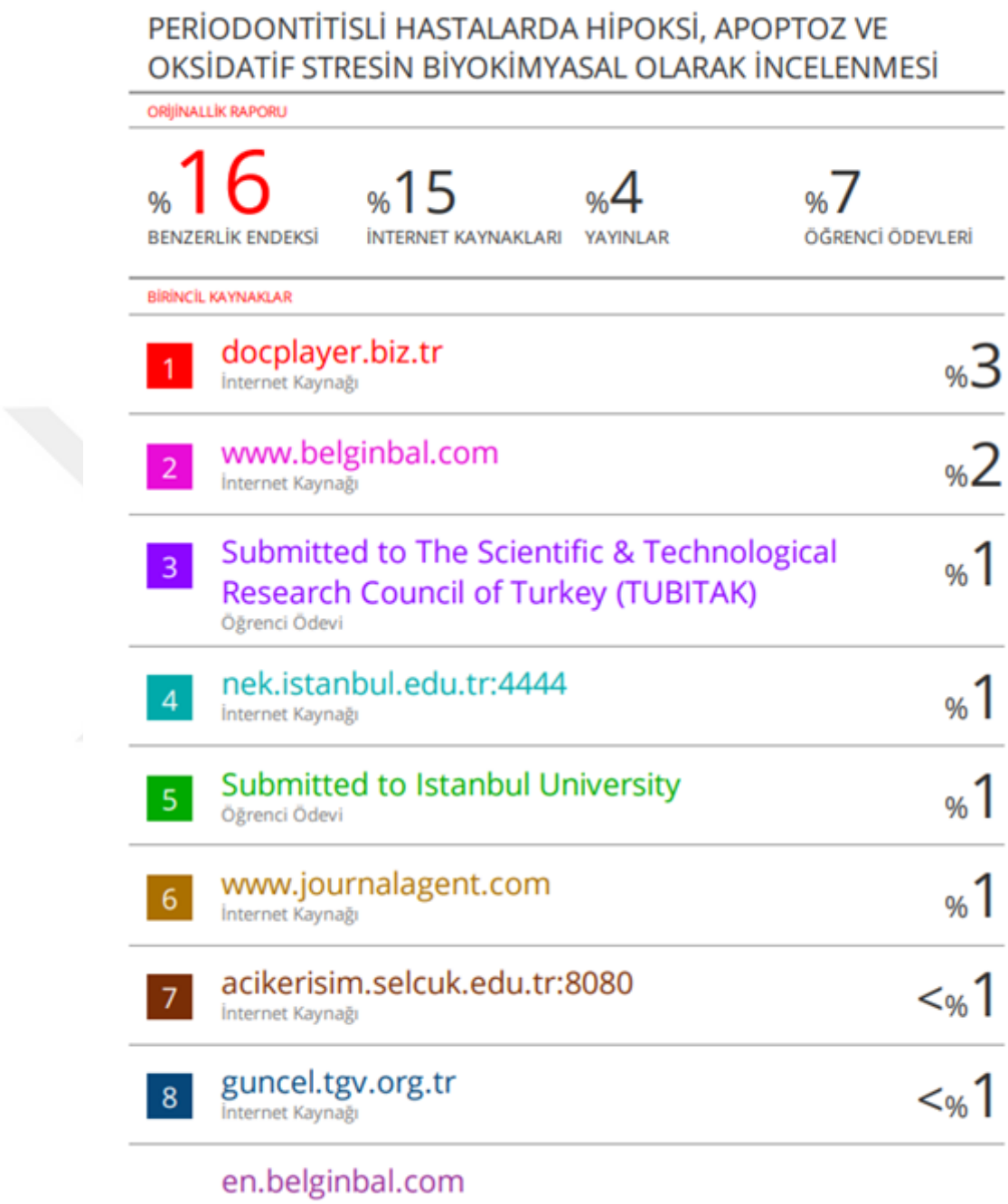
285. Suresh, S. & Mahendra, J. Multifactorial relationship of obesity and periodontal disease. *J. Clin. Diagnostic Res.* (2014). doi:10.7860/JCDR/2014/7071.4227

HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA HİPOKSİ, APOPTOZ VE OKSİDATİF STRESİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%16	%15	%4	%7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%3
2	www.belginbal.com İnternet Kaynağı	%2
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
6	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
7	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	guncel.tgv.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

en.belginbal.com