



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**SAĞLIKLI VE PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE SİGARANIN
DÜZENLEYİCİ T HÜCRESİ BİYOBELİRTEÇLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Kübra BAŞARAN

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA

TOKAT-2024



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**SAĞLIKLI VE PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE SİGARANIN
DÜZENLEYİCİ T HÜCRESİ BİYOBELİRTEÇLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Kübra BAŞARAN

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA

TOKAT-2024

ETİK SÖZLEŞMESİ

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisanüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sağlıklı ve Periodontitisli Bireylerde Sigaranın Düzenleyici T Hücresi Biyobelirteçleri Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı diş hekimliğinde uzmanlık tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

...../...../.....

Tez Yazarı Ad-Soyad, imza

Arş. Gör. Kübra Başaran

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

ADI SOYADI	: Kübra BAŞARAN
TEZ SAVUNMA TARİHİ	: 14/05/2024
TEZ KONUSU	: Sağlıklı ve Periodontitisli Bireylerde Sigaranın Düzenleyici T Hücreleri (Treg) Biyobelirteçleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Hatice BALCI YÜCE	
Üye : Doç. Dr. Özkan KARATAŞ	
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA	

Bu tez, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Fakülte Kurulunun 14/05/2024 tarih ve 07.03 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Dekan V. Prof. Dr. Hatice BALCI YÜCE

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecim boyunca desteğini daima yanımda hissettiğim klinik ve akademik olarak her türlü bilgi birikimini büyük bir özveriyle benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA'ya,

Uzmanlık eğitimimde birlikte çalışmaktan büyük bir mutluluk duyduğum tezimin laboratuvar işlemleri süresince büyük bir özveri ve titizlikle gece gündüz demeden benimle birlikte çalışan, her zaman bana destek olan, moral veren, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı bölümünden değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seda OCAKLI'ya,

Eğitimim süresince gerek akademik alanda gerek diğer alanlarda örnek aldığım, bilgi ve tecrübeleriyle her daim beni aydınlatan, her konuda yardımını esirgemeyen Dekanımız ve Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hatice BALCI YÜCE'ye,

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden beri klinik ve akademik olarak desteğini esirgemeyen, mesleki açıdan gelişimimde büyük bir emeği olan; bana daima yol gösteren, motive eden ve benim için her zaman rol model olacak olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Murat TAŞKAN'a,

Eğitimim boyunca tecrübelerini ve her türlü bilgi birikimini tüm samimiyetiyle paylaşan, beni her konuda destekleyen, tüm sıkıntılarıma çözüm bulan, bitmek bilmez sorularımı cevaplamaktan yorulmayan, daima örnek aldığım, sohbetleriyle hayatıma yön veren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özkan KARATAŞ'a,

Bugünlere gelmemde büyük bir emeği olan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem Gülsüm BAŞARAN, babam Fatih BAŞARAN ve ablam Fulya BAŞARAN’a,

Tezimin laboratuvar kısmında yardımlarını esirgemeyen, keyifle çalıştığım, her konuda destek olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Asiye YANCI’ya,

Uzmanlık dönemim boyunca birlikte çalıştığımız, birlikte büyüdüğümüz, her zaman bana destek olan eş kıdemlim ve sevgili yol arkadaşım Arş. Gör. Sibel ACEL’e,

Beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım, birlikte her zorluğun üstesinden geldiğimiz, beni hep motive eden sevgili çalışma arkadaşlarım Uzm. Dt. Asiye Nur GEYLANİ, Arş. Gör. Zehra Rabia GÖNEN, Arş. Gör. Ali Buğra YANIK, Arş. Gör. Mehmet Raşit BAYSAL, Arş. Gör. Ali Fırat BASUTÇU, Arş. Gör. Kıvanç AYDEMİR, Arş. Gör. Tugay ATEŞ, Arş. Gör. Tuğçe YAPIŞOĞLU ve Arş. Gör. Said KARABULUT’a,

Yaşadığım her sıkıntıda yanımda olan, bu zorlu süreçte de beni yalnız bırakmayan, varlıklarıyla güç veren canım dostlarım Özlem YARBAŞI ve Hatice AYDOĞDU’ya,

Çalıştığım süre boyunca emekleri, güleryüzleri ve destekleriyle yardımcı olan tüm personelimize ve adını buraya yazamadığım üzerimde emeği olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

SAĞLIKLI VE PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE SİGARANIN DÜZENLEYİCİ T HÜCRE Sİ BİYOBELİRTEÇLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Başaran, Kübra

Uzmanlık, Periodontoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gözde IŞIKER KARA

Mayıs 2024, xvii+113 sayfa

Bu çalışmanın amacı sigaranın sağlıklı ve periodontitisli bireylerin diş eti dokularındaki düzenleyici T hücreleri (Treg) biyobelirteçleri olan Forkhead Box Protein 3 (FOXP3), Cluster of Differentiation 69 (CD69), İnterlökin-2 (IL-2), Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 1 (TGF- β 1) ve Janus Kinaz 3 (JAK3) üzerine etkisinin belirlenmesidir. Bu çalışma 15 kadın, 21 erkek olmak üzere, toplam 36 hastanın dâhil edildiği kesitsel bir çalışmadır. Çalışmada sağlıklı grup (7 kadın 2 erkek, Grup A), sigara kullanan sağlıklı grup (4 kadın 5 erkek, Grup B), periodontitis evre III derece C grubu (3 kadın 6 erkek, Grup C) ve sigara kullanan periodontitis evre III derece C grubu (9 erkek, Grup D) olmak üzere toplam 4 grup bulunmaktadır. Bu hastalardan elde edilen diş eti örneklerinde; FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1, JAK3 ekspresyonları epitel doku (ED) ve bağ dokuda (BD) immunohistokimya yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bulgulara göre, Grup C Grup A'ya göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı, daha fazla FOXP3, CD69, IL-2 ekspresyonu göstermektedir ($p < 0,001$). JAK3-BD değerleri de Grup C'de Grup A'ya göre daha yüksektir Grup C'de Grup A'ya göre daha ($p < 0,001$). Grup C'de Grup A'ya

göre TGF- β 1-ED ve JAK3-ED daha düşük ($p < 0,05$); JAK3-BD daha yüksektir ($p < 0,001$). Grup B Grup A'ya göre daha düşük TGF- β 1-ED ($p < 0,05$), daha yüksek IL-2-BD, CD69-ED, CD69-BD, FOXP3-ED ve JAK-BD değerleri göstermektedir ($p < 0,001$). Grup D Grup C'ye göre daha yüksek CD69-ED, IL-ED, TGF- β 1-BD değerleri; daha düşük FOXP3-BD değerleri göstermektedir ($p < 0,001$). Sonuç olarak; periodontitiste FOXP3, CD69, IL-2 ekspresyonu artmakta; TGF- β 1 ve JAK3 değerleri ise epitelde azalmakta, bağ dokuda artmaktadır. Sigara CD69 ve IL-2 ekspresyonunu uyarmakta; FOXP3 ve JAK3 ekspresyonunu sağlıklı bireylerde uyarmakta, FOXP3'ü periodontitisli bireylerde baskılamaktadır. Sigara TGF- β 1 ekspresyonunu ise sağlıklı bireylerde epitel üzerinden baskılamakta hastalıklı bireylerde bağ doku üzerinden uyarmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Treg, FOXP3, JAK3, Periodontitis, Sigara

Kübra BAŞARAN, Uzmanlık Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Tokat, 2024

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SMOKING ON REGULATORY T CELL BIOMARKERS IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PERIODONTITIS PATIENTS

Başaran, Kübra

Specialization, Department of Periodontology

Thesis Advisor: Asst. Prof. Gözde IŞIKER KARA

May 2024, xvii+113 pages

The aim of this study is to determine the effects of smoking which are biomarkers of regulatory T cells (Treg) on Forkhead Box Protein 3 (FOXP3), Cluster of Differentiation 69 (CD69), Interleukin-2 (IL-2), Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF- β 1) and Janus Kinase 3 (JAK3) in the gingival tissues of healthy individuals and individuals with periodontitis. This study is a cross-sectional study including a total of 36 patients, 21 males and 15 females. In the study there are a total of 4 groups including, healthy group (7 women and 2 men, group A), healthy group of smokers (4 women and 5 men, group B), periodontitis stage III degree C group (3 women and 6 men, group C) and smoker periodontitis stage III degree C group (9 men, group D). In the gingival tissue samples obtained from these patients; FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1, JAK3 expressions were evaluated by immunohistochemistry method in epithelial tissue (ED) and connective tissue (BD). According to the findings, Group C shows statistically significant higher FOXP3, CD69, IL-2 expression compared to Group A ($p < 0.001$). JAK3-BD values are also higher in Group C than in Group A ($p < 0.001$). TGF- β 1-ED and JAK3-ED were lower in Group C than in Group A ($p < 0.05$); JAK3-BD is higher ($p < 0.001$). Group B

shows lower TGF- β 1-ED ($p < 0.05$), higher IL-2-BD, CD69-ED, CD69-BD, FOXP3-ED and JAK-BD values than Group A ($p < 0,001$). Group D has higher CD69-ED, IL-ED, TGF- β 1-BD values and lower FOXP3-BD values than than Group C ($p < 0.001$). In conclusion; FOXP3, CD69, IL-2 expression increases in periodontitis; TGF- β 1 and JAK3 values decrease in the epithelium and increase in the connective tissue. Smoking stimulates CD69 and IL-2 expression. It stimulates FOXP3 and JAK3 expression in healthy individuals and suppresses FOXP3 in individuals with periodontitis. Smoking suppresses TGF- β 1 expression through the epithelium in healthy individuals and stimulates it through the connective tissue in diseased individuals.

Keywords: Treg, FOXP3, JAK3, periodontitis, smoking

Kübra BAŞARAN, Thesis
Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Dentistry
Tokat, 2024

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞMESİ	i
JÜRİ KABUL VE ONAYI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2. İLGİLİ ARAŞTIRMALAR	4
2.1. PERİODONSIYUMUN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.1.1. Diş Eti	4
2.1.2. Periodontal Ligament (PDL)	6
2.1.3. Sement	7
2.1.4. Alveol kemiği.....	7
2.2. PERİODONTAL DOKULARDA SAĞLIK	8
2.3. PERİODONTAL HASTALIK	8
2.4. PERİODONTAL HASTALIKLARIN SINIFLANDIRILMASI	9
2.5. PERİODONTAL HASTALIKLARIN PATOGENEZİ	16
2.5.1. Periodontal Hastalıklarda Enflamasyon.....	18
2.5.2. Alveoler Kemik Rezorpsiyonunda Etkili Biyobelirteçler.....	19
2.5.3. Periodontal Hastalıklarda Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık	20
2.6. PERİODONTAL SAĞLIK VE HASTALIK DURUMLARININ T LENFOSİTLERLE İLİŞKİSİ	23
2.6.1. T Lenfositlerin Alt Kümeleri	23
2.6.2. T Lenfosit Alt kümelerinin Periodontal Hastalıklardaki Rolü.....	29
2.6.3. Treg ile ilişkili Biyobelirteçler (FOXP3, CD69, IL-2, TGF-β1, JAK3).....	32
2.7. SİĞARA VE PERİODONTAL SAĞLIK.....	44
2.7.1. Sigaranın Periodontal Dokular Üzerindeki Etkileri.....	45
2.7.2. Sigaranın Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkileri	47

2.7.3. Sigaranın Treg ile İlişkili Biyobelirteçler Üzerindeki Etkisi	49
3. YÖNTEM	52
3.1. HASTA SEÇİM KRİTERLERİ.....	52
3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI	53
3.3. KLİNİK PERİODONTAL ÖLÇÜMLER.....	54
3.3.1. Plak İndeksi (Pİ)	54
3.3.2. Gingival İndeks (Gİ).....	55
3.3.3. Sondalamada Cep Derinliği (CD).....	56
3.3.4. Sondalamada Kanama (SK).....	56
3.3.5. Klinik Ataçman Seviyesi (AS)	56
3.4. DİŞ ETİ ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ	56
3.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	56
3.5.1. İmmünohistokimyasal H Skor Analizi	58
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	59
4. BULGULAR VE YORUMLAR	61
4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR.....	61
4.2. KLİNİK BULGULAR.....	62
4.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	64
5. LİMİTASYONLAR.....	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92
7. KAYNAKÇA.....	94
EK-1.....	109
EK-2.....	111
ÖZGEÇMİŞ	1133

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Diş Eti Hastalıkları ve Mekanizması.....	9
Şekil 2.2: Periodontal Hastalık Şeması.....	11
Şekil 2.3: Periodontal Dokularda Kemik Rezorpsiyonuna Aracılık Eden İmmün Hücreler.....	20
Şekil 2.4: CD4+Treg hücre alt gruplarının farklılaşması.....	28
Şekil 2.5: Treg/Th17 dengesi.....	34
Şekil 2.6: CD69 ve sfingozin-1-fosfat reseptörü (S1P1) tarafından oluşturulan sinyalin TH1/TH17 ve Treg hücre farklılaşması üzerine etkisi.....	36
Şekil 2.7: IL-2 sitokin ailesinin JAK/STAT yolunu aktive ederek (hücre içi sinyalleri uyarması) çeşitli STAT proteinlerini fosforile etmesi.....	38
Şekil 2.8: Periodontal hastalıklarda JAK/STAT yolu mekanizması.....	43
Şekil 2.9: Nikotin tarafından düzenlenen enflamatuvar hastalıklar, ilgili organlar ve hücreler.....	45
Şekil 4.1: FOXP3 H Skor Değerleri Grafiği.....	64
Şekil 4.2: FOXP3'ün İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	66
Şekil 4.3: CD69 H Skor Değerleri Grafiği.....	67
Şekil 4.4: CD69'un İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	68
Şekil 4.5: IL-2 H Skor Değerleri Grafiği.....	69

Şekil 4.6: IL-2'nin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	70
Şekil 4.7: TGF- β 1 H Skor Değerleri Grafiği.....	71
Şekil 4.8: TGF- β 1'in İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	72
Şekil 4.9: JAK3 H Skor Değerleri Grafiği.....	73
Şekil 4.10: JAK3'ün İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	74



TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Periodontitis Evreleme Tablosu.....	14
Tablo 2.2: Periodontitis Derecelendirme Tablosu.....	16
Tablo 4.1: Gruplara Göre Cinsiyet Dağılımı Tablosu.....	61
Tablo 4.2: Gruplara Göre Yaş Dağılımı Tablosu.....	61
Tablo 4.3: Yaş ve Belirteçler Arasındaki Korelasyon Analizi Tablosu.....	62
Tablo 4.4: Klinik Parametrik Bulguların Gruplara Göre Dağılım Tablosu.....	62
Tablo 4.5: Biyobelirteç Değerlerinin Epitel ve Bağ Dokuda Gruplara Göre Karşılaştırılması Tablosu.....	64
Tablo 4.6: Biyobelirteçlerin Epitel Doku Değerleri Arasındaki Korelasyon Analizi Tablosu.....	75
Tablo 4.7: Biyobelirteçlerin Bağ Doku Değerleri Arasındaki Korelasyon Analizi Tablosu.....	75

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

% : Yüzde

<: Küçüktür

>: Büyüktür

≤: Küçük eşit

≥: Büyük eşit

°C: Santigrad derece

µm: Mikro metre

Akt: Protein kinaz B

APC: Antijen sunan hücre

BD: Bağ doku

BMP: Kemik morfojenik protein

CD4: Yüzey farklılaşma antijeni 4

CD45RO: Hafıza T hücresi

CD69: Yüzey farklılaşma antijeni 69

CRP: C reaktif protein

CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili inhibitör molekül 4

DC: Dendritik hücre

ED: Epitel doku

FOXP3: Forkhead box protein 3

Gal-1: Galektin-1

GI: Gingival indeks

GITR: Glukokortikoidle indüklenen TNF reseptörü

HbA1c: Hemoglobin A1c

IFN- γ : İnterferon-gama

Ig: İmmünoglobulin

IgA: İmmunoglobulin A

IgE: İmmunoglobulin E

IgG: İmmunoglobulin G

IL-1: İnterlökin 1

IL-10: İnterlökin 10

IL-12: İnterlökin 12

IL-13: İnterlökin 13

IL-15: İnterlökin 15

IL-17: İnterlökin 17

IL-17A: İnterlökin 17A

IL-2: İnterlökin 2

IL-21: İnterlökin 21

IL-23: İnterlökin 23

IL-2Ra: IL-2 reseptör α -zinciri

IL-35: İnterlökin 35

IL-4: İnterlökin 4

IL-5: İnterlökin 5

IL-6: İnterlökin 6

IL-8: İnterlökin 8

IL-9: İnterlökin 9

iTreg: Uyarılmış Treg

JAK1: Janus Kinaz 1

JAK2: Janus Kinaz 2

JAK3: Janus Kinaz 3

KAK: Klinik ataçman kaybı

LAG-3: Lenfosit aktivasyon geni-3

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

mg: Miligram

MHC: Major histo uyumluluk molekülü

mm: Milimetre

MMP: Matriks metalloproteinaz

mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hücresi hedefi

NK: Doğal katil hücre

nTreg: Natural Treg

OPG: Osteoprotegerinin

P. Gingivalis: Porphyromonas gingivalis

PBMC: Periferel kan mononükleer hücre

PBS: Fosfat tampon çözeltisi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyon

PDL: Periodontal ligament

PGE2: Prostaglandin E2

PI3K: Fosfotidilinositol 3 kinaz

Pİ: Plak indeksi

PMNL: Polimorfo nükleer lökosit

pTreg: Periferik olarak uyarılan Treg

RANK: Nükleer faktör kappa-B reseptör aktivatörü

RANKL: Nükleer faktör kappa-B ligandı

RKK: Radyografik kemik kaybı

ROR γ t: Retinoik asit ile ilişkili orphan reseptör

S1P1: Sfingozin-1-fosfat reseptörü

STAT3: Sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatörü 3

STAT5: Sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatörü 5

TCR: T hücresi reseptörü

TGF- β 1: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1

TGF- β 2: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 2

TGF- β 3: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 3

Th: Yardımcı T hücresi

Th0: Saf yardımcı T hücresi

Th1: T yardımcı hücresi 1

Th17: T-yardımcı tip 17

Th2: T yardımcı hücresi 2

TIMP: Doku yıkım inhibitörü

TLR: Toll benzeri reseptörler

TNF- α : Tümör nekrotizan faktör alfa

Tr1: Tip1 Treg hücreler

Treg: Düzenleyici T hücresi

Tsit: Sitotoksik T hücresi

tTreg: Timüs kaynaklı Treg

1.GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, mikrobiyal dental plak birikimi sonucu plaktaki disbiyotik ekolojik değişikliklere bağlı olarak, konak doku yanıtının uyarılmasıyla başlamaktadır. Periodontal hastalıkların gingivitis ve periodontitis olmak üzere iki ana formu vardır (Silva ve ark., 2015). Gingivitis, enflamasyonun diş eti ile lokalize olduğu, henüz ataçman kaybının olmadığı, geri dönüşümlü bir periodontal hastalık olarak tanımlanmaktadır (Kistler ve ark., 2013; Trombelli ve ark., 2018). Klinik olarak diş etinde kızarıklık, ödem, sondalamada kanama gibi bulgular gözlenir. Periodontitis ise, dental plak biyofilminin birikmesiyle başlayan; ancak sonrasında gelişen mikrobiyal disbiyozisin geri dönüşümsüz, kronik, çözilemeyen ve yıkıcı bir enflamatuvar yanıtı yol açtığı kronik enflamatuvar bir hastalıktır (Preshaw & Bissett, 2019).

Periodontitis tedavi edilmediği takdirde gelişen ataçman kayıpları ve alveol kemik rezorpsiyonları zamanla artarak diş kayıplarına yol açabilir. Ataçman kaybı ve aynı zamanda diş kaybı miktarına göre periodontitisin çeşitli evre ve dereceleri vardır. Sigara gibi periodontal hastalıkların ilerlemesini modifiye eden risk faktörleri de periodontitisin ilerleme hızını etkiler (Tonetti ve ark., 2018). Sigaranın, periodontal hastalığın insidansı ve ilerlemesinde, bakteriyel plaktan sonra en güçlü modifiye edilebilir risk faktörü olduğu bilinmektedir (Johnson & Guthmiller, 2007). Sigara nötrofil fonksiyonu, antikor üretimi, fibroblast aktivitesi ve enflamatuvar mediyatör üretimini kapsayan doğal ve kazanılmış immün yanıtlara zarar verir. Sigara kullananlarda kullanmayanlara göre daha derin periodontal cepler, daha fazla alveoler kemik yıkımı ve daha fazla diş kaybı olduğu bildirilmiştir (Axelsson ve ark., 1998; Van der Velden ve ark., 2003).

Periodontitisteki alveol kemik rezorpsiyonu ve oluşumu arasında alveol kemik rezorpsiyonu lehine bir dengesizlik söz konusudur. Son yıllarda bu dengesizlikten T hücre alt kümelerinden T-yardımcı tip 17 (Th17) hücreleri ve T düzenleyici (Treg) hücreleri arasındaki dengesizliğin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu durum, kemik kaybını daha da artıran RANKL ve interlökin 1 (IL-1), tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) gibi proenflamatuvar sitokinlerin artışına neden olmaktadır (Alvarez ve ark., 2019). Treg'ler, periferik toleransın korunmasına, otoimmünitenin önlenmesine ve kronik enflamasyonun sınırlandırılmasına katkıda bulunan, immün sistemi baskılayıcı özelliklere sahip bir CD4+T lenfosit alt kümesidir (Sakaguchi ve ark., 1995). Periodontal sağlık ve hastalık arasındaki denge, düzenlenmiş bir immün-enflamatuvar yanıt gerektirir; bu sırada Treg'lerin varlığı, çevre dokulardaki hasarı en aza indiren kontrollü bir yanıt oluşturabilmek için önemlidir. Treg'ler hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığı modüle ettiğinden, periodontitis gibi immün toleransın kazanılmasıyla çözülebilecek patolojik durumlarda, Treg alt gruplarının işlevlerinin ve biyobelirteçlerinin bilinmesi büyük bir önem arz etmektedir (Alvarez ve ark., 2018; Singer ve ark., 2014).

Sigara hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarını etkilediğinden, sigara içenlerde Treg'lerin immünosüpresif fonksiyonu da değişmektedir. Sigara kullanımı Treg sayısını arttırarak ya da azaltarak immunsüpresif fonksiyonun bozulmasına neden olmaktadır (Qiu ve ark., 2017). Ancak sigaranın sağlıklı ve periodontitisli bireylerdeki Treg fonksiyonlarını nasıl etkilediğine dair literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı; sigaranın periodotal olarak sağlıklı ve periodontitisli bireylerin diş etinde bulunan Treg hücre biyobelirteçleri üzerindeki etkisini araştırmaktır. Bu çalışmanın hipotezi periodontitisli bireylerde, sağlıklı bireylere göre Treg hücre biyobelirteçlerinin artabileceği yönünde kurulmuştur. Ayrıca sigaranın,

periodontitisli bölgelerde bu enflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu deęiřtireceęi ön görölmektedir.

Bu amaca ulaşmak için sağlıklı, sigara kullanan sağlıklı, Evre III Derece C periodontitisli ve sigara kullanan Evre III Derece C periodontitisli hastalara ait diş eti örneklerinin epitel ve bağ dokusunda Treg hücre biyobelirteçlerinden FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1 ve JAK3 seviyeleri immunohistokimya yöntemi ile değerlendirilecektir.



2. İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1. PERİODONSİYUMUN GENEL ÖZELLİKLERİ

Periodonsiyum dişleri fonksiyonda tutabilmek için gerekli olan destek dokular bütünüdür. Diş eti, periodontal ligament (PDL), alveol kemiği ve sementten oluşan dört ana bileşeni vardır (Bartold ve ark., 2000).

2.1.1. Diş Eti:

Epitel ve bağ doku tabakalarından oluşan diş eti; alveol kemiği ve dişin kole bölgesini örter (Lang & Lindhe, 2015).

Diş eti anatomik olarak serbest, yapışık ve interdental diş eti olarak 3 bölüme ayrılmıştır. Her bir diş eti bölümünün fonksiyonel ve histolojik özellikleri; mekanik kuvvetlere ve mikrobiyal etkenlere maruz kalma düzeyine bağlı olarak farklılık gösterir (Ainamo & Talari, 1976).

Diş çevrelerini, yaka şeklinde örten diş etinin uç sınır kısmına serbest diş eti denir (Ainamo & Löe, 1966; Lang & Lindhe, 2015). Serbest diş eti ve yapışık diş eti birbirinden diş eti oluşu ile ayrılır (Ainamo & Löe, 1966; Lang & Lindhe, 2015). Serbest diş eti genişliği yaklaşık 1 mm'dir ve diş eti sulkusunun yumuşak doku duvarını örter (Mattos & Santana, 2008). Diş eti sulkusu ise serbest diş eti ile diş arasındaki oluk olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı insanlarda sulkus derinliği bireyler arasında farklılık gösterir. Klinik olarak sulkus derinliğinin periodontal sond ile ölçümü diş eti hastalıklarında önemli bir klinik parametredir.

Serbest diş etinin bittiği yerde yapışık diş eti başlar ve mukogingival sınıra kadar devam eder. Yapışık diş eti genişliği ağzın farklı bölgelerinde ve bireyler arasında

değişkenlik gösterir. Yaşa bağlı olarak genişliği artar. Genellikle anterior dişlerde (maksilla anterior bölgede 3.5-4.5 mm, mandibula anterior 3.3-3.9 mm) daha geniştir ve posterior dişler bölgesinde (maksiller birinci premolar 1.9 mm, mandibula birinci premolar 1.8 mm) genişliği azalır (Ainamo & Taları, 1976).

Yapışık diş etinin yüzeyi, portakal kabuğuna benzer. Bu görünüm 'stippling' olarak adlandırılır. Stippling yapısı en net diş etinin kurutulmasıyla görülür (Greene, 1962; Hassell, 1993). Enflamasyonun şiddeti ilerledikçe stippling yapısı bozulur. (Greene, 1962; Kyllar ve ark., 2010; Newman ve ark., 2018).

Sağlıklı bireylerde, dişlerin temas noktaları altındaki embraşürler diş eti ile kaplanmıştır bu aradaki diş etine interdental diş eti ya da interdental papil denir. İnterdental papillerin konumu dişlerin kontakt bölgesine, kontakt noktası ile alveol kret arasındaki mesafeye ve serbest diş eti kenarının pozisyonuna göre değişir (Tarnow ve ark., 1992).

Diş etinin mikroskobik özellikleri:

Diş eti epitelinin temel hücresi keratinositlerdir. Langerhans hücreleri, merkel hücreleri ve melanositler diş eti epitelinin diğer hücreleridir. Epitel, altındaki bağ doku ve kemik dokusunu dış ortamın etkilerinden korur. (Newman ve ark., 2011).

Diş eti epiteli oral gingival epitel, oral sulkuler epitel ve birleşim epiteli olmak üzere 3 tür morfolojik varyasyona sahiptir (Schroeder, 1969).

Oral epitel, diş etinin vestibuler ve oral yüzeylerini örter (Biolcati ve ark., 1953). Bazal tabaka, spinoz tabaka, granüler tabaka ve boynuzsu tabaka olmak üzere dört katmanı vardır (Newman ve ark., 2011). Sulkuler epitel, diş eti oluşunu kaplar. İnce,

nonkeratinize, çok katlı yassı bir epiteldir ve birleşim epitelinin koronalinden diş eti kenarının tepesine kadar devam eder (Çağlayan ve ark., 2010). Birleşim epiteli, diş etini dişe bağlayan, dişin çevresini yaka şeklinde saran çok katlı yassı keratinize olmayan bir epitel dokusudur (Newman ve ark., 2011). Birleşim epiteli iki tabakadan oluşur: Bağ dokusuna bakan bazal tabaka ve diş yüzeyine uzanan suprabazal tabaka.

Birleşim epiteli ve diş eti lifleri, dişi diş etine bağlayan yapılardır. Bu iki yapı dentogingival ünite olarak adlandırılır (Listgarten, 1970). Sağlıklı bir periodonsiyum için birleşim epitelinin bütünlüğünün korunması önemlidir. Bu bütünlüğün bozulması periodontal hastalıkların başlamasına neden olmaktadır (Nanci & Bosshardt, 2006).

2.1.2. Periodontal Ligament (PDL):

PDL, diş kökünü çevreleyip, alveol kemiğin iç duvarına bağlayan vasküler ve hücrel olarak özelleşmiş bir dokudur (McKee ve ark., 1996). Periodontal hastalık ilerledikçe periodontal ligamentin bütünlüğü bozulur ve diş kayıpları meydana gelir (De Jong ve ark., 2017).

PDL'nin işlevleri şunlardır;

1. Dişlerin kemiğe tutturulması
2. Oklüzal kuvvetlerin kemiğe iletilmesi
3. Aşırı oklüzal yüklerin neden olabileceği doku hasarının elimine edilmesi
4. Propriyosepsiyon duyusunun sağlanması
5. Kan damarları yoluyla sementin, kemiğin ve diş etinin beslenmesi (Newman ve ark., 2011).

2.1.3. Sement:

Sement, dişlerin köklerini kaplayan ve PDL'nin kollajen lifleri aracılığıyla diş alveol kemiğine bağlayan, avasküler mineralize bir dokudur. Sementin, diş ile alveol kemiğin bağlantısını sağlamak dışında; pulpanın korunması, oklüzal kuvvetlerin dengelenmesi, kök defektlerinin onarımı gibi görevleri de vardır (Keklikoğlu ve ark., 2011).

2.1.4. Alveol Kemiği:

Alveol kemiği, maksilla ve mandibulanın diş soketlerini oluşturan ve destekleyen kısmıdır. Alveol kemiği dişler sürmeye başlarken oluşur ve dişlerin kaybıyla yavaş yavaş rezorbe olur (Newman ve ark., 2011).

Alveol kemiği, dış tarafta bir kortikal kemik plakası ve iç tarafta ise ince bir soket duvarından (iç soket duvarı) oluşmuştur. Bu iki kompakt kemik arasında kansellöz kemik bulunmaktadır (Newman ve ark., 2011). Alveol kemiğinin üçte ikisi inorganik matriksten ve üçte biri ise organik matriksten oluşur. İnorganik kısmı büyük oranda kalsiyum ve fosfat minerallerinden oluşmuştur. Bunların dışında ise; hidroksil, karbonat, sitrat ve eser miktarda sodyum, magnezyum gibi inorganik bileşenleri içermektedir (Glimcher, 1987). Organik matriks içeriği büyük ölçüde tip I kollajenden (% 90) oluşmuştur. Kollajenin dışında daha az miktarda kollajen yapıda olmayan; osteokalsin, osteonektin, kemik morfojenik protein (BMP), fosfoprotein ve proteoglikanlar gibi proteinleri içerir (Muhlemann ve ark., 1954; Ritchey & Orban, 1953; Tompkins, 2016).

2.2. PERİODONTAL DOKULARDA SAĞLIK

Periodontal sağlık, periodontal enflamasyonun histolojik bulgularının olmaması ve periodonsiyumda herhangi bir anatomik değişiklik belirtisinin bulunmaması olarak tanımlanmalıdır. Ancak, periodontal dokuların fizyolojik ve anatomik özellikleri dikkate alındığında histolojik olarak tam sağlıklı durum mümkün değildir. Bu nedenle aslında periodontal sağlık, klinik olarak sağlıklı periodontal dokuları ifade eder ve anatomik durumuna göre tam ya da eksik periodonsiyumda klinik olarak enflamasyonun olmaması durumudur (Lang ve Bartold, 2018a). Klinik olarak sağlıklı periodonsiyum, hem sağlıklı periodonsiyumda hem de eksik periodonsiyumda gözlenebilir (Chapple ve ark., 2018).

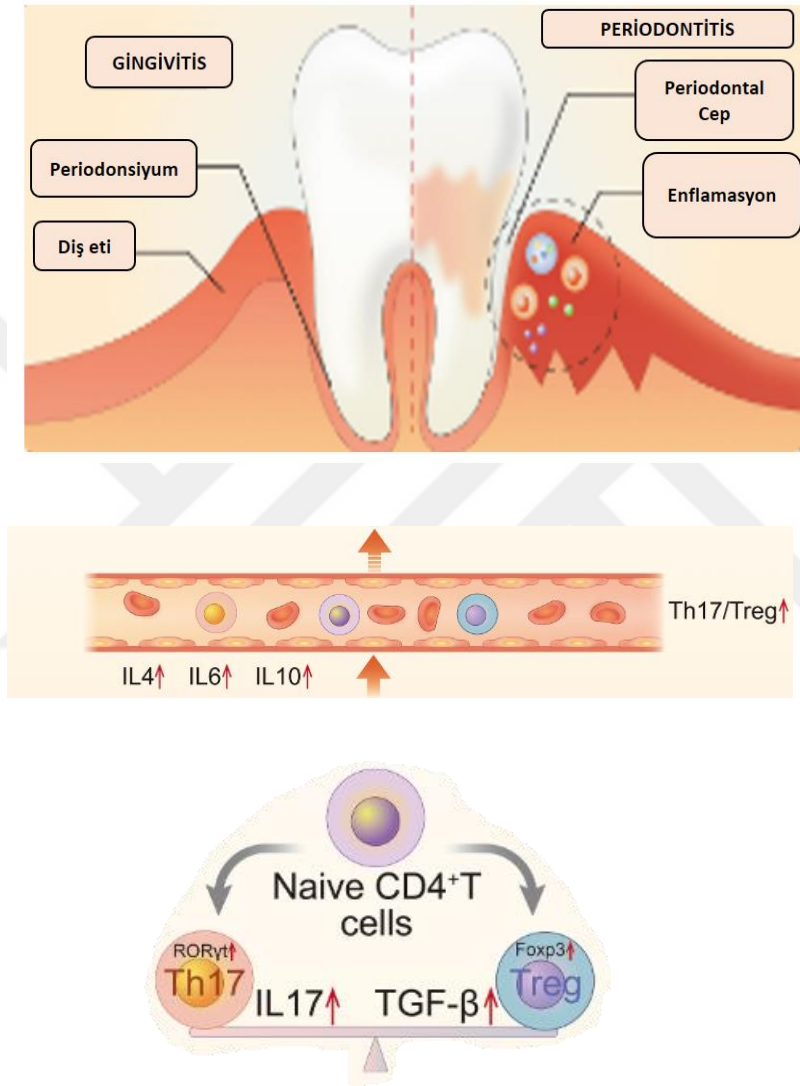
Eksiksiz periodonsiyumda sağlıklı periodontal dokuların temel özellikleri; ataçman kaybı olmaması, sondalamada kanama olmaması, sondalama derinliğinin 3 mm'den az olması ve ödem, kızarıklık, süpürasyon varlığı gibi enflamasyon bulgularının gözlenmemesidir (Lang & Bartold, 2018). Azalmış periodonsiyumda klinik periodontal sağlıkta ise kemik kaybı ve ataçman kaybı görülmesine rağmen; eritem, ödem, sondalamada kanama ve diğer hasta semptomları gözlenmez (Chapple ve ark., 2018).

2.3. PERİODONTAL HASTALIK

Periodontal hastalıklar, patojenik mikroorganizmalar ve konak immün cevabı arasındaki etkileşimin bir neticesi olarak dokularda hasara ve diş kayıplarına neden olan enflamatuvar bozukluklardır (Akalin ve ark., 2005).

Enflamasyon, enfeksiyon ve doku yaralanmasına bağlı olarak dokuların verdiği patolojik bir yanıttır (Medzhitov, 2008). Gingival dokularda enflamasyon başladığında; proenflamatuvar hücrelerin artışı, kollajen ve fibroblast hücre sayısının azalması, kompleman sisteminin aktivasyonu ve granülasyon dokusunun oluşumu gibi değişiklikler

meydana gelmektedir (Offenbacher, 1996). Patojen bakteri varlığına karşı verilen bu enflamatuvar reaksiyon, genellikle bağ dokusu yıkımına ve kemik rezorpsiyonuna neden olur (Page, 1991).



Şekil 2.1: Diş Eti Hastalıkları ve Mekanizması (Wang ve ark., 2021).

2.4. PERİODONTAL HASTALIKLARIN SINIFLANDIRILMASI

2017 Dünya Çalıştayı'nın sınıflandırma sistemine göre diş eti hastalıkları;

-Dental plak kaynaklı diş eti iltihabı

-Dental plak kaynaklı olmayan diş eti hastalıkları olarak iki kategoriye ayrılır.

Dental plak kaynaklı olmayan diş eti hastalıkları, plak nedenli olmayan ve genellikle plak temizlendikten sonra geçmeyen çeşitli durumları içerir (Chapple ve ark., 2018).

Dental plağa bağlı gingivitis ise;

- Sağlam bir periodonsiyumda diş eti iltihabı

- Periodontitis olmayan bir hastada azalmış periodonsiyumda diş eti iltihabı (örneğin, kron boyu uzatma)

-Başarıyla tedavi edilmiş bir periodontitis vakasında azalmış bir periodonsiyumda diş eti iltihabı olarak 3 gruba ayrılmaktadır (Chapple ve ark., 2018).

Gingivitis, dental biyofilm birikimi ile başlayan enflamatuvar bir hastalıktır ve klinik bir tanıdır (Trombelli ve ark., 2018). Klinik olarak kızarıklık, ödem, bıçak sırtı marjinlerin kaybı, papillerin küntleşmesi, sondalamada kanama gibi bulgular görülmektedir. Sağlıklı diş eti mercan pembesi renkteyken; diş eti iltihabı varlığında vaskülarizasyon derecesi artar, keratinizasyon derecesi azalır. Buna bağlı olarak gingivitiste diş eti daha kırmızı görünür. Gingivitiste alveol kemik kaybı ve ataçman kaybı görülmez. Histolojik incelemeler sonucunda iltihaplı diş eti dokusunun epitelinde ülserasyon gözlemlenir. Enflamatuvar mediyatörler epitel dokusunun fonksiyonunu bozmaktadır. Bu ülser epitelin onarımı, diş eti iltihabına sebep olan etiyolojik faktörlerin uzaklaştırılmasına bağlıdır (Chapple ve ark., 2018; Newman ve ark., 2011). Gingivitisin neden olduğu doku değişiklikleri geri döndürülebilir ancak, biyofilm uzaklaştırılmazsa

ve enflamasyon uzun süre devam ederse, ataçman kaybı ve kemik kaybı ile karakterize bir hastalık olan periodontitise ilerleyebilir (Chapple ve ark., 2018).



Şekil 2.2: Periodontal Hastalık Şeması

Periodontitis, periodontal ataçman kaybıyla sonuçlanan, mikrobiyal kaynaklı, konak aracılı enflamasyon ile karakterizedir (Tonetti ve ark., 2018). Diş etinde bağ doku ve kollajen kaybı, PDL ve alveolar kemiğin rezorpsiyonu görülür (Loos & Van Dyke, 2020).

2017 Dünya Çalıştayı'na göre periodontitis tanısı koyabilmek için aşağıda belirtilen iki durumdan birinin gerçekleşmesi gerekir:

- Tespit edilebilir interdental klinik ataçman kaybının (KAK) birbirine komşu olmayan iki ya da daha fazla dişte saptanması
- Bukkal veya oral KAK'nın iki ya da daha fazla dişte 3 mm'ye eşit ya da daha fazla olması ve bu dişlerde periodontal cep derinliğinin 3 mm'den büyük olması (Tonetti ve ark., 2018).

Ancak klinik ataçman kaybı aşağıdaki periodontal kaynaklı olmayan nedenlerden dolayı ise periodontitis teşhisi konulamaz:

- 1.Travmatik nedenlerle oluşan diş eti çekilmesi
2. Dişin servikal bölgesiyle ilişkili çürük

3. İkinci büyük azı dişlerinin distal yüzünde, üçüncü büyük azı dişlerinin malpozisyonu veya çekimi ile ilişkili klinik ataçman kaybı

4. Vertikal kök kırığı

5. Serbest diş eti kenarından sulkus aracılığıyla drene olan endodontik lezyon (Tonetti ve ark., 2018)

2017 sınıflandırma sistemine göre, periodontitis 3 kategoride incelenir:

1. Nekrotizan periodontitis

2. Sistemik hastalıkların bir belirtisi olarak periodontitis

3. Eski sınıflandırma sisteminde ‘kronik’ veya ‘agresif’ olarak adı geçen hastalık türlerinin artık tek bir

başlıkta gruplandırılmış şekli olan periodontitis (Caton ve ark., 2018).

Periodontitis, yaygınlığı, kompleksliği, şiddetine göre çeşitli evreleme ve derecelendirme sistemiyle tanımlanır (Tonetti ve ark., 2018).

Evreleme dört kategoriye ayrılır; hastalığın şiddetini ve karmaşıklığını tanımlar. Şiddet; en çok kayıp görülen alandaki dişler arası klinik ataçman kaybı; radyografik kemik kaybı ve diş kaybına göre değerlendirilir. Karmaşıklık ise; sondalamada cep derinliği, kemik kaybı paterni, diş mobilitesi, furkasyon problemleri, kemik defektleri mevcut diş sayısı ve çiğneme disfonksiyonuna göre değerlendirilir. Derecelendirme ise, periodontal hastalığın ilerleme hızını, tedaviye yanıtını ve genel sağlık üzerindeki etkilerini tanımlar (Papapanou ve ark., 2018; Tonetti ve ark., 2018).

Evrelendirme sırasında öncelikle klinik ataçman kaybı (KAK) belirlenmelidir; eğer mevcut değilse o zaman radyografik kemik seviyesi değerlendirilmelidir. Karmaşıklık faktörlerinin mevcut olmadığı durumda bile periodontitis sebebiyle kaybedilen diş sayısı hastalığın evresini değiştirebilir. Karmaşıklık faktörleri de periodontitisin evresini daha yüksek evreye kaydırabilir (Papapanou ve ark., 2018).

Evre I periodontitis: Başlangıç düzeyindeki periodontitistir. Ataçman kaybının erken aşamalarını temsil eder. Gingivitisten periodontitise geçiş aşaması olarak düşünülebilir (Tonetti ve ark., 2018).

Evre II periodontitis: Orta düzeydeki periodontitistir. Periodontitisin destek dokulara verdiği karakteristik hasar muayene sırasında fark edilebilir. Yerleşik periodontitisi temsil eder. Bu aşamada hastalık düzenli profesyonel tedavi ve oral hijyen ile kontrol altına alınabilir (Tonetti ve ark., 2018).

Evre III periodontitis: Ataçman kaybı ciddi hasara neden olmuştur ve ileri tedavi yapılmazsa diş kaybı meydana gelebilir. Bu evre, kökün orta kısmına uzanan derin periodontal lezyonların varlığı ile karakterizedir. Derin kemik içi defektlerin varlığı, furkasyon tutulumu, periodontal kaynaklı diş kaybı öyküsü ve bölgesel kemik defektlerinin varlığı ile tedavisi daha karmaşıktır. Ancak çiğneme fonksiyonu devam etmektedir (Tonetti ve ark., 2018).

Evre IV periodontitis: Periodontal destek dokular büyük ölçüde zarar görmüştür ve kaybedilen diş sayısı daha fazladır. Çiğneme fonksiyonu bozulmuştur. Periodontitisin kontrol altına alınmaması ve yeterli tedavisinin yapılmaması durumunda, dentisyonun kaybedilme riski vardır (Tonetti ve ark., 2018).

Tablo 2.1: Periodontitis Evreleme Tablosu (Tonetti ve ark., 2018).

EVRE		EVRE I	EVRE II	EVRE III	EVRE IV
Şiddet	İnterdental KAK	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radyografik kemik kaybı	Koronal 1/3	Koronal 1/3	Orta veya apikal 1/3	Orta veya apikal 1/3
	Diş kaybı	Periodontal kaynaklı kaybedilen diş yok		Periodontal kaynaklı ≤4 diş kaybı	Periodontal kaynaklı ≥5 diş kaybı
Komplekslik	Lokal	Sondalama derinliği ≤4 mm Genellikle horizontal kemik kaybı	Sondalama derinliği ≤5 mm Genellikle horizontal kemik kaybı	Evre II'ye ek olarak Sondalama derinliği ≥6 mm Sınıf II – III furkasyon defektleri Orta kret defekti	Evre III'e ek olarak Çiğneme disfonksiyonu Sekonder oklüzal travma(diş mobilitesi ≥2) Şiddetli alveol kret kaybı Dikey boyut azalmış 20den az diş(10 karşılıklı diştan az)
Boyut ve Dağılımı	Lokalize (≤%30 diş) Generalize(≥%30 diş) Molar-İnsizal Bölge				

Derecelendirme, periodontal hastalığın ilerleme hızının bir göstergesidir. Derece

A- Derece B- Derece C olmak üzere 3 kategoriye ayrılır.

Derece A: Düşük risk

Derece B: Orta risk

Derece C: Yüksek risk

Periodontitisin ilerlemesi, genel sağlık durumu, sigara içme veya diyabetin metabolik olarak kontrol düzeyi gibi unsurları kapsar. Böylece derecelendirme,

klinisyenin kapsamlı vaka yönetimi için çok önemli olan bireysel hasta faktörlerini tanıya dâhil etmesine olanak tanır (Caton ve ark., 2018).

Derecelendirme yapılırken, doğrudan kanıtlar mevcutsa doğrudan kanıtlar kullanılır, doğrudan kanıtların yokluğunda dolaylı kanıtlar kullanılır. Doğrudan kanıtlar hastanın son 5 yıl içindeki radyografik kemik kaybı (RKK) ya da klinik ataçman kaybına (KAK) bakılarak elde edilir. Dolaylı kanıtlar kullanılacağı zaman; periodontitisten en çok etkilenen dişteki alveol kemik kaybı (radyografik kemik kaybı) yüzdesi hastanın yaşına bölünerek bir oran elde edilir. Bu orana göre derece belirlenir. Sigara ve tip II diyabet ise periodontitis derecesi için risk belirleyici faktörlerdir. Periodontitis hastasının hemoglobulin A1c (HbA1c) değeri 7'den büyük ise veya günde 10 adet veya daha fazla sigara içiyorsa hasta derece C olarak değerlendirilir (Tonetti ve ark., 2018). Bütün periodontitis hastaları başlangıçta derece-B olarak değerlendirilir. Klinik ve radyografik muayene sonucunda teşhis spesifik kanıtlara bağlı olarak derece A veya derece C'ye kayabilir (Papapanou ve ark., 2018).

Tablo 2.2: Periodontitis Derecelendirme Tablosu (Tonetti ve ark., 2018).

DERECE			Derece A: Yavaş ilerleme	Derece B: Orta hızla ilerleme	Derece C: Hızlı ilerleme
Birincil Kriterler	İlerlemenin doğrudan kanıtları	Radyografik kemik kaybı veya KAK	5 yıl sonunda bir kayıp yok	5 yıl sonunda <2 mm kayıp	5 yıl sonunda ≥2 mm kayıp
	İlerlemenin dolaylı kanıtları	Kemik kaybı%/yaş	<0,25	0,25 – 1.0	> 1,0
		Vaka fenotipi	Düşük seviyeli yıkıma sebep olan ağır biyofilm	Biyofilm miktarı ile orantılı yıkım	Biyofilm miktarına göre abartılı yıkım. Hızlı ilerleyen ve erken başlangıçlı spesifik hastalık dönemlerini düşündüren modeller
Dereceyi modifiye eden faktörler	Risk faktörleri	Sigara	Sigara içmiyor	Günde <10 adet içiyor	Günde ≥10 adet içiyor
		DM	Normal	HbA1C <7.0 olan DM hastası	HbA1C ≥7.0 olan DM hastası
Periodontitisin sistemik etkisinin riski	Enflamatuvar yük	Yüksek duyarlılık CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1-3 mg/L	>3 mg/L

2.5. PERİODONTAL HASTALIKLARIN PATOGENEZİ

Peridontal patogenezin anlaşılabilmesi için klinik olarak sağlıklı ve enflame periodontal dokuların histolojisinin bilinmesi gereklidir. Klinik olarak sağlıklı kabul edilen diş etinde bile diş yüzeyinde daima bulunan dental plağa bağlı olarak histolojik olarak fark edilebilen enflamasyon bulguları gözlenir. Sağlıklı durumda, diş eti cebi içerisinde bir miktar lökosit infiltrasyonu vardır ve bu ağırlıklı olarak nötrofillerden oluşur. Nötrofiller mikrobiyal dental plak varlığında bakteriler tarafından kemotaktik peptitler aracılığıyla uyarılarak doku içerisinden cep içerisine göç eder. Enflamasyon başladığında nötrofil savunması, bakterilerin sayısını azalttığı için diş eti iltihabının

önlenmesinde önemlidir. Ancak bakteri sayısı artmaya devam ettikçe nötrofiller degranüle olur ve dokularda hasar başlar (Kinane, 2001).

Page ve Schroeder tarafından gingival dokularda meydana gelen bu değişiklikler; başlangıç, erken, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyon olarak farklı aşamalarda incelenmiştir (Page & Schroeder, 1976).

1. Başlangıç lezyonu: Plak birikiminden itibaren ilk dört gün içinde gelişir. Endotel hücrelerinin ve lökositlerin bakteriyel biyofilme karşı verdiği yanıtıdır. Bu aşama klinik olarak sağlıklı diş eti dokularına karşılık gelir. Dokulardaki değişiklikler ancak histolojik olarak gözlenebilir. Bakterilerin metabolik ürünleri, birleşim epiteli hücrelerini uyarak lokal kan damarlarında vazodilatasyona sebep olur (Cekici ve ark., 2014; Kulkarni & Kinane, 2014; Payne ve ark., 1975).

2. Erken lezyon: Yaklaşık 7 günlük plak birikiminden sonra gelişir. Artan vasküler geçirgenlik sonucu klinik olarak gingival enflamasyon, ödem, kanama gibi belirtiler; histolojik olarak da birleşim epitelinde retepeg oluşumu gözlenir. Lenfosit ve makrofajlar baskın olan hücrelerdir. Fibroblastlarda dejenerasyon ve perivasküler kollajen kaybı görülür (Cekici ve ark., 2014; Kulkarni & Kinane, 2014; Payne ve ark., 1975).

3. Yerleşmiş Lezyon: 2-3 haftalık plak birikiminden sonra, erken lezyon yerleşik lezyona dönüşür. Klinik olarak bu lezyon daha ödemli bir görünüm sergiler. Bu aşama doğal bağışıklıktan kazanılmış bağışıklığa geçiş evresi olarak kabul edilir. Bağ dokuda enflamatuvar hücre birikimi, makrofajlar, plazma hücreleri ve T ve B lenfositleri baskındır. Birleşim epiteli ve sulkuler epitelde belirgin nötrofil infiltrasyonu mevcuttur ve birleşim epiteli yapışık olmayan cep epiteline dönüşür (Cekici ve ark., 2014; Kulkarni & Kinane, 2014).

4. İlerlemiş Lezyon: Gingivitisten periodontitise geçiş evresidir. Bağ dokuda yoğun enflamatuvar hücre infiltrasyonu (özellikle plazma hücreleri) gözlenir. İleri derecede kollajen yıkımı vardır. Birleşim epiteli bozulmamış epitel bariyerini korumak için apikale göç eder. Histolojik bulgulara ek olarak, ataçman kaybı ve kemik kaybı klinik olarak tespit edilir. Periodontal cep oluşumu, ülserasyon, süpürasyon, dişlerde mobilité görülür. Gingivitisin periodontitise ilerlemesi T hücre baskınlığının, B hücre baskınlığına dönüşmesiyle belirlenir (Cekici ve ark., 2014; Kulkarni & Kinane, 2014).

2.5.1. Periodontal Hastalıklarda Enflamasyon

Enflamatuvar yanıt, yaşamımızı devam ettirebilmemiz için kritik bir öneme sahiptir ve vücudumuzun işleyişindeki birçok süreçte karşımıza çıkar. Periodontal hastalıklardaki enflamatuvar durum da, patojenlere karşı savunma ve iyileşme için gereklidir (Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

Periodontitiste, mikrobiyal tehdit ile konak cevabı arasında karmaşık bir etkileşim vardır. Biyofilmdeki bakteriyel bileşenler, PMNL'ler dâhil olmak üzere konak savunma hücrelerini (monosit-makrofaj, T ve B lenfositler) aktive eder ve bu durum konakta antikor yanıtını uyarır. Antikor yanıtıyla uyarılan dokularda enflamatuvar yanıt süreci başlamaktadır. Aktive olan savunma hücreleri, bağ doku ve kemik metabolizmasını değiştiren sitokinler, kemokinler, prostaglandinler, matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteolitik enzimler ve enflamatuvar mediatörler üretmektedir. Bu mediatörler periodontal dokularda hasara neden olur. Belirli bir aşamaya kadar bu durumlar geri dönüşümlüdür. Bununla birlikte, bazı bireylerde, doğuştan gelen yatkınlık veya çevresel faktörler nedeniyle, enflamasyon çözilememekte, bağ dokusu kaybı ve ardından geri dönüşümsüz kemik kaybı meydana gelmektedir (Ohlrich ve ark., 2009; Van Dyke & Serhan, 2003).

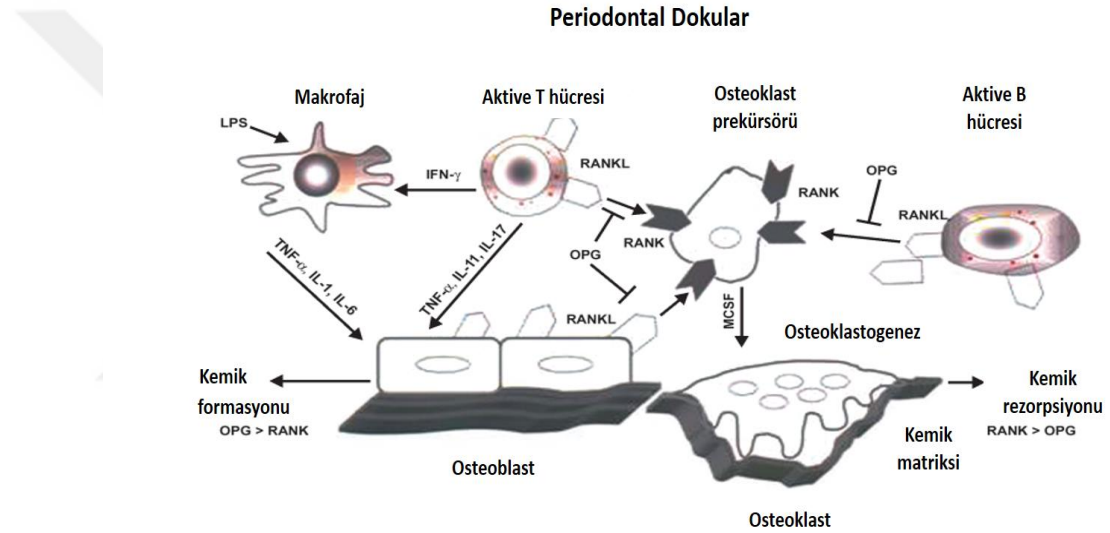
Periodontitiste oluşan kemik kaybı, osteoklast aktivitesindeki artışa bağlı olarak meydana gelmektedir. Osteoklastlar, monosit/makrofaj hücrelerinden köken alan çok çekirdekli hücrelerdir ve kemik yıkımından sorumlu temel hücre olarak kabul edilir. Osteoklastların oluşumu, enflame periodontal dokulardaki bazı sitokinler tarafından uyarılır. Bu konunun aydınlatılması, hastalığın kontrolü, önlenmesi ve tedavisi açısından önemlidir (Bartold ve ark., 2010).

2.5.2. Alveoler Kemik Rezorpsiyonunda Etkili Biyobelirteçler

Tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin bir üyesi olan nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), osteoklast farklılaşmasını sağlar ve kemik rezorpsiyonunun uyarılmasından sorumludur (Kong, 1999; Lacey ve ark., 1998). RANKL, osteoblastlar, fibroblastlar veya aktive T ve B hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Ikeda ve ark., 2001). RANKL pre-osteoklastların yüzeyindeki aynı kökenli nükleer faktör kappa-B'nin reseptör aktivatörünü (RANK) aktive ederek, osteoklast farklılaşmasını sağlar, böylece kemik rezorpsiyonunu başlatmış olur (Teitelbaum & Ross, 2003). RANKL'ın etkisi, TNF reseptör süper ailesinin bir üyesi olan osteoprotegerinin (OPG) RANK'a bağlanması ile önlenabilir. OPG osteoklastların sayı ve aktivitesindeki patolojik artışı önlemektedir; bu sayede kemik rezorpsiyonunu inhibe edilmesinde rol oynamaktadır (Simonet ve ark., 1997). Fizyolojik şartlarda, periodonsiyumdaki RANKL, mezenkimal hücreler, özellikle osteoblastlar ve PDL hücreleri tarafından üretilir (Kajiya ve ark., 2010). Sağlıklı periodontal dokularda, OPG periodontal bağ doku fibroblastları ve endotel hücreleri aracılığıyla sürekli eksprese edilir (Kobayashi-Sakamoto ve ark., 2004). Periodontal hastalıkta ise RANKL'ın birincil kaynağı, yardımcı T hücreleri 1 ve 17 (Th1 ve Th17) hücrelerinin yanı sıra B hücreleridir (Han ve ark., 2009; Vernal ve ark., 2006). Bununla birlikte, bakteriyel tehdit ile

karşılaştığında tüm mezenkimal hücreler RANKL eksprese edebilmektedir (Belibasakis ve ark., 2007; Kajiya ve ark., 2010).

Periodontal hastalıkta RANKL/OPG sisteminin rolünü gösteren çalışmalarda, periodontitisten etkilenen bölgelerde sağlıklı diş eti dokusuna oranla daha yüksek RANKL ve daha düşük OPG seviyelerinin olduğu gösterilmektedir (Crotti ve ark., 2003).



Şekil 2.3: Periodontal Dokularda Kemik Rezorpsiyonuna Aracılık Eden İmmün Hücreler (Taubman ve ark., 2005).

2.5.3. Periodontal Hastalıklarda Doğal ve Kazanılmış Bağışıklık

Periodontal enflamasyonların patogeneğinde hem doğal ve hem kazanılmış bağışıklık yanıtlarını içeren enfeksiyöz enflamatuvar bir süreç rol oynamaktadır (Cekici ve ark., 2014).

Doğal bağışıklık, konağın patojenlere karşı ilk savunma hattıdır ve mevcut enfeksiyonu önlemeyi amaçlamaktadır. Bu mekanizmada hızlı yanıt oluşturulur. Doğal bağışıklık içerisinde; anatomik bariyerler, lizozim gibi fagositik hücre enzimleri, nötrofil, monosit, makrofaj gibi fagositler, serum proteinleri (örneğin, kompleman, C-reaktif protein (CRP), mannoz bağlayıcı lektin gibi lektinler), antimikrobiyal peptidler, mikroorganizmaları algılayan hücre reseptörleri (örneğin, Toll benzeri reseptörler), sitokinler ve enflamatuvar mediatörleri serbest bırakan hücreler (makrofajlar, mast hücreleri, doğal öldürücü hücreler) yer almaktadır (Nędzi-Góra ve ark., 2017).

Nötrofiller hastalığın başlangıç evrelerinde kemotaksis, opsonizasyon ve devamında fagositoz yoluyla reaktif oksijen radikalleri oluşturarak ya da antijen antikor temasıyla granüllerin içerdiği enzimlerin açığa çıktığı degranülasyon aracılığıyla hem patojenlerde hem de konakta hasara neden olmaktadır. Periodontal hastalık varlığında dokularda oluşan kollajen ve elastin kaybı bu duruma örnektir (Ginhoux & Guilliams, 2016).

Makrofajlar hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarında görev alan uyarıcı hücrelerdir. Periodontal dokuların immün yanıtındaki kilit rolü ise, bağ dokusu ve kemikteki yıkım olaylarını düzenlemektir. Dendritik hücreler (DC) gibi yüzeylerinde reseptörler bulundurmaktadır (Ginhoux & Guilliams, 2016). Toll benzeri reseptörler (TLR) olarak isimlendirilen bu reseptörler, patojenler mukozal bariyeri geçer geçmez tanıma yeteneğine sahiptir. Bir TLR ve bir antijen arasındaki bağlanma, konak hücrede proenflamatuvar mediatörleri aktive eder ve spesifik olmayan enflamatuvar yanıtı başlatır (Nędzi-Góra ve ark., 2017).

Dendritik hücreler, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü görevi gören hücrelerdir. Yüzey reseptörlerini kullanarak patojenleri tespit eder ve hücrel cevaba aracılık eden sitokinler üretir. Periodontal enflamasyonlarda dendritik hücre sinyali, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik bir adım olarak kabul edilmektedir (Meyle & Chapple, 2015).

Doğal bağışıklık yanıtı spesifik olarak herhangi bir antijeni hedef almamaktadır. Bu nedenle immünolojik reaksiyon, yalnızca mikrobiyal bileşenleri değil aynı zamanda dişi destekleyen diğer dokuları da etkilemektedir. Bu dokuların bozulması klinik olarak gözle görülebilen; diş eti kanaması, periodontal cep derinliğinde artış, mobilite artışı gibi semptomlarla sonuçlanmaktadır (Kumar ve ark., 2011; Nędzi-Góra ve ark., 2017).

Kazanılmış bağışıklık ise önceden tanınan belli bir tür mikroorganizma veya hedeflenen antijene karşı aktif hale gelen bağışıklıktır. Daha uzun süreli yanıtlar oluşturulmaktadır. Belirli bir patojen konak için yeni olduğunda, başlangıçta doğal bağışıklık sistemi tarafından tanınmaktadır ve daha sonra patojene (antijene) özgü T ve B lenfositlerin üretilmesine aracılık ederek kazanılmış bağışıklık yanıtı uyarılmaktadır. Her patojenin bir antijen aracılığıyla hatırlanması sonucunda kazanılmış bağışıklık hafızası gelişmekte olup, bellek hücreleri tarafından daha sonra meydana gelen enfeksiyonlarda hızlı yanıt oluşturulmaktadır (Chaplin, 2010).

Kazanılmış bağışıklık hücrel ve humoral bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. T lenfositler hücrel bağışıklıktan B lenfositler ise humoral bağışıklıktan sorumludur. Hücrel bağışıklığın temel hücresi olan T lenfositler kemik iliği progenitör hücrelerden köken almaktadır. T hücreleri olgunlaşma, seleksiyon ve perifere dağılmak için timüsa göç eder. Hem immün yanıtın ve immunolojik hafızanın oluşturulması hem

de bu dengenin sürdürülmesi T hücrelerine bağlıdır. T lenfositler antijene özgü tanıma gerçekleştirmektedir. DC'ler enflamatuvar uyaranlar ve sitokinler aracılığıyla periferel dokulardan antijeni alarak sekonder lenfoid organlara göç etmektedir. Antijen sunumu için; antijen sunan hücreler (APC) üzerindeki major histo uyumluluk molekülü (MHC) ile antijenik peptitlerin T hücresi reseptörü (TCR) ile etkileşimi gerekmektedir. MHC-TCR etkileşimi sonucu hücre içi sinyallerle saf T hücreleri aktive olmaktadır. Aktive olan T hücreleri hızla çoğalarak efektör fonksiyonlarını (örneğin; hücre aracılı sitotoksiste ve çeşitli sitokinlerin üretimi) gerçekleştirebilmek için dokulardan antijenlerin bulunduğu bölgelere göç eder (Broere & van Eden, 2019).

B lenfositler, immünoglobulin (Ig) moleküllerini taşıyan yüzey reseptörlerine sahip olan hücrelerdir. B lenfositler humoral bağışıklık olarak bilinen kan ve lenf dokuda immünoglobulin üretiminden sorumlu olan hücreler olarak tanımlanmaktadır. İmmunoglobulinler ise, bağışıklık sistemi tarafından hücre dışındaki patojenleri ve yabancı maddeleri bağlayarak nötralize eden Y şeklindeki glikoproteinlerdir (Cekici ve ark., 2014).

2.6. PERİODONTAL SAĞLIK VE HASTALIK DURUMLARININ T LENFOSİTLERLE İLİŞKİSİ

2.6.1. T Lenfositlerin Alt Kümeleri

Bağışıklık sistemi hücreleri ve antijenler arasındaki etkileşimler lenfositlerin yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu reseptörler antijen tanıma birimleri olarak özelleşmiş hücre yüzey reseptörleri olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan biri de yüzey farklılaşma antijeni olan CD molekülleridir (Aras & Sarı, 2017). T lenfositlerde bulunan CD molekülleri T hücre reseptörleri (TCR'ler) ile bağlantı kurarak TCR'lerin sinyal

iletimini ve antijenik uyarımını artıran hücre yüzey reseptörleri olarak tanımlanmaktadır (Diker, 2005). Aynı zamanda T lenfositler, bu CD moleküllerinin hücre yüzey ekspresyonuna göre CD4 veya CD8 molekülleri olarak iki ana alt kümeye ayrılmaktadır (Murphy & Reiner, 2002). CD8+Sitotoksik T (CD8+Tsit) hücreleri enfekte veya malign hücrelerin doğrudan parçalanmasında rol oynamaktadır. CD4+T yardımcı hücreler (CD4+Th) ise efektör T hücrelerini ya da hedef hücrelere doğrudan toksik olan hücreleri düzenlemekte ve B lenfositlerin antikor üretimini uyaran sitokinleri üretmektedir (Broere & van Eden, 2019).

T hücreleri periferde; yeni antijenlere yanıt verme kapasitesine sahip saf T hücreleri, uzun süreli bağışıklığı koruyan ve bağışıklık yanıtlarını düzenleyen Treg hücreleri, yeni antijenlerden oluşan hafıza T hücreleri de dâhil olmak üzere farklı alt gruplardan oluşmaktadır (Kumar ve ark., 2018). Bu alt kümeler, enfekte hücrelerin öldürülmesinde, makrofaj, B hücresi ve diğer T hücrelerinin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Cekici ve ark., 2014). Aktifleşen T hücreleri ilgili antijenlerle karşılaşınca efektör özellikleri sayesinde patojene bağlanarak patojenlerin uzaklaştırılmasında görev almaktadır. Efektör T hücrelerinin büyük bir kısmı, antijenik ajanlar tarafından uzaklaştırılmakta ancak elimine edilemeyen hücreler ise bellek T hücrelerini oluşturmaktadır. Efektör T hücreleri saf T hücrelerinden farklı olarak birkaç ay süresince yaşar ya da bağışıklık yanıtı sonunda kaybolurken, bellek T hücreleri periferik dokularda ve lenfoid organlarda yıllarca kalabilmektedir. Aynı antijenle tekrar karşılaştığında ikincil bir bağışıklık yanıtı oluşturarak patojenlerin erken dönemde ortadan kaldırılmasında ve hastalıkların kontrolünde rol oynamaktadır (Broere & van Eden, 2019).

CD4+Th hücreleri yüzeyinde MHC sınıf 2 molekülü bulunan antijen sunan hücrelerle, CD8+Tsit hücreler ise yüzeyinde MHC sınıf 1 molekülü bulunan antijen sunan

hücrelerler aracılığıyla uyarılmaktadır. Antijen sunan hücrelerle etkileşime giren saf CD4+Th hücreleri çeşitli sitokinler aracılığıyla Th1, Th2, Th17 ve Treg alt kümelerine ayrılmaktadır (Mosmann ve ark., 2005).

Th1 hücreleri, özellikle makrofaj ve CD8+T hücreleri aracılığıyla hücre sel bağışıklığı yönlendirmekte olup; IL-12 varlığında interferon-gama (IFN- γ), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), interlökin-2 (IL-2) ve tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) üretmektedir. Antikorların tanınmasını ve üretimini desteklemektedir. Makrofaj aktivasyonunu, antikor bağımlı hücre sitotoksitesini ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarını düzenlemektedir. Bu nedenlerden dolayı, fagositoza bağlı hücre yanıtlarından Th1 hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Romagnani, 1996).

Th2 hücreleri humoral bağışıklığa aracılık etmektedir. İmmunoglobulin E (IgE) ve İmmunoglobulin G (IgG)'yi içeren mukozal immunitenin uyarılmasında; İmmunoglobulin A (IgA) sentezinde görev almaktadır. Mast ve eozinofil hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasında rol oynamaktadır, ayrıca fagositik hücrelerin fonksiyonlarını inhibe ederek fagositlerden bağımsız bir enflamasyon oluşturmaktadır. Güçlü antikor yanıtlarını uyaran interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5), interlökin 6 (IL-6), interlökin 9 (IL-9), interlökin 10 (IL-10), interlökin 13 (IL-13) ve TGF- β sitokinlerini üretmektedir (Romagnani, 1996, 2000).

Th17 hücreleri, gelişim ve işlevleri için, retinoik asit ile ilişkili orphan reseptör (ROR γ t) olarak bilinen spesifik transkripsiyon faktörünün uyarılmasına ihtiyaç duyan hücrelerdir (Ivanov ve ark., 2006). İnterlökin-17 (IL-17) üreten Th17 hücreleri, otoimmünite, alerjik reaksiyonlar ve konak savunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Bettelli ve ark., 2007). Ayrıca IL-17'nin, epitelyal, endotelyal ve fibroblastik hücrelerde IL-6, interlökin-8 (IL-8) sitokinlerini ve prostaglandin E2 (PGE2) bileşiklerini uyardığı;

osteoblastları ise kemik yıkımında rol oynayan RANKL üretimi için uyardığı gösterilmiştir (Fossiez ve ark., 1996; Kotake ve ark., 1999).

Treg hücreleri, geleneksel T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve efektör fonksiyonlarını özel olarak düzenleyen CD4 ve CD25 eksprese eden hücrelerdir (Cekici ve ark., 2014). Bu hücreler, hücre-hücre teması ve TGF- β 1 veya IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokin üretimi dâhil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla efektör T hücrelerinin çoğalmasını ve fonksiyonunu inhibe ederek etkilerini göstermektedir (Sakaguchi ve ark., 2010).

İlk başta CD25+CD4+T hücreleri olarak tanımlanan daha sonra spesifik olarak FOXP3 transkripsiyon faktörünü eksprese ettiği gösterilen Treg hücrelerinin, diğer T hücre alt kümelerinden farkı doğal olarak bulunmalarıdır (Sakaguchi ve ark., 1995). Treg hücreleri periferdeki hücrel korumanın yanında bağışıklık yanıtlarının azaltılması ve otoimmün hastalıkların önlenmesi gibi tüm hücre aracılı olaylarda görev almaktadır. Treg'lerin işlevlerini yerine getirdiği mekanizmalar hâlâ tam olarak açık değildir. Ancak bu süreçte TGF- β 1, IL-10 ve IL-35 gibi immünoşüpresif sitokinlerin rol oynadığı gösterilmektedir (Wing & Sakaguchi, 2010).

Treg hücrelerinin de kendi içinde alt grupları bulunmaktadır. Naif (antijenle etkileşime girmemiş olan) CD4+T lenfositler timusta IL-2 ve TGF- β 1 aracılığıyla FOXP3+Treg hücrelerine dönüştürülmektedir. Bunlar hala olgunlaşmamış CD4+T lenfositler olarak kabul edilmektedir. Bu hücrelere natural Treg (nTreg) ya da timüs kaynaklı Treg (tTreg) adı verilmektedir. Bu hücreler periferdeki lenfoid dokularda sitokinlerin ve antijen tanınmanın (TCR etkileşimi) etkisiyle hafıza T hücrelerine (CD45RO+) dönüşebilmektedir (González-Amaro & Marazuela, 2016). nTreg'lerin, NF-

κ B tarafından aktive edilebilen enflamatuvar yanıtı düzenlediği ve bağışıklık sisteminin normal bir şekilde sürdürülmesini sağladığı bildirilmektedir (Tie ve ark., 2022).

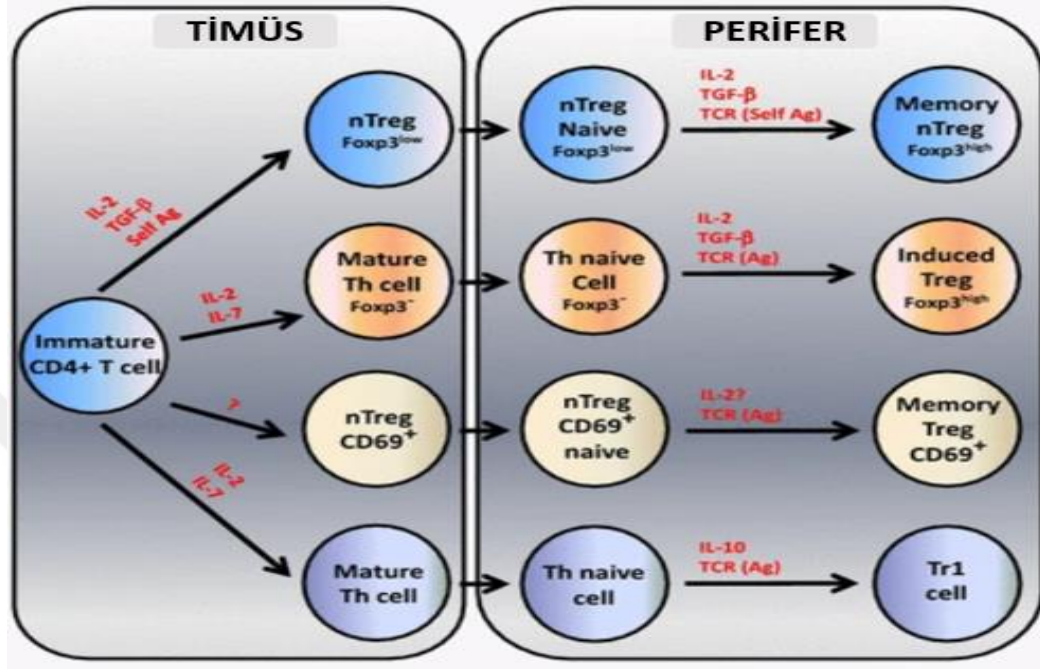
Timusta FOXP3⁻ olan geleneksel naif hücreler periferde ya da in vitro olarak da IL-2, TGF- β ve TCR etkileşimi ile FOXP3⁺Treg hücelere dönüşebilmektedir. Bunlara ise periferik olarak indüklenen Treg'ler (pTreg) ya da uyarılmış Treg'ler (iTreg) adı verilmektedir (González-Amaro & Marazuela, 2016). iTreg'lerin, efektör T hücrelerinin, DC'lerin ve NK hücrelerinin bağışıklık yanıtını inhibe ettiği gösterilmektedir (Tie ve ark., 2022). nTreg, tTreg, pTreg ve iTreg hücreleri aslında aynı fenotip ve göreve sahip olan hücrelerdir (González-Amaro & Marazuela, 2016).

IL-2'nin TGF- β 1 aracılığıyla FOXP3⁺iTreg'lerin oluşumunda etkili olduğuna dair başka yayınlar da bulunmaktadır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada baskılayıcı aktiviteleri ve birçok açıdan iTreg, in vitro ve in vivo timik kökenli nTreg ile aynı şekilde davranmaktadır. Ancak nTreg ile iTreg hücrelerinin uyarılması karşılaştırıldığında nTreg'de FOXP3'ün uyarılmasında bazı farklılıklar olduğu gösterilmektedir. Periferde FOXP3⁺iTreg'in uyarılabilmesi için TGF- β 1 ile IL-2'ye mutlaka bir gereksinim olduğu belirtilmektedir. Timusta ise nTreg gelişimi için IL-2'nin gerekli olmadığını, ancak periferdeki metabolik olaylarda ve bunların sürdürülmesinde IL-2'nin rol oynadığı gösterilmektedir (Davidson ve ark., 2007).

Timusta farklılaşan başka bir CD4⁺Treg hücresi ise FOXP3⁻CD69⁺Treg hücreleridir. Bu hücreler ise periferde yine IL-2 ve antijenlerin etkisi ile hafıza hücrelerine dönüşebilmektedir (González-Amaro & Marazuela, 2016).

Bir diğer yol ise; konvansiyonel CD4 naif hücrelerin periferde IL-10 varlığında TCR etkileşimiyle FOXP3⁻ Treg hücelere dönüştürüldüğü yoldur. Bu hücrelerin lenfosit

aktivasyon geni-3 (LAG-3) ve CD49b markerları vardır. Bunlara Tip1 Treg hücreler (Tr1) denilmektedir (González-Amaro & Marazuela, 2016).



Şekil 2.4: CD4+Treg hücre alt gruplarının farklılaşması (González-Amaro & Marazuela, 2016).

TGF-β1 ve IL-2 ile etkileşime giren naif T hücreleri, FOXP3'ü uyararak otoimmün yanıtların baskılanmasında önemli bir işlevi olan Treg hücrelerine dönüşmektedir. Buna karşılık TGF-β1; IL-6 ve IL-21 varlığında, CD4+T hücreleri retinoik asit ile ilişkili orphan reseptör (RORγt) transkripsiyon faktörünü eksprese ederek Th17 hücrelerini aktifleştirmektedir (Laurence & O'Shea, 2007). Böylece hem Treg hem de Th17 hücrelerinin farklılaşması için, TGF-β1'in gerekli olduğu, ancak bu dönüşümün farklı transkripsiyon faktörlerine bağlı olduğu (Th17 hücreleri için RORγt ve Treg hücreleri için FOXP3 transkripsiyon faktörü) gösterilmektedir. TGF-β1'in T hücrelerinin farklılaşmasını zıt aktivitelerle nasıl düzenlediği ise hâlâ net değildir. Ancak, proenflamatuvar sitokinlerle birlikte TGF-β1'in Th17 farklılaşmasını konsantrasyona

bağlı olarak düzenlediği ifade edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda TGF- β 1, IL-6 ve IL-21'in IL-23 reseptörünü (IL23r) uyararak Th17 hücre farklılaşmasını desteklediği; yüksek TGF- β 1 konsantrasyonlarında ise IL23r ekspresyonunu baskılayarak FOXP3+Treg hücrelerini desteklediği gösterilmiştir. ROR γ t ve FOXP3, TGF- β 1'e maruz bırakılan saf CD4+T hücrelerinden ve T hücrelerinin alt kümesinden birlikte eksprese edilir. Bu nedenle antijenle uyarılan hücrelerin Th17 ya da Treg hücrelerine farklılaşma kararı, sitokinler tarafından düzenlenen ROR γ t ve FOXP3'ün dengesine bağlı olarak değişmektedir (Zhou ve ark., 2008).

2.6.2. T Lenfosit Alt kümelerinin Periodontal Hastalıklardaki Rolü

Periodontal hastalık, bakteriyel biyofilme karşı oluşturulan enflamatuvar bir yanıttır. Enflamatuvar yanıtta esas olarak nötrofiller, monositler/makrofajlar, T ve B lenfositler aracılık etmektedir. Hastalığın gelişimi, bakteriyel birikime karşı öncelikle nötrofil ve makrofajların bağ dokusuna invazyonuyla başlayan enflamatuvar bir süreçtir. Enflamasyon çözülemediği takdirde antijen sunan hücreler, bakteriyel ürünler tarafından aktive edilir ve bunlar saf Th (Th0) hücreleriyle etkileşime girerek Th1, Th2, Th17 ve Treg gibi çeşitli alt gruplara farklılaşır (Figueredo ve ark., 2019). Periodontal hastalık ilerlemeye devam ettikçe buna yanıt olarak daha fazla T hücresi aktive olmaktadır. Bu hücreler ise osteoklast farklılaşmasına ve kemik rezorpsiyonuna neden olan RANKL üretimini uyarmaktadır (Lacey ve ark., 1998). RANKL membrana bağlı bir protein olup başlıca osteoblastlar tarafından eksprese edilmektedir. Osteoblastlar dışında fibroblastlar, T ve B lenfositler de RANKL eksprese etmektedir (Cochran, 2008).

Th17, IL-17 üretimi ile karakterize olup Th hücrelerinin proenflamatuvar özelliğe sahip bir alt kümesidir. Bu hücreler kazanılmış bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde

rol oynarken Treg hücrelerinin farklılaşmasını da inhibe etmektedir (Hartigan-O'Connor ve ark., 2011). Th17 hücreleri periodontitisli dokularda aktifleşerek sayısı artmakta ve diğer T hücrelerine göre RANKL ekspresyonunu daha fazla uyarmaktadır (Bi ve ark., 2019). Th17 hücrelerinin işlevi osteoklastları uyarmak ve alveoler kemik kaybını tetikleyerek RANK/RANKL/OPG sinyal yolunu düzenlemektir (Deng ve ark., 2022).

Th1 hücreleri de Th17 hücreleri gibi periodontal hastalık esnasında kemik kaybında rol oynamaktadır (Repeke ve ark., 2010). Bu hücreler patojenleri ortadan kaldırırken proenflamatuvar sitokinlerin sentezini arttırmakta ve aynı zamanda RANKL gibi mediatörleri eksprese ederek kemik yıkımını gerçekleştirmektedir (Dutzan ve ark., 2009).

Th1 hücrelerinin aktivasyonu, antienflamatuvar özellik gösteren Th2 hücreleri tarafından azaltılmaktadır (Silva ve ark., 2015). Th2 yanıtları, periodontal dokularda kemik kaybının azaltılması ve yine doku yıkımında rol oynayan matriks metalloproteinazlar (MMP) ile doku yıkım inhibitörleri (TIMP) arasındaki dengenin korunması gibi mekanizmaları içermektedir (Garlet ve ark., 2004). Böylece Th2 yanıtı periodontal hastalıkların ciddiyetini hafifleterek, periodontal dokular üzerinde koruyucu olarak rol oynamaktadır (Pestka ve ark., 2004).

Th2 hücreleri ürettikleri sitokinler aracılığıyla B hücrelerinin aktive olmasını ve antikor üretmesini sağlamakta; böylece humoral yanıtta katkıda bulunmaktadır. Ayrıca plazma hücrelerinin olgunlaşmasıyla da ilişkili bulunmuştur. Plazma hücreleri periodontal hastalıkların ilerleyen aşamalarında sayıca daha fazladır; bu duruma bağlı olarak Th2 hücrelerinin periodontal hastalığın ilerlemesiyle ilgili olduğu

gösterilmektedir. Th1 hücrelerinin ise stabil (örn. gingivitis gibi) lezyonlarda yoğunlukta olduğu ifade edilmektedir (Gemmell ve ark., 2007).

Th1 ve Th2 hücreleri periodontal dokularda birlikte bulunmaktadır. Periodontitisli hastaların enflame diş eti dokularından izole edilen CD4+T hücrelerinin, hem Th1 hem de Th2 sitokinlerini eksprese ettiği gösterilmektedir (Berglundh ve ark., 2002; Takeichi ve ark., 2000). Ancak Th1 ve Th2 hücrelerinin periodontal hastalıkların immünolojisi üzerindeki rolü ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalıklı dokularda Th2 hücrelerinin Th1 hücrelerine göre daha yoğun olduğu gösterilmektedir (Lappin ve ark., 2001).

Treg hücreleri, diğer Th hücrelerinin zararlı aktivitelerini bastırmakla görevli T hücreleridir (Corthay, 2009). Bu hücreler periodontal açıdan hastalıklı doku bölgelerinde bulunmaktadır. Periodontal doku hasarında koruyucu olarak rol oynamaktadır (Cekici ve ark., 2014). Ancak Treg'ler doku yıkımını hızlandıran enflamatuvar koşullar devam ettikçe kararsız ve işlevsiz hale gelmektedir (Alvarez ve ark., 2020). Kronik periodontitis lezyonlarında Treg hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (Parachuru ve ark., 2018). Treg hücreleri, TGF- β , IL-10 gibi antienflamatuvar sitokinler salgılamaktadır ve buna ek olarak kemik yıkımını inhibe etmektedir. Örneğin IL-10 sitokini; IL-17/Th17'nin oluşturduğu hücre aracılı enflamatuvar yanıtı inhibe ederek ve periodontal dokularda RANKL/OPG oranını düşürmektedir (Deng ve ark., 2022).

Alveoler kemik rezorpsiyonu, periodontal dokulardaki Th17/Treg dengesizliğinin sonucu olarak meydana gelmektedir, bu orandaki artış RANKL/OPG oranını kemik kaybını daha da artıran RANKL yönünde değiştirerek diğer proenflamatuvar sitokinlerin de artışına neden olmaktadır (Alvarez ve ark., 2019). Ayrıca periodontitisli dokulardan izole edilen kırmızı kompleks bakterilerinden *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

dokularda oluşturduğu enflamasyonun da, T hücrelerinin farklılaşmasını etkileyerek Th17/Treg arasındaki dengeyi bozduğu gösterilmektedir (Yang ve ark., 2017). Başka araştırmacılar da IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinler aracılığıyla Treg hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşebileceğini bildirmişlerdir (Dutzan ve ark., 2018).

Periodontal dokulardaki hasar, Treg infiltrasyonundaki artış ile kontrol edilmektedir. Ancak Treg'ler periodontitis ilerlemeye devam ettikçe bu durumu kompanse edemez ve Th17 hücrelerinin yoğunluğu artmaya başlar. Böylece kemik kaybı artmaya başlamaktadır (Deng ve ark., 2022).

Sonuç olarak Th1 ve Th17 hücreleri osteoklastojenik özellikleriyle kemik yıkımıyla ilişkilidir; Th2 ve Treg hücreleri ise enflamatuvar kemik yıkımını baskılayıcı özellikler göstermektedir (da Motta ve ark., 2020). Bazı araştırmacılar da periodontal hastalıkların kontrolü ve kemik yıkımının önlenmesinin, RANKL/RANK etkileşimine müdahale, T hücreleri ve antijen sunan hücre etkileşimine müdahalenin yanında koruyucu T hücrelerinin uyarılması gibi yöntemleri içermesi gerektiğini bildirmektedir (Taubman ve ark., 2005).

2.6.3. Treg ile İlişkili Biyobelirteçler (FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1, JAK3)

Forkhead Box Protein 3 (FOXP3):

2003 yılında Sakaguchi ve arkadaşları tarafından FOXP3, Treg hücre sınıfının transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Treg hücre alt kümeleri, CD25 ve FOXP3'ün ekspresyonuyla karakterize edilmektedir (Bluestone & Abbas, 2003). FOXP3, T hücre aktivasyonunda ve efektör genlerin baskılanmasında görev almaktadır. Treg hücrelerinin stabilitesi için sürekli FOXP3 ekspresyonu gerekmektedir (Attias ve ark.,

2019). FOXP3 aktivasyonu ve ekspresyonun Treg'ler için en spesifik belirteç olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle FOXP3 hücrelerinin Treg hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. (Chu ve ark., 2011). TGF- β 1 sinyali bozulmuş fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Treg hücrelerinin otoimmüniteyi baskılayamamasının, Treg hücrelerinin azalmasının yanı sıra FOXP3 ekspresyonundaki azalmayla da ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (Ouyang ve ark., 2010).

FOXP3'ün ise Treg hücrelerinin baskılayıcı özellikleri için gerekli olduğu ancak Treg hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olmadığı gösterilmektedir. Ayrıca FOXP3'ün, Treg öncül hücrelerinin moleküler özelliklerini güçlendirirerek Treg hücresine zararlı özellikleri tersine çevirme etkisinin de bulunduğu bildirilmiştir (Gavin ve ark., 2007).

FOXP3'ün bir diğer özelliği ise ROR γ t'ye bağlanarak IL-17 ekspresyonunu baskılamasıdır (Rudensky, 2011; Zhou ve ark., 2008). T hücreleri TGF- β 1 sinyaliyle uyarıldığı zaman Treg veya Th17 hücrelerine farklılaşma potansiyeli kazanmaktadır. FOXP3 indüksiyonu, ROR γ t aktivitesini inhibe ederek diğer proenflamatuvar sitokinlerin yokluğunda TGF- β 1'e yanıt olarak enflamatuvar Th17 hücrelerinin farklılaşmasını kısıtlamaktadır. Proenflamatuvar sitokinlerin varlığında ise bu durumun tam tersi söz konusudur. Bu süreçte özellikle lamina propria gibi dokularda TGF- β 1'in lokal konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olarak Th17 veya Treg hücrelerine farklılaşmayı desteklediği öne sürülmektedir. ROR γ t ve FOXP3 hücreleri arasındaki bu hassas denge, bağışıklık homeostazisinde kritik rol oynamaktadır (Zhou ve ark., 2008).

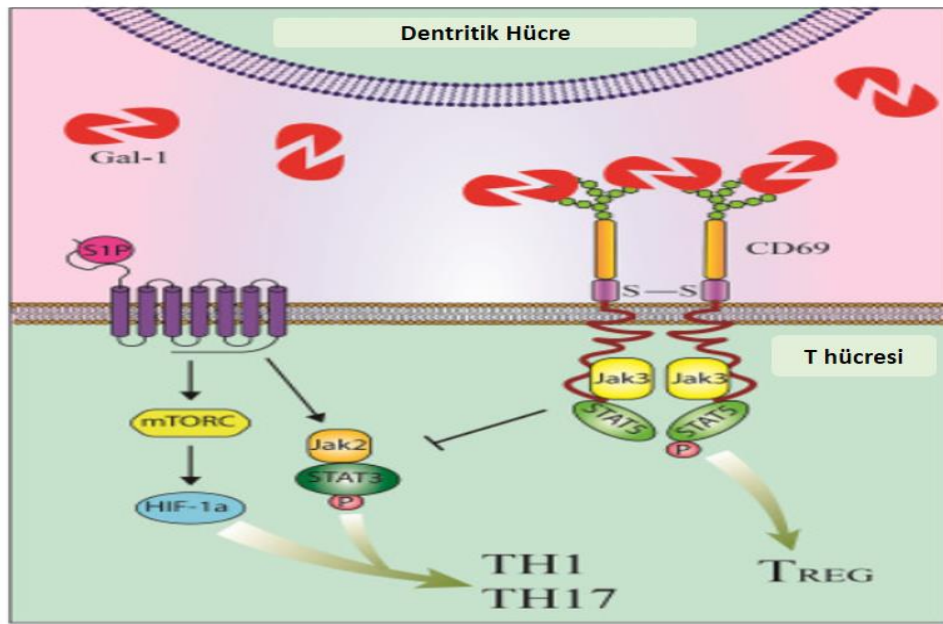
CD4+CD25+FOXP3+Treg hücrelerinin yaklaşık yarısı tarafından eksprese edilmektedir (Cortés ve ark., 2014). FOXP3⁺T hücreleri tarafından antijene bağımlı ve antijenden bağımsız yollarla uyarılmaktadır (Bremser ve ark., 2015). Timusta Treg hücrelerinin gelişimi için CD69 ekspresyonunun gerekli olduğu gösterilmektedir (Sánchez-Díaz ve ark., 2017).

Dendritik hücrelerde (DC) ve makrofajlarda Galektin-1 (Gal-1) isimli reseptör, CD69 için spesifik bir ligand olarak tanımlanmıştır. DC'ler üzerindeki Gal-1 ile T hücreleri üzerindeki CD69 arasındaki bağlantının, Th17 lenfositlerinin farklılaşmasını sınırlandırarak, enflamatuvar yanıtlar üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu düşünülmektedir (de la Fuente ve ark., 2014).

CD69'un TGF- β ekspresyonu üzerinde de etkili olduğu belirtilmektedir (Sancho ve ark., 2003). CD69'un, enflamasyon bölgesindeki TGF- β seviyelerini düzenleyerek rol oynadığı öne sürülmektedir. TGF- β ise, hem Treg hücrelerinin hem de Th17 hücrelerinin farklılaşmasına katıldığı için CD69, T hücresi farklılaşması sırasında TGF- β üzerinden bağışıklık yanıtlarını düzenleyerek Th17/Treg dengesinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Cortés ve ark., 2014). CD69'un, Th17 ve Treg'ler arasındaki bu dengeyi Treg hücrelerinin baskılayıcı özelliklerini güçlendirip, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını önleyerek koruduğu ve T hücrelerinin gelişimini, olgunlaşmasını ve ayrılmasını kontrol ettiği ve proenflamatuvar sitokinleri azaltarak kazanılmış bağışıklık yanıtlarını düzenlediği gösterilmektedir (Feng ve ark., 2002; Radulovic ve ark., 2012).

CD69'un Th17 hücreleri üzerindeki etkisi JAK/STAT yolu aracılığıyla meydana gelmektedir. CD69 sitoplazmik kuyruğu JAK3 ile birleşerek ROR γ t ifadesini düzenlemekte ve JAK3/STAT5 yolu aracılığıyla STAT5 fosforilasyonu

gerçekleşmektedir. Bu yol aktive olunca CD69, Th17 efektör hücrelerinin farklılaşmasını önleyerek immün ve enflamatuvar yanıtları düzenlemektedir (Martín ve ark., 2010). Fosforile olan STAT5'in de FOXP3 promotörünü doğrudan bağlayabildiğini ve dolayısıyla Treg gelişiminde ve farklılaşmasında bu yolun (STAT5 fosforilasyonun), bir rol oynadığı gösterilmektedir (Haxhinasto ve ark., 2008).



Şekil 2.6: CD69 ve sfingozin-1-fosfat reseptörü (S1P1) tarafından oluşturulan sinyalin, TH1/TH17 ve Treg hücre farklılaşması üzerine etkisi (Gorabi ve ark., 2020).

İnterlökin 2 (IL-2):

Sitokinler, hücrelerin düzenlenmesinde rol oynayan önemli moleküllerdir (Seymour & Gemmell, 2001). IL-2, hücre aracılı bağışıklıkta yer alan Th1 kaynaklı enflamatuvar bir sitokindir. Esas olarak Th1 hücreleri tarafından üretilmektedir ve T hücresi alt gruplarının, B lenfositlerin ve doğal katil (NK) hücrelerinin aktivasyonunu, büyüme ve farklılaşmasını uyarmaktadır (Cerdan ve ark., 1995). Aynı zamanda

periodontal hastalıklarda osteoklast aktivitesini uyararak kemik kaybını arttırmaktadır (Ries ve ark., 1989).

IL-2 kazanılmış bağışıklık yanıtlarının kontrolünde de rol oynamaktadır. Ayrıca bağışıklık yanıtlarını kontrol ederken foliküler T hücresi, bellek T hücresi gibi T hücre alt kümelerinin baskılanmasını engelleyerek hücrel ve humoral immun yanıtların oluşturulmasına izin vermektedir (Gasteiger & Kastenmuller, 2012).

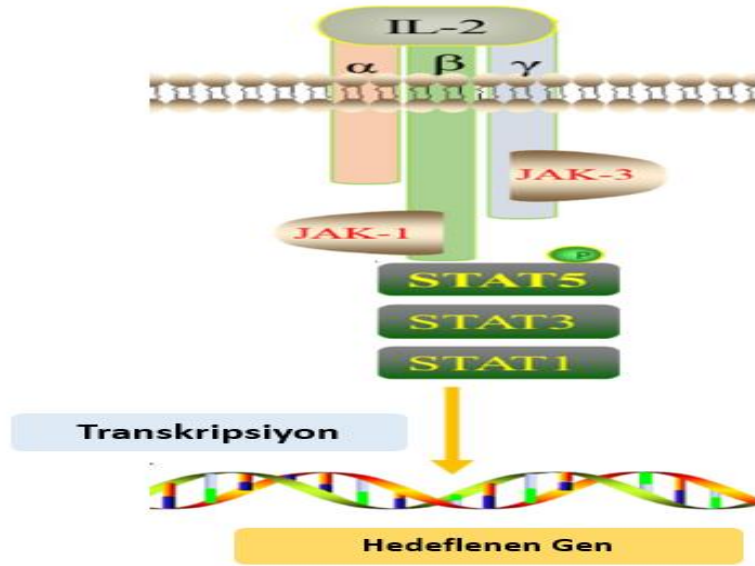
Diğer T hücrelerinden farklı olarak, Treg hücreleri IL-2 üretememekte olup komşu hücrelerdeki IL-2'ye ihtiyaç duymaktadır. Treg hücreleri IL-2'nin reseptörü olan IL-2 reseptör a-zincirini (IL-2Ra; CD25) eksprese etmektedir (Sakaguchi ve ark., 1995). Treg hücrelerinin IL-2 üretememesinin FOXP3'ün baskılayıcı aktivitesiyle ilişkili olduğu gösterilmektedir (Cheng ve ark., 2011). IL-2 üretimi arttıkça, reseptörü olan CD25'e bağlanarak CD25'in de kademeli olarak artmasına neden olmaktadır (Feinerman ve ark., 2010).

IL-2 sinyaline yanıt olarak çeşitli proteinler eksprese edilmektedir. Bu ekspresyon 3 farklı sinyal yolu aracılığıyla gerçekleşebilir. Bunlardan biri de Janus Kinaz/Sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatörünün (JAK/STAT) aracılık ettiği yoldur. Diğer iki yol ise Fosfotidilinositol 3 Kinaz/Protein Kinaz B/Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hücresindeki Hedefi (PI3K/Akt/mTOR) ve Mitojenle Aktive Protein Kinaz/Ekstraselüler Sinyal Regülasyon Kinaz (MAPK/ERK) yoludur (Arenas-Ramirez ve ark., 2015).

IL-2R sinyali, Treg hücrelerinin baskılayıcı özellikleri ve bu özelliklerinin korunması için gereklidir. Treg hücreleri farklılaştıktan sonra baskılayıcı fonksiyonunun güçlendirilmesi aşamasında önce IL-2 sitokininin Janus Kinaz 1 (JAK1) ve Janus Kinaz 3 (JAK3)'e bağlanması gerekmektedir. Ardından JAK1 ve JAK3 sırasıyla Sinyal

Dönüştürücü Transkripsiyon Aktivatörü 3 (STAT3) ile Sinyal Dönüştürücü Transkripsiyon Aktivatörü 5 (STAT5)'e bağlanarak STAT moleküllerinin aktif hale gelmesi sağlanmaktadır (Chinen ve ark., 2016; Fontenot ve ark., 2005; Frank ve ark., 1995). STAT5 aktivasyonu Treg'lerde FOXP3 ekspresyonu da uyarılmaktadır (Coskun ve ark., 2013).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada IL-2'nin STAT5 sinyali aracılığıyla Th17 farklılaşmasını engellediği ifade edilmektedir. Dendritik hücreler tarafından üretilen proenflamatuvar sitokinlerden gelen uyarılar ise, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını STAT3'ü aktive ederek sağlamaktadır (Laurence ve ark., 2007).



Şekil 2.7: IL-2 sitokin ailesinin JAK/STAT yolunu aktive ederek (hücre içi sinyalleri uyarması) çeşitli STAT proteinlerini fosforile etmesi (Zhou ve ark., 2023).

Timusta ve periferik dokularda IL-2, TGF- β 1 ile birlikte CD4+T hücrelerinin; timustan tamamen farklılaşmış saf hücreler olarak ayrılan FOXP3 eksprese eden Treg'lere farklılaşmasını uyarmaktadır (Gorabi ve ark., 2020). Ayrıca bu sitokinler FOXP3+Treg hücrelerinin sahip olduğu baskılayıcı özellikleri de negatif feedback mekanizmasıyla arttırmaktadır (Sakaguchi ve ark., 2020).

IL-2, Treg farklılaşmasını ve FOXP3 ekspresyonunu uyarırken aynı zamanda Th17 hücrelerini de antagonize etmektedir (Veldhoen ve ark., 2006). IL-2'nin bu yollardaki rolü ise, bağışıklık yanıtları sırasında meydana gelebilecek enflamasyonu sınırlamanın bir adımı olarak kabul edilmektedir. IL-2 tarafından sağlanan Treg ve Th17 hücrelerinin dengesi, bağışıklık yanıtlarının dokulara zarar vermesini önlemektedir (Laurence ve ark., 2007).

Treg'lerin homeostazisi, metabolizması ve kendi kendine toleransının korunması için IL-2'nin varlığı gereklidir (Liberal ve ark., 2015).

Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1):

TGF- β , embriyogenez, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve immün sistemin düzenlenmesi dâhil olmak üzere birçok biyolojik süreci düzenleyen bir sitokindir. Memelilerde TGF- β 'nın üç farklı izoformu vardır; TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3. Bunlardan TGF- β 1, bağışıklık hücrelerinde bulunan baskın formdur (Li ve ark., 2006). Treg'ler TGF- β 1, FOXP3, CD103, glukokortikoidle indüklenebilir TNF reseptörü (GITR), sitotoksik T lenfosit ile ilişkili inhibitör molekül 4 (CTLA-4) ve gibi fenotipik belirteçlerin ekspresyonuyla karakterize edilir (Garlet, 2010).

TGF- β 1, IL-2 ile birlikte T hücrelerinin çoğalmasında ve düzenlenmesinde rol oynayan bir sitokindir (Cortés ve ark., 2014). Treg hücreleri tarafından üretilen TGF-

$\beta 1$ 'in otoimmün yanıtları düzenlediği ve ayrıca oral ve periferik toleransın korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir (Turner ve ark., 2020).

TGF- β sinyalindeki eksikliğin timusta Treg hücrelerinin gelişimini engellediği görülmektedir (Lee ve ark., 2017). TGF- β , Treg hücrelerinin baskılayıcı özelliklerini FOXP3 üzerinden gerçekleştirir (Zheng ve ark., 2002). TGF- β hem periferik bağışıklıkta saf T hücrelerinin FOXP3+Treg hücrelerine farklılaşmasını uyarırken hem de Th17 hücrelerinin farklılaşmasına katılır. Th17 hücrelerinin kökeni ise $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg'ler ile yakından ilişkilidir (Korn ve ark., 2009).

Treg hücreleri enflamasyonun çözülmesi ve immün yanıtların baskılanmasındaki rollerini APC olgunlaşması, efektör hücre farklılaşmasının inhibisyonu ve IL-10, TGF- β , IL-35 gibi inhibitör sitokinlerin salgılanması yoluyla gerçekleştirmektedir (Medara ve ark., 2021). İmmün yanıtların düzenlenmesi ve enflamasyonun azaltılması; T hücrelerinin aktivasyonundan sonra eksprese edilen CD69'un enflamatuvar alanlarda doğrudan TGF- β sentezini uyarmasıyla gerçekleşmektedir (Sancho ve ark., 2003).

TGF- $\beta 1$, T hücrelerinin toleransını kontrol etmektedir. Ayrıca TGF- $\beta 1$, Th1'i inhibe etmekte ve IL-6 ile birlikte Th17 hücre farklılaşmasını desteklemektedir. TGF- $\beta 1$ 'in hem Treg hem de Th17 hücreleri üzerinde ikili rolünün bulunması nedeniyle efektör T hücrelerinin aracılık ettiği hastalıklarda immunoterapide TGF- $\beta 1$ 'den yararlanılabileceğini bildiren araştırmacılar vardır (Li ve ark., 2007).

Janus Kinaz 3 (JAK3):

Janus kinazlar (JAK'lar); JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2 olarak adlandırılan, reseptör özelliği olmayan sitoplazmik tirozin kinazların bir alt grubunu oluşturmaktadır. JAK1, JAK2 ve Tyk2 memelilerde her yerde eksprese edilirken, JAK3 öncelikle

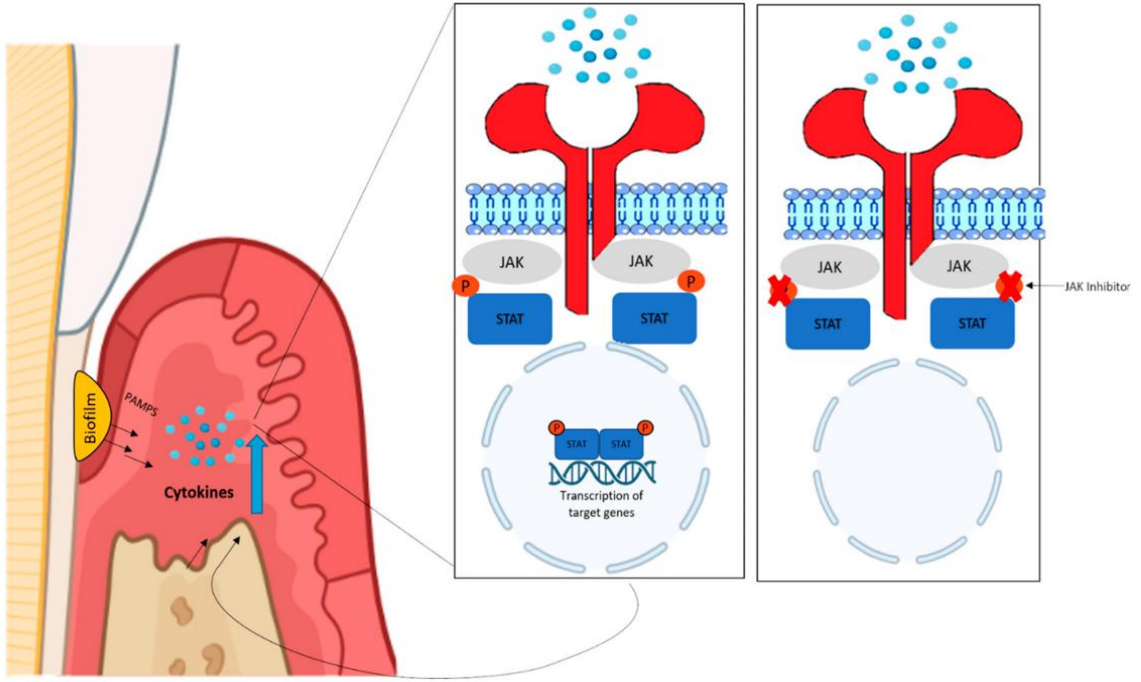
hematopoietik hücrelerde eksprese edilmektedir. Hematopoietik sitokinler ve büyüme faktörleri sinyal iletimi için JAK ailesinin üyelerini kullandığından, JAK'lar hücrelerin büyümesinde, hayatta kalmasında, gelişmesinde ve bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasında kritik bir önem taşımaktadır (Rane & Reddy, 1994; Yamaoka ve ark., 2004). Etkili bir doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtının oluşturulması ve enfeksiyondan korunmak için JAK sinyalleri gerekmektedir. Dört JAK ailesi üyesinin tümü, T hücresi gelişimi, çoğalması veya farklılaşmasından sorumlu olan sitokinlerden gelen sinyallerin iletilmesinde önemli rol oynamaktadır. JAK3, tüm bu yolların merkezinde rol oynayan tek JAK ailesi üyesidir (Ghoreschi ve ark., 2009). JAK3, periferik T hücrelerinin normal fenotipinin ve fonksiyonunun korunmasında rol oynamaktadır. IL-2, IL-4 ve IL-7 gibi sitokin reseptörleri aracılığıyla büyüme sinyallerine aracılık etmektedir (Saijo ve ark., 1997).

JAK'lar reseptörlerin hücre içi kısımlarına bağlanarak homo veya hetero-dimerler oluşturarak birbirlerini fosforile ederler ve bu da reseptörlerin üzerindeki hücre içi alanda tirozin kalıntıların fosforilasyonu ile sonuçlanır. Bu fosforile edilmiş kısımlar, sonraki STAT transkripsiyon faktörleri için kenetlenme bölgeleri olarak görev yapmaktadır (Saijo ve ark., 1997).

Sitokin reseptörlerinin tirozinle fosforilasyonu, sinyal molekülleri için bağlanma bölgeleri sağlamaktadır. Sitokin reseptörlerinden türetilmiş sinyallere aracılık eden transkripsiyonel aktiviteye sahip DNA bağlayıcı sinyal proteinlerinin ana ailesi STAT ailesidir. STAT'lar JAK'ların substratlarıdır, fosforile edilmiş reseptörlere bağlanmaktadır. STAT'lar fosforile halde etkileşime girebilmekte, dimerleşebilmekte, çekirdeğe geçebilmekte ve gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Sınırlı sayıda JAK'ın rehberliğinde sitokin aktivasyonunun bu kadar belirgin ve spesifik sinyal

mekanizmalarına sahip olması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Birçok sitokin, spesifik sinyal iletimi için yalnızca dört tirozin kinaz ve yedi STAT proteinini kullanmaktadır. Bu nedenle, sitokinler tarafından sağlanan bağışıklık yanıtlarıyla meydana gelen lenfositlerin gelişimi, hayatta kalması ve çoğalması, öncelikli olarak JAK'ların aktivasyonuna bağlanmaktadır (Ghoreschi ve ark., 2009).

Sitokinler T hücrelerinin farklılaşmasına yardımcı oldukları gibi JAK/STAT yolunun aktivasyonunda da rol oynamaktadır. TGF- β +IL-2, STAT5 aracılığıyla iTreg hücrelerinin farklılaşmasında rol oynamaktadır. Ayrıca IL-6 veya IL-21'in (STAT3 aracılığıyla) varlığında TGF- β ile uyarımı, TH17 hücrelerini aktive eder (Pollizzi & Powell, 2014; Takatori ve ark., 2008). IL-1, IL-6, IL-15, TNF- α ve IFN gibi sitokinler tarafından JAK/STAT yolunun uyarılması ise, romatoid artrit, multipl skleroz, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve periodontal hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Godoi ve ark., 2023).



Şekil 2.8: Periodontal hastalıklarda JAK/STAT yolu mekanizması (Godoi ve ark., 2023).

Mikrobiyal bileşenlerin patojenlerle ilişkili molekülleri (PAMP) savunma hücreleri tarafından tanınarak, periodontal dokularda enflamatuvar sitokinlerin artışıyla JAK/STAT yolunun uyarılır. Bu durum daha fazla enflamatuvar sitokin transdüksiyonuna yol açarak enflamatuvar yanıtı ve doku yıkımını artırır. JAK inhibitörleri, JAK'ların kinaz alanına bağlanarak inhibe eder. JAK'ların STAT'ları ve diğer substratları fosforile etmesini önler, böylece hücre içi sinyaller daha fazla iletilmez. JAK'lar birçok farklı sitokin için kritik olduğundan, JAK inhibitörleri bir dizi sitokinin etkisini bloke edebilir ve periodonsiyumdaki enflamatuvar yanıtın ve doku yıkımının azaltılmasına katkıda bulunabilir (Godoi ve ark., 2023).

Doğal bağışıklık sisteminde JAK3'ün antienflamatuvar olarak görev aldığı gösterilmiştir. *P. gingivalis*'in varlığında aktifleşen JAK3, proenflamatuvar sitokinlerin üretimini kısıtlamaktadır. JAK3, *P. gingivalis* aracılı periodontal hastalıklarda, hücre-hücre arasında iletişim sağlayan ve osteoblast fonksiyonunda görev alan Wnt3a- β -katenin sinyalini aktiveştirirerek periodontal hastalığın şiddetinin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Lü ve ark., 2020).

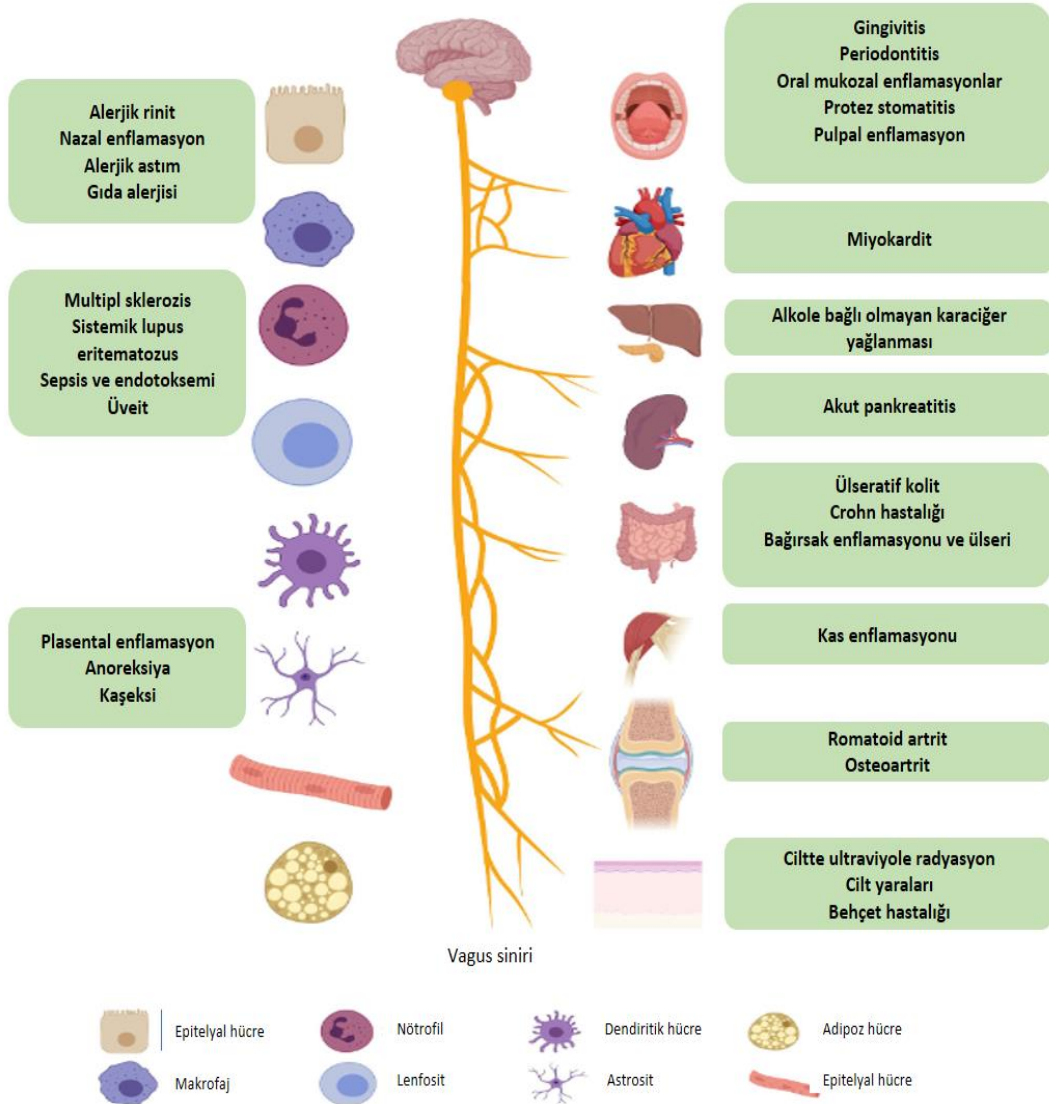
JAK3, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını düzenlemektedir. JAK3 aktivasyonu inhibe edildiğinde ROR γ t transkripsiyonun arttığı ve Th17 hücrelerine farklılaştığı gözlenmektedir. CD69 reseptörünün sitoplazmik kısmının, ROR γ t'nin transkripsiyonu ve dolayısıyla Th17 hücrelerine farklılaşmayı düzenleyen JAK3/STAT5 sinyal yolu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Martín ve ark., 2010).

2.7. SİGARA VE PERİODONTAL SAĞLIK

Tütün kullanımının her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olduğu; solunum sistemi, kardiyovasküler sistem, nörolojik rahatsızlıklar ve otoimmün hastalıklar gibi patolojilerin gelişiminin yanı sıra çeşitli kanser türleriyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yanbaeva ve ark., 2007).

Sigara, periodontal hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde de rol oynayan önemli bir risk faktörüdür. Hastalığın seyrini etkileyerek periodontitiste bir dereceden diğerine geçişi artırabilir (Tonetti ve ark., 2018).

Periodontitis riski sigara kullananlarda 2,5 ila 3,5 kat daha fazladır. (Bergström, 1989). Periodontal hastalıklar üzerinde sigaranın etkisi doza bağımlı olarak artmaktadır (Bergström, 2004).



Şekil 2.9: Nikotin tarafından düzenlenen enflamatuvar hastalıklar, ilgili organlar ve hücreler (Zhang ve ark., 2022).

2.7.1. Sigaranın Periodontal Dokular Üzerindeki Etkileri

Sigara hem diş eti epitelini hem de bağ dokusunu etkilemektedir. Sreedevi ve ark., (2012), sigara kullananlarda; PMNL'lerin azalmasına bağlı olarak enflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığını, damarlanmanın, sitokinlerin ve enzimlerin de azaldığını ifade etmektedir. Sigara kullanımının vasküler dokular üzerindeki etkilerinin nikotin

bileşiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nikotin, adrenalin ve noradrenalin üretimini uyararak vazokonstriksiyon etkiye neden olur ve bu durum kanama ve eksüda üretiminin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Sreedevi ve ark., 2012). Antihemorajik etkisiyle kızarıklık, ödem, kanama gibi klinik belirtiler baskılandığı için sigara kullanan bireylerde periodontal hastalıklar daha geç teşhis edilmektedir (Bergström, 2004). Sigara içenlerde enflamatuvar yanıtların değişimiyle birlikte kızarıklık ve kanama azaldığı için gingival indeks (GI) değerleri sağlıklı bireylerden daha düşük bulunmaktadır (Preber & Bergström, 1985). Ancak sigara kullanan periodontitis hastalarında periodontal ceplerin sayısının, derinliğinin ve ataçman kaybı miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir (Bergström, 2004).

Sigaranın epitel hücreleri üzerindeki etkileri ise histopatolojik incelemelerde fark edilmektedir. Rete peglerinde kalınlaşma, hücrelerde polarite kaybı ve parabazal hücrelerde artış meydana gelmektedir. Epiteldeki bu değişikliklerin epitelyal displazinin erken evrelerine benzer olduğu gösterilmektedir (Naderi ve ark., 2015).

Yüksek nikotin konsantrasyonlarının diş eti fibroblastlarının proliferasyonunu inhibe ettiği ve aynı zamanda tip 1 kollajen ve fibronektin üretimini azalttığı; kollajenaz aktivitesini ise arttırdığı belirtilmektedir. PDL'deki hücre proliferasyonu ve protein sentezi ise doza bağlı olacak şekilde inhibe edilmektedir. Periodontal tedavi sonrasında kök yüzeyine tutunan hücre sayısının sağlıklı bireylere göre sigara kullananlarda daha az olduğu gösterilmiştir (Tipton & Dabbous, 1995). Periodontal tedavi sonrası iyileşme de dâhil olmak üzere periodontal dokulardaki yara iyileşmesi, hastalıklı dokuların tamiri ve rejenerasyonu sigara kullananlarda sağlıklı bireylere göre daha yavaş olmaktadır. Ayrıca, sigara kullanımının dokuya zarar veren maddelerin (örn. reaktif oksijen türleri, kollajenaz, serin proteazlar ve proenflamatuvar sitokinler gibi) salınımını artırarak daha

güçlü bir enflamatuvar yanıtı neden olduğu ifade edilmektedir (Aishwaraya ve ark., 2022). Bununla birlikte sigara kullananlarda periodontopatojenlerden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Tannerella forsythesis* pozitif olan bireylerin sayısının da sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Zambon ve ark., 1996).

Sonuç olarak sigara cerrahi olmayan ve cerrahi periodontal tedavilere verilen yanıtı azaltarak klinik iyileşmeyi olumsuz etkilemektedir (Kinane ve ark., 2006). Sigara bırakıldığında periodontal hastalıkların başlama ve ilerleme riski azalmakta ve periodontal iyileşme süreci olumlu yönde etkilenmektedir (Fiorini ve ark., 2014).

2.7.2. Sigaranın Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkileri

Sigara dumanının bağışıklık sistemi üzerine etkileri dumana maruz kalma süresi ve miktarına, cinsiyete, etnik ve genetik faktörlere bağlı olabilmektedir. Kronik nikotin birikiminin antikör yanıtlarını inhibe ederek doğal ve kazanılmış bağışıklık hücre fonksiyonlarında bozukluklara neden olduğu gösterilmektedir (Aishwaraya ve ark., 2022; Elisia ve ark., 2020).

Sigara kullananlarda, bakteriyel enfeksiyona karşı ilk savunma hattı olan nötrofil sayısında önemli miktarda artış olmasına rağmen, nötrofillerin periferik dolaşımdaki fonksiyonları bozulmaktadır. Nötrofiller üzerindeki etkisi; elastaz ve kollajenaz gibi enzimlerin üretimini etkileyerek meydana gelmektedir. Elastaz, nötrofiller tarafından salınan başlıca proteazlardan biridir. Enflamasyon sırasında elastaz diş eti dokusuna salınmakta ve diş eti oluşu sıvısındaki miktarı artmaktadır. Bu durum doku yıkımı ve periodontal hastalıkların gelişimiyle sonuçlanmaktadır (Aishwaraya ve ark., 2022).

Makrofajlar fagositoz yoluyla patojenlere yanıt vererek enflamasyonda önemli bir rol oynamakta ve antijen sunma yetenekleriyle lenfositleri aktive etmektedir. Sigara dumanının, proenflamatuvar bir kemokin IL-8'in ekspresyonunu arttırarak ve enflamatuvar durumlara yanıt olarak makrofajlarda fagositozu baskıladığı gösterilmektedir (Ko ve ark., 2015).

Dendritik hücreler bağışıklık sisteminin özelleşmiş antijen sunan hücrelerindendir (APC'ler). Bu antijen sunan hücreler T hücrelerini güçlü bir şekilde aktive etmektedir ve bu nedenle primer spesifik bağışıklık yanıtının önemli başlatıcıları olarak kabul edilmektedir (Nouri-Shirazi & Guinet, 2003). Sigara kullanan bireylerde bakteriyel antijenlere yanıt olarak DC'ler tarafından üretilen IL-1 β , IL-10, IL-12 ve TNF- α gibi sitokinlerin daha düşük seviyelerde üretildiği ve T hücrelerinin çoğalma yeteneğinin nikotine bağlı olarak azaldığı belirtilmektedir (Aishwaraya ve ark., 2022).

Doğal öldürücü hücreler doğal bağışıklık sisteminin esansiyel bir elemanı olarak bulunmaktadır ve IFN- γ , TNF- α gibi sitokinler salgılayarak mikrobiyal enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı hızlı yanıtlar oluşturmaktadır. Sigara ise NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini baskılayarak sitokin üretimini azaltmaktadır (Mian ve ark., 2008).

Sigara dumanına maruziyet T hücrelerinin antijenlere karşı oluşturduğu yanıtları azaltmaktadır (Aishwaraya ve ark., 2022). Ayrıca T hücreleri pasif içicilikten de etkilenmektedir (Vardavas ve ark., 2010).

Sigara kullananlarda Th hücrelerinin aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Periodontitiste, stabil lezyonlara büyük oranda Th1 sitokin profiline sahip hücrelerin aracılık ettiği, ilerleyici lezyonların ise genel olarak Th2 benzeri hücreleri içerdiği kabul edilmektedir. Th2 hücreleri, B hücrelerinin gelişimini uyararak antikor ve

proenflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olmakta ve ardından dokularda yıkım meydana gelmektedir. Sigara, Th1/Th2 dengesini Th2'nin baskın olduğu tarafa yönlendirebileceğini, bunun da periodontitisin şiddetini artırabileceğini ya da tedavi edilen kişilerde hastalığın nüksetmesine neden olabileceğini, muhtemelen periodontal dokularda B hücrelerinin hiperaktivitesine yol açabileceğini göstermektedir. Bu durum sigaranın periodontal doku yıkımını arttırarak periodontal hastalıkların ilerlemesinde rol oynayan bir risk faktörü olması ile açıklanmaktadır (de Heens ve ark., 2009).

Treg'ler, immünoşüpresif özellikleri sayesinde immünolojik homeostazın sürdürülmesinde görevli önemli hücreler arasında yer almaktadır (Aishwaraya ve ark., 2022). Sigara, enflamasyon durumunda baskılayıcı özellik gösteren Treg'lerin sayısını azaltarak veya baskılayıcı özellikte olmayan Treg'lerin yoğunluğunu arttırarak düzenleyici T hücrelerinin immünoşüpresif fonksiyonunu bozmaktadır. Bazı bireylerde sigara kullanmanın Treg hücreleri sayısında artış meydana getirebileceği ve bu durumun solunum yolu enfeksiyonlarının ilerlemesine neden olabileceği bildirilmektedir (Qiu ve ark., 2017).

İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, sigara kullanımının bellek B hücrelerini ve IgE üretimini artırdığını, ancak düzenleyici B hücrelerini ve IgA, IgG ve IgM üretimini azalttığını, tütün dumanına maruziyetin kemik iliği kaynaklı prekürsör B hücreleri veya progenitor B hücrelerinin gelişimini azalttığını gösteren çelişkili veriler bulunmaktadır (Qiu ve ark., 2017).

2.7.3. Sigaranın Treg ile İlişkili Biyobelirteçler Üzerindeki Etkisi

Kronik enflamatuvar hastalıklarda meydana gelen doku hasarını önlemek için Treg ve FOXP3⁺ hücrelerinin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu konuyla alakalı

sigara ve tip-2 diyabetin ilerlemiş kronik periodontitisin immünolojik seyrindeki rolü üzerinde yapılan bir çalışmada sağlıklı, kronik periodontitisli, sigara kullanan kronik periodontitisli ve tip-2 diyabeti olan kronik periodontitisli gruplar arasında diş eti biyopsileri üzerinde FOXP3⁺ hücrelerinin sayısı immünohistokimya ile analiz edilmiştir. FOXP3⁺ hücrelerinin yoğunluğu değerlendirilmiştir. FOXP3⁺ hücre sayısı periodontitis gruplarında sağlıklı gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak kronik periodontitisli grup ile sigara kullanan kronik periodontitisli grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Duarte ve ark., 2011).

Sigara kullanmakta olup aynı zamanda kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) olan bireylerde yapılan çalışmada FOXP3 ekspresyonunun sigara kullanan KOA hastalarında, sigara kullanmayanlara göre daha düşük olduğu, sigara kullanan bireylerde sigara kullanmayan bireylere göre belirgin şekilde azaldığı gösterilmektedir (Chu ve ark., 2011). Bu durum FOXP3 hücrelerinin, akciğerde lokal enflamasyonun başlangıcı ve gelişimi sırasında kazanılmış immün yanıtta ve otoimmün bozukluklarda rol oynadığını düşündürmektedir.

Makrofajlar üzerindeki CD69, reseptör molekülü olarak enflamasyonun başlamasında rol oynamaktadır ve lenfositler için erken aktivasyon belirteci olarak görev yapmaktadır. CD69, çeşitli sitokinlerin ekspresyonunu ve enflamatuvar hücreleri düzenleyerek enflamasyon gelişimini desteklemektedir. Sigara dumanına maruziyet alveolar makrofajlarda CD69 yapımını uyarmaktadır (Tsuyusaki ve ark., 2011).

Piaggieschi ve arkadaşları (2021) tarafından IL-2'nin sigarayla ilişkili enflamatuvar durumlarda dolaşımdaki seviyesinin arttığı belirtilmektedir (Piaggieschi ve ark., 2021). Ancak yapılan önceki çalışmalarda bu durumla ilgili çelişkili veriler mevcut

olup sigara dumanının TNF- α , IL-1 β , IL-2 ve IFN- γ üretimini baskıladığı gösterilmiştir (Ouyang ve ark., 2000).

TGF- β 1 bağışıklık yanıtlarını, hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını, doku onarımını ve hücre dışı matris üretimini düzenlemektedir (Celedon ve ark., 2004). Yapılan çalışmalar, sigara dumanının epitelyal hücrelerin TGF- β 1 üretimini uyardığını göstermektedir (Wang ve ark., 2005). Ayrıca sigara kullanan bireylerde artan TGF- β 1 ekspresyonunun akciğer hastalıklarının ilerlemesiyle ilişkili olduğu ifade edilmektedir (González-Santiago ve ark., 2011; Sterlacci ve ark., 2012).

Sigaranın JAK3/STAT3/NF-kB sinyalleriyle ilgili proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı ifade edilmektedir (Huan ve ark., 2017). Bir çalışmada sigara dumanının insan periferel kan mononükleer hücrelerindeki (PBMC) IL-15 üretimini baskıladığı, IL-15'in ise IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 ve IL-21 sitokinleriyle ortak olarak bağlandığı gama zinciri (γ c) reseptörü bulunduğu, γ c reseptörünün de JAK3'ün bağlandığı ardından STAT moleküllerinin fosforilasyonu ile devam eden bir yola aracılık ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle sigara dumanı nedeniyle IL-15'in inhibe edilmesinin STAT3 ve STAT5 moleküllerinin fonksiyonlarında azalmaya neden olabileceği belirtilmektedir (Mian ve ark., 2009; Vargas-Hernández & Forbes, 2019). Sigaranın IL-15 inhibisyonunda rol oynadığı dolaylı bir yol aracılığıyla da JAK3 düzeylerini etkilemesi muhtemeldir.

3. YÖNTEM

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na muayene ve tedavi olmak için başvuran hastalar arasından çalışmanın dâhil edilme kriterlerini karşılayan hastalar üzerinde yapılmıştır.

Çalışmamıza, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22-KAEK-288 kayıt numaralı 22.12.2022 tarihli onayını takiben başlanmıştır. Bu çalışma Tokat Gaziomanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2023-27 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Tüm hastalar çalışma hakkında detaylı şekilde bilgilendirilip kendilerinden yazılı ve sözlü onam alınmıştır.

3.1. HASTA SEÇİM KRİTERLERİ

Çalışmamız; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji kliniğine başvuran ve çalışmaya katılmaya gönüllü olan bireyler arasından seçilmiştir.

Hastaların seçiminde dâhil edilme ve dâhil edilmeme kriterleri aşağıdaki gibidir:

Dâhil edilme kriterleri

- 1- Sistemik olarak sağlıklı olması
- 2- 25-65 yaş aralığında olması
- 3- Ağızda fonksiyonda olan en az 20 dişinin bulunması
- 4- Grup A ve C hastaları için sigara kullanmıyor olması; Grup B ve D hastaları için günde 10 ya da daha fazla sayıda sigara kullanıyor olması
- 5- Ağızda rezektif cerrahi işlem ihtiyacı olması

Dâhil edilmeme kriterleri

- 1- Gebelik ve laktasyon döneminde olanlar
- 2- Çalışmaya katılmayı reddeden bireyler
- 3- Kooperasyon kurulamayan hastalar
- 4- Son 6 ay içinde herhangi bir ilaç tedavisi ve ileri periodontal tedavi almış olması

Aydınlatılmış onam formunu imzalayan toplam 40 hasta çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışmanın ara aşamalarında her gruptan birer hasta çıkarıldığı için çalışma toplam 36 hasta ile tamamlanmıştır.

3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI

Grup A: Periodontal açıdan sağlıklı grup (n=9; 7 kadın, 2 erkek)

Periodontal sağlık, 2017 Dünya Periodontal Hastalıklar ve Durumların Sınıflandırılması Çalıştayı tarafından tanımlanan klinik ve radyografik kriterlere göre teşhis edildi. Periodontal sağlık kriterlerini karşılayan eksiksiz (tam) periodonsiyumda herhangi bir dişinde patolojik cep varlığı bulunmayan, radyografik değerlendirmede kemik kaybı gözlenmeyen hastalardan oluşturulmuştur (Caton ve ark., 2018).

Grup B: Periodontal açıdan sağlıklı sigara kullanan grup (n=9; 4 kadın, 5 erkek)

Periodontal sağlık, 2017 Dünya Periodontal Hastalıklar ve Durumların Sınıflandırılması Çalıştayı tarafından tanımlanan klinik ve radyografik kriterlere göre teşhis edildi. Klinik ve radyografik değerlendirmeyi takiben herhangi bir dişinde patolojik cep varlığı bulunmayan, radyografik değerlendirmede kemik kaybı gözlenmeyen, günde 10 ya da daha fazla sayıda sigara kullanan hastalardan oluşturulmuştur (Caton ve ark., 2018).

Grup C: Evre III Derece C periodontitis hasta grubu (n=9; 4 kadın, 5 erkek)

Periodontitis tanısı, 2017 Dünya Periodontal Hastalıklar ve Durumların Sınıflandırılması Çalıştayı tarafından tanımlanan klinik ve radyografik kriterlere göre teşhis edildi (Caton ve ark., 2018).

Grup D: Evre III Derece C periodontitis sigara kullanan hasta grubu (n=9; 9 erkek)

2017 Dünya Periodontal Hastalıklar ve Durumların Sınıflandırılması Çalıştayı tarafından tanımlanan Evre III Derece C periodontitis hastalarının klinik ve radyografik kriterlerini karşılayan, bu duruma ek olarak aynı zamanda günde 10 ya da daha fazla sayıda sigara kullanan hastalardan oluşturulmuştur (Caton ve ark., 2018).

3.3. KLİNİK PERİODONTAL ÖLÇÜMLER

Tüm hastalardan; plak indeksi (Pİ), gingival indeks (Gİ), sondalamada cep derinliği (CD), sondalamada kanama (SK), klinik ataçman seviyesi (AS) verileri toplanmış ve kaydedilmiştir. Klinik periodontal ölçümlerden Pİ, Gİ dört bölgeden (mezial, bukkal, distal ve palatinal/lingual) CD, SK ve AS diş çevresinin altı yerinden (mezio-bukkal, bukkal, disto-bukkal, mezio-palatinal/lingual, mid-palatinal/lingual ve disto-palatinal/lingual) Williams sondu (Hu-FriedyCo., Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır.

3.3.1. Plak İndeksi (Pİ)

Pİ ölçümü için Silness ve Loe tarafından tanımlanmış olan skarlama sistemi kullanılmaktadır (Silness & Loe, 1964). Periodontal sond diş eti kenarı ve diş eti oluğu

bölgesinde diş yüzeyine paralel olarak gezdirilerek, biriken plak miktarı değerlendirilmiş ve 0-3 arasında skorlanmıştır.

0: Diş eti bölgesinde plak bulunmamaktadır.

1: Serbest diş eti kenarına ve dişin bitişiğindeki alana yapışan, yalnızca diş yüzeyinde bir sond ile fark edilebilen plak varlığı. Diş yüzeyindeki plak sondu sürterek veya boyayıcı solüsyon uygulanarak görülebilmektedir. Plak gözle görünmez.

2: Diş eti cebi içinde, diş eti kenarında ve/veya komşu diş yüzeyinde gözle görülebilen orta derecede yumuşak plak birikimi mevcuttur.

3: Diş eti cebinde ve/veya diş eti kenarı ve komşu diş yüzeyinde yoğun bir yumuşak plak birikimi vardır (Silness & Löe, 1964).

3.3.2. Gingival İndeks (Gİ)

Diş eti enflamasyonunu değerlendirmek için Löe Silness Gingival İndeksi (Gİ) kullanılmıştır (Löe & Silness, 1963). Periodontal sond dişin uzun aksına dik olarak diş eti kenarına temas ettirilip diş yüzeyinde gezdirilir. Bu şekilde oluşan kanamaya ve diş eti yüzey özelliklerine göre 0-3 arasında skarlama yapılır.

0: Sağlıklı diş eti

1: Hafif enflamasyon ve renk değişikliği, aynı zamanda ödem vardır. Sontlamada yapıldığında diş etinde kanama görülmez.

2: Orta derecede enflamasyon, kızarıklık, ödem ve sondalamada kanama mevcuttur.

3: Şiddetli enflamasyon belirtileri görülür. Belirgin şekilde kızarıklık, ödem ve ülserasyon görülür. Spontan kanama görülebilir (Löe & Silness, 1963).

3.3.3. Sondalamada Cep Derinliği (CD)

Periodontal sond, sulkus ya da cep içerisine yerleştirildikten sonra dirençle karşılaşınca kadar ilerletilir, direnç ile hissedildiği zaman sondalama derinliği ölçülmektedir (Aguero ve ark., 1995).

3.3.4. Sondalamada Kanama (SK)

Sondalamada kanama, periodontal sağlık veya hastalığın değerlendirilmesi için klinik indekslerin oluşturulmasında kullanılmıştır. Sondalama sonrası kanayan bölgeler SK (+) olarak ifade edilmektedir. Sondalama sırasındaki kanamalı bölge sayısı, sondalanan bölge sayısına bölünerek kanama yüzdesi bulunmuştur (Ainamo & Bay, 1975).

3.3.5. Klinik Ataçman Seviyesi (AS)

Mine-sement sınırıyla cep tabanı arasındaki uzaklığın ölçülmesi ile klinik ataçman seviyesi hesaplanmaktadır (Newman ve ark., 2018).

3.4. DİŞ ETİ ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Kuron boyu uzatma, gingivektomi ve flep operasyonu vb. periodontal cerrahi işlemler sırasında rezeke edilen dokular diş eti örnekleri olarak kullanılmıştır. Diş eti örneklerinin 2x2 mm ebatlarında olmasına dikkat edilmiştir (Brex ve ark., 1987).

3.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Diş eti örnekleri bireylerden alındıktan hemen sonra %10'luk formaldehit içerisine alınmış ve yirmi dört saat boyunca fiksasyona maruz bırakılmıştır. Fiksasyonu

takiben dokulara nüfuz eden formaldehiti uzaklaştırabilmek için; dokular sekiz saat boyunca akan su altında yıkamaya alınmıştır. Daha sonra dokulardan suyu uzaklaştırabilmek için örnekler %70'ten %100'e kadar artan alkol serilerinde dehidrate edilmiştir. Son olarak dokulardaki alkol ile yer değiştirmesi için örnekler ksilene maruz bırakılmış ve bu işlemi takiben 60°C sıcaklıktaki etüvde parafin içerisinde bekletilerek, doku içerisine parafinin nüfuz etmesi sağlanmış ve dokular parafine gömülerek bloklar elde edilmiştir.

İmmünohistokimyasal analizler için parafin bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında alınan kesitler bir gece boyunca 56°C'de inkübe edildi. Boyama prosedürü öncesinde her bloktan kesitler seçilmiştir. Seçilen tüm kesitlere immünohistokimya protokolü uygulanmıştır.

İlk olarak tüm kesitler ksilen ile deparafinize edilip, azalan alkol serisi ile dehidratasyona maruz bırakılmıştır. Son alkol aşamasından sonra distile su ile yıkanan preparatlarda yer alan dokuların endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit ile baskılanmıştır. Daha sonra fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile üç kez beşer dakika (3x5) boyunca yıkanmıştır. Hidrojen peroksit uygulandıktan sonra tüm kesitler spesifik olmayan reaksiyonları engelleyebilmek için protein blok serumu (Thermo scientific) ile 10 dakika inkübe edilmiş ve takiben yıkama yapmadan dokular primer antikor ile 4°C'de nemlendirilmiş bir ortamda gece boyunca inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonundan sonra, tüm kesitler PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkanmış ve de biyotinlenmiş immünoglobulin G (Thermo scientific) ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından yine 3x5 PBS ile yıkama yapılmış ve tüm numuneler 20 dakika streptavidin peroksidaz (Thermo scientific) ile konjuge reaktife maruz bırakılmıştır. 3x5 PBS ile yıkandıktan sonra, peroksidaz aktivitesi Diaminobenzidin tetra hidroklorid

(DAB) kromojeni ile immünoaktivite görünür hale getirildi. İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan dokulara son olarak Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapılmış ve kesitler entellan kullanılarak kapatılmıştır.

Boyanan kesitler kuruyunca ışık mikroskobu (Leica DM750) kullanılarak 20X büyütme altında incelenmiştir. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi ile antibody diluent (ScyTek) ile FOXP3 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), CD69 (Biorbyt Explore Bioreagents, 1:75), IL-2 (FineTest, 1:100), TGF- β 1 (FineTest, 1:50) ve JAK3 (FineTest, 1:100) antikorları seyreltilmiştir ve bu belirteçlerinin dokulardaki ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Sağlıklı, sigara kullanan sağlıklı, periodontitis, sigara kullanan periodontitis olmak üzere çalışmamızdaki dört farklı grupta yer alan örneklerden dokuz farklı bireyin dokuları incelenmiş ve her dokudan beş farklı bölge rastgele seçilerek değerlendirmeye tabii tutulmuştur.

3.5.1. İmmünohistokimyasal H Skor Analizi

Diş etinde epitel doku ve epitelin altındaki bağ doku incelenmiştir. Her kesitten beş alan seçilip, analiz edilmiştir. Seçilen alanlarda hücrelerin boyanma yoğunluğuna göre [0 (boyanma yok), +1 (zayıf fakat tespit edilebilir boyanma), +2 (orta şiddetli boyanma) ve +3 (yoğun boyanma)] hücre sayımı yapılmıştır. Hesaplama için HSCORE formülü kullanılmıştır [$\sum P_i (i+1)$: i boyanma yoğunluğu skorunu, P_i boyanan hücrelerin yüzdesini gösterir]. Değerler belirlenirken iki gözlemcinin hesapladığı skorların ortalaması alınmıştır. Gerekli istatistiksel analizler bu skorlar üzerinden yapılmıştır.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada G*Power 3.1 programı ile örneklem büyüklüğü hesaplanmıştır. Daha önce yapılan araştırmaların ölçümlerinden faydalananarak %95 güven ($1-\alpha$), %99 test gücü ($1-\beta$), $f=1,188$ (large effect size) etki büyüklüğü ile One Way ANOVA power analizi sonucuna göre çalışma için toplam 32 hasta alınması gerekmektedir (da Motta ve ark., 2020). Araştırma dışına çıkabilecek olgular bulanabileceği de dikkate alınarak kişi sayısı artırılarak her bir grupta 10 kişi olmak üzere toplam 40 vaka ile çalışmanın yapılması planlanmıştır. Ancak immunohistokimya aşamasındaki çeşitli aksaklıklardan dolayı her gruptan birer örnek çıkarılarak vaka sayısı 36'ya düşürülmüştür.

Tüm istatistiksel değerlendirmeler IBM SPSS Statistics 20.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

Kategorik verilerin analizinde Fisher's exact testi kullanılmıştır. Yaş, IL-2 epitel ve bağ doku, FOXP3 bağ doku, CD69 epitel ve bağ doku, TGF- β 1 epitel ve bağ doku, JAK3 epitel ve bağ doku verileri normal dağılım gösterdiği için parametrik testlerle, diğer veri grupları plak indeksi, gingival indeks, cep derinliği, sondalamada kanama, ataçman seviyesi ve FOXP3 epitel doku değerleri normal dağılım göstermediği için nonparametrik testlerle değerlendirilmiştir.

Gruplar arası farklar yaş, IL-2 bağ doku, CD69 epitel ve bağ doku, TGF- β 1 epitel ve bağ doku, JAK3 epitel ve bağ doku verileri için ANOVA ve Tukey testleri ile değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen Levene testi sonucunda varyansların homojen olmadığı anlaşılan IL-2 epitel doku ve FOXP3 bağ doku verileri için Welch ANOVA ve Tamhane's T2 testleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen plak indeksi, gingival indeks, cep derinliği, sondalamada kanama, ataçman seviyesi ve FOXP3 epitel dokuda

gruplar arası farkları değerlendirmek için Kruskal Wallis testi, ikili karşılaştırmalar içinse bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Ayrıca yaş ile biyobelirteçlerin değerleri arasındaki ve biyobelirteç değerlerinin kendi aralarındaki korelasyon ilişkilerini değerlendirmek için FOXP3 ED'nin dahil olduğu analizlerde Spearman Korelasyon testi; diğer analizlerde Pearson Korelasyon testi kullanılmıştır.

Normal dağılım gösteren verilerin tablosu yapılırken 'Ortalama $\pm$ SS' değerleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin tablolaması yapılırken ise 'Median (Minimum-Maksimum)' değerleri kullanılmıştır. Yanılma düzeyi olarak $p=0,05$ değeri belirlenmiştir ve bu değere eşit ya da bu değerden küçük sonuçlar için "istatistiksel olarak anlamlı" yorumu yapılmıştır. $p=0,001$ değerine eşit ya da bu değerden küçük sonuçlar için ise; "istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı" yorumu yapılmıştır.

4. BULGULAR VE YORUMLAR

Çalışmanın demografik bulguları Tablo 4.1, Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Klinik bulgular ise Tablo 4.3’te verilmiştir. İmmunohistokimya H skor verileri Tablo 4.4’te gösterilmiştir.

4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR

Tablo 4.1: Gruplara Göre Cinsiyet Dağılımı Tablosu

	Gruplar				Total	p
	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D		
Cinsiyet						
Kadın	7 (77,8) ^a	4 (44,4) ^a	4 (44,4) ^a	0 (0) ^b	15 (41,7)	0,008*
Erkek	2 (22,2) ^a	5 (55,6) ^a	5 (55,6) ^a	9 (100) ^b	21 (58,3)	

*Fisher's exact test

^{a-b} Cinsiyet dağılımında aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Veriler N (%) olarak gösterilmiştir.

Hastaların cinsiyetleri bakımından Grup D ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p= 0,008$). Cinsiyet kategorisinde Grup A, Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p> 0,05$).

Tablo 4.2: Gruplara Göre Yaş Dağılımı Tablosu

	Gruplar				Test İst.	p
	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D		
Yaş	37,78 ± 9,61 ^{ab}	34 ± 9,04 ^b	40,89 ± 7,08 ^{ab}	48 ± 6,34 ^a	4,791	0,007*

*ANOVA

^{a-b} Her bir değer için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Hastaların ortalama yaş değerleri gruplara göre farklılık göstermektedir ($p= 0,007$). Sadece Grup B ve Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p< 0,05$). Ancak diğer gruplar arası eşleştirmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p> 0,05$).

Tablo 4.3: Yaş ve Belirteçler Arasındaki Korelasyon Analizi Tablosu

	Yaş	
	r	p
FOXP3 ED	-0,228	0,181*
FOXP3 BD	0,263	0,121**
CD69 ED	-0,061	0,723**
CD69 BD	-0,011	0,947**
IL-2 ED	0,541	0,001**
IL-2 BD	0,451	0,006**
TGFB1 ED	-0,295	0,081**
TGFB1 BD	0,224	0,189**
JAK3 ED	-0,203	0,236**
JAK3 BD	0,269	0,112**

*Spearman's korelasyon analizi

**Pearson korelasyon analizi

Yaş ile IL-2 epitel doku ve bağ doku ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) pozitif yönlü orta seviyede korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir. Yaş ile diğer belirteçler arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir ($p > 0,05$).

4.2. KLİNİK BULGULAR

Tablo 4.4: Klinik Parametrik Bulguların Gruplara Göre Dağılım Tablosu

	Gruplar				Test İst.	p*
	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D		
PI	1 (0 - 2) ^a 0,89 ± 0,78	1 (0 - 2) ^{ab} 1,22 ± 0,83	2 (1 - 3) ^{ab} 1,67 ± 0,71	2 (1 - 3) ^b 2 ± 0,71	8,497	0,037
GI	1 (1 - 2) ^{ab} 1,44 ± 0,53	1 (1 - 2) ^b 1,33 ± 0,5	2 (1 - 3) ^a 2,11 ± 0,6	1,5 (1 - 2) ^{ab} 1,39 ± 0,35	9,448	0,024
CD	3 (1 - 4) ^b 2,44 ± 1,01	3 (2 - 5) ^b 3,33 ± 1	8 (7 - 10) ^a 8,11 ± 1,05	8 (8 - 10) ^a 8,67 ± 0,87	27,900	<0,001
SK	0 (0 - 25) ^b 9,58 ± 11,49	0 (0 - 26,6) ^b 6,78 ± 10,53	77,3 (55,3 - 86,3) ^a 74,6 ± 10,31	61,2 (45,5 - 77,8) ^a 60,3 ± 9,3	28,796	<0,001
AS	0 (0 - 0) ^b 0 ± 0	0 (0 - 0) ^b 0 ± 0	6 (5 - 8) ^a 6,33 ± 1	6 (6 - 8) ^a 6,67 ± 0,87	30,616	<0,001

*Kruskal-Wallis

^{a-b} Her bir değer için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.

Plak indeksi (Pİ) değerleri karşılaştırıldığında; Grup A ve Grup D istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0,05$). Ancak; Grup A, Grup B, Grup C ve Grup B, Grup C, Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$).

Gingival indeks (Gİ) değerleri karşılaştırıldığında ise, Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Sondalamada cep derinliği (CD) karşılaştırıldığında; Grup A ile Grup B arasında ve Grup C ile Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak hem Grup A'nın hem de Grup B'nin verileri; hem Grup C'nin hem de Grup D'nin verileri ile istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,001$).

Sondalamada kanama (SK) değerleri karşılaştırıldığında Grup A ve Grup B arasında ve Grup C ile Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak Grup A'nın hem de Grup B'nin verileri; hem Grup C'nin hem de Grup D'nin verileri ile istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,001$).

Ataçman seviyesi (AS), Grup A ve Grup B'de ataçman kaybı olmadığı için değerler 0 dır. Grup C ile Grup D arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

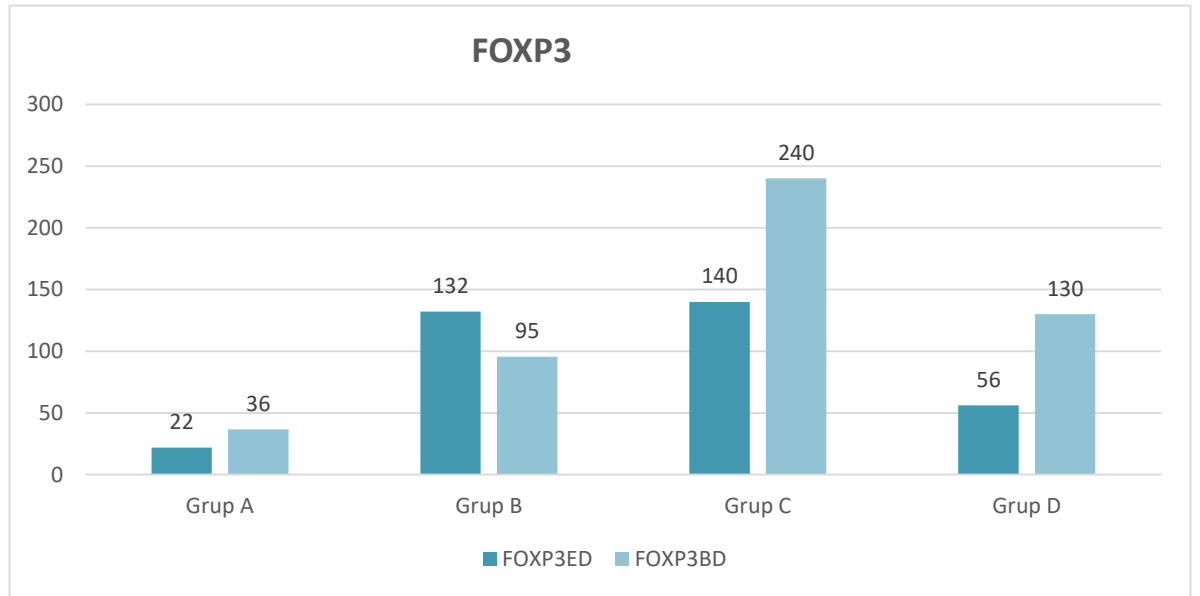
4.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Tablo 4.5: Biyobelirteç Değerlerinin Epitel ve Bağ Dokuda Gruplara Göre Karşılaştırılması Tablosu

	Gruplar				Test İst.	p*
	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D		
IL-2ED	84,44 ± 31,67 ^c	107,78 ± 22,24 ^c	172,22 ± 10,93 ^b	283,33 ± 13,23 ^a	212,601	<0,001 ^x
IL-2BD	64,44 ± 21,86 ^c	118,89 ± 27,13 ^b	234,44 ± 28,33 ^a	248,89 ± 26,67 ^a	105,961	<0,001 ^y
CD69ED	98,89 ± 40,45 ^c	220,00 ± 54,77 ^a	163,33 ± 25,00 ^b	220,00 ± 47,70 ^a	15,888	<0,001 ^y
CD69BD	28,89 ± 24,21 ^b	150,00 ± 55,45 ^a	207,78 ± 62,41 ^a	150,00 ± 64,23 ^a	17,468	<0,001 ^y
FOXP3ED	30(0-50) ^b	90(70-230) ^a	120(30-240) ^a	50(0-150) ^{ab}	16,818	0,001 ^z
	22,22 ± 18,56	132,22 ± 69,24	140 ± 84,71	56,67 ± 62,65		
FOXP3BD	36,67 ± 25,98 ^c	95,56 ± 50,03 ^{ac}	240,00 ± 47,43 ^b	130,00 ± 80,62 ^a	40,16	<0,001 ^x
TGFB1-ED	240 ± 60,83 ^b	150 ± 58,09 ^a	130 ± 46,64 ^a	150 ± 72,8 ^a	6	0,002 ^y
TGFB1-BD	170 ± 39,69 ^b	140 ± 49,24 ^b	180 ± 39,37 ^b	240 ± 46,64 ^a	8,194	<0,001 ^y
JAK3-ED	120 ± 47,96 ^b	90 ± 28,72 ^{ab}	70 ± 27,84 ^a	100 ± 25,5 ^{ab}	3,429	0,029 ^y
JAK3-BD	70 ± 30,41 ^c	120 ± 25,5 ^b	200 ± 28,72 ^a	220 ± 50 ^a	35,939	<0,001 ^y

^x: Welch testi, ^y: ANOVA, ^z: Kruskal-Wallis testi

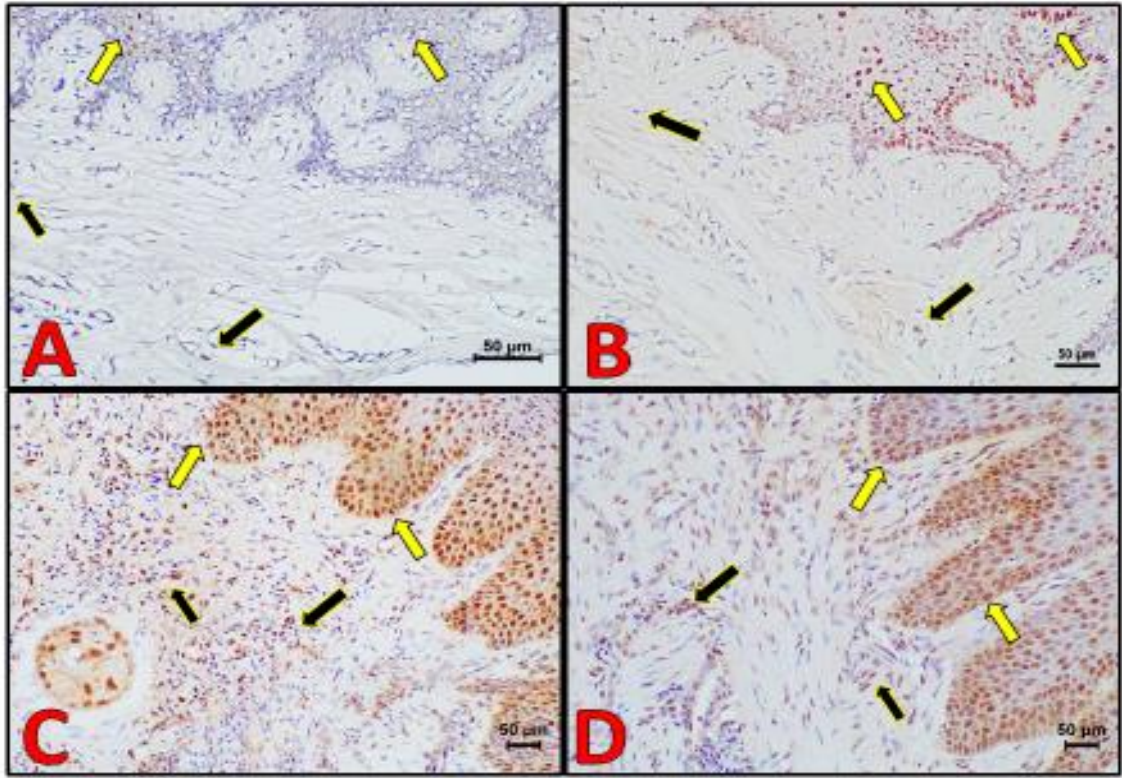
a-c: Herbir değer için aynı harfe sahip gruplar arasında fark yoktur.



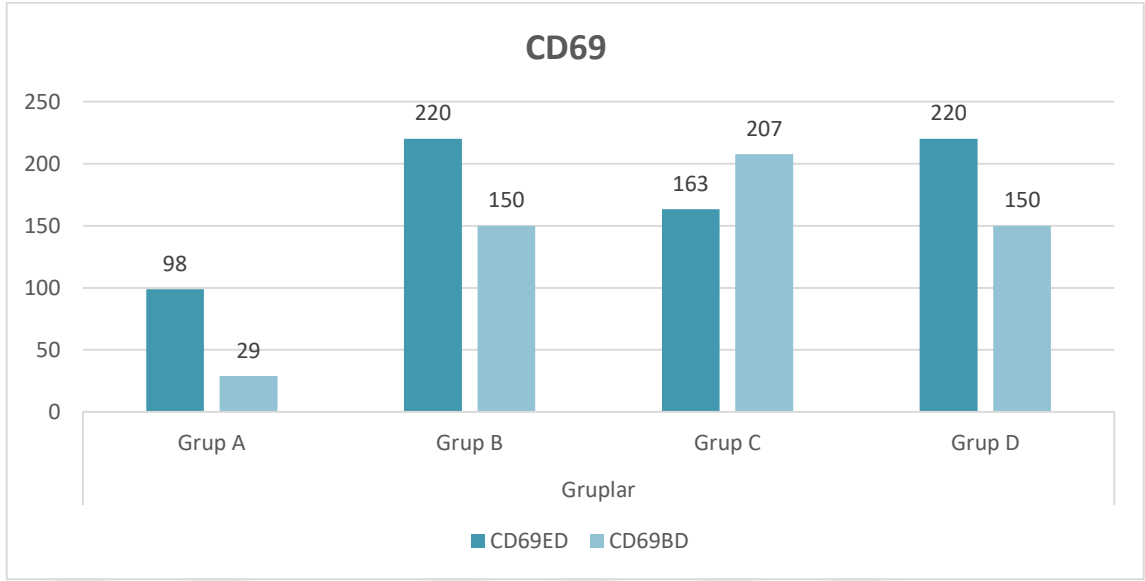
Şekil 4.1: FOXP3 H Skor Değerleri Grafiği

Epitel dokuda FOXP3 ekspresyonu değerlendirildiğinde; Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak Grup A'nın verileriyle hem Grup B hem de Grup C'nin verileri arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$). Grup A'da Grup B ve Grup C'ye göre daha düşük değerler gözlenmektedir. Grup D'nin verileri ise diğer üç grup ile benzerdir ($p > 0,05$).

Bağ dokuda Grup B'de Grup A'ya göre hafif artış gözlenmekte olup; ancak iki grubun verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Grup C ise, Grup A ve Grup B'ye göre istatistiksel olarak ileri derece anlamlı, artmış FOXP3 ekspresyonu göstermektedir ($p < 0,001$). Grup D, Grup A'ya göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı daha yüksek değerler; Grup C'ye göre ise istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı daha düşük değerler göstermektedir ($p < 0,001$). Grup B ve Grup D'nin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$).



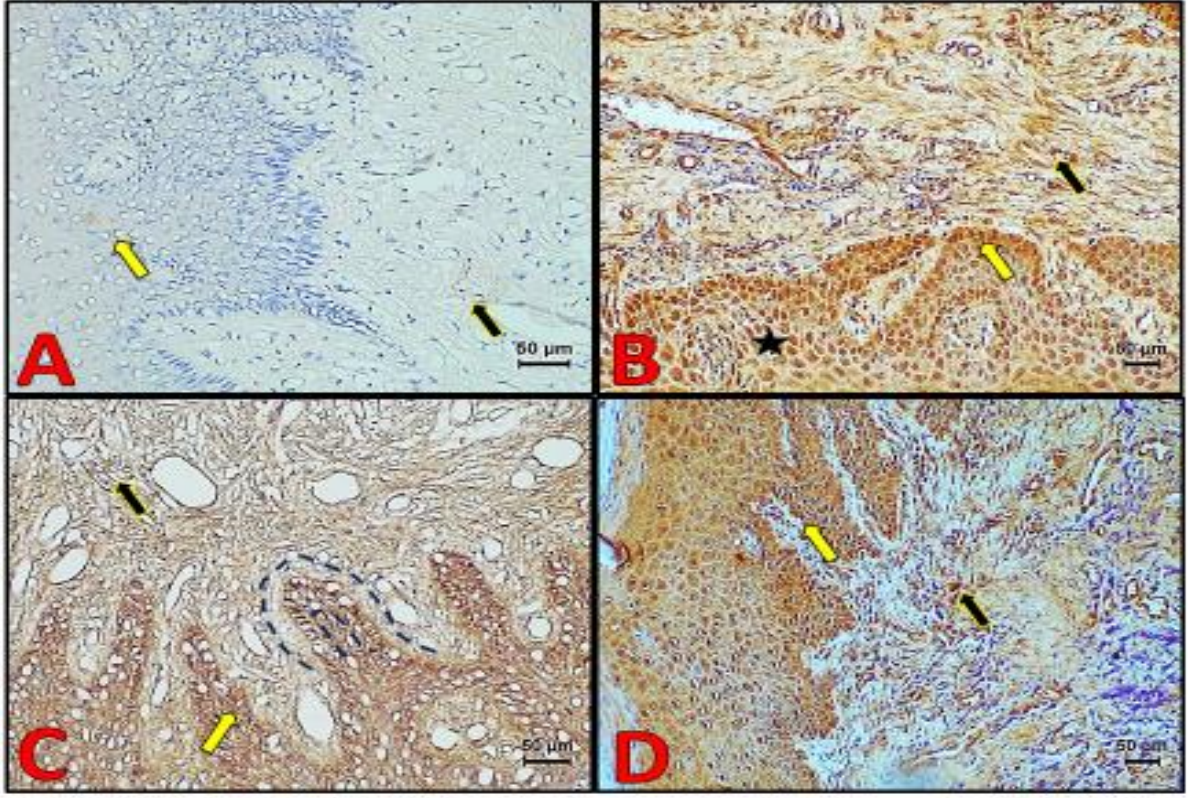
Şekil 4.2: FOXP3'ün İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi: **A (Sağlıklı Grup):** Epitel ve bağ dokuda hafif şiddetli bir ekspresyon görülmektedir. **B (Sağlıklı+Sigara Kullanan Grup):** Epitel ve bağ dokuda orta şiddetli bir ekspresyon görülmüştür. **C (Periodontitisli Grup):** Epitelde sağlıklı gruplara göre artan ve şiddetli bir ekspresyon görülmektedir, bağ dokuda ise infiltrasyonun arttığı ve bu bölgelerde şiddetli bir FOXP3 ekspresyonunun olduğu görülmektedir. **D (Periodontitis+Sigara Kullanan Grup):** Bu grupta da yine hem epitelde hem de bağ dokuda orta şiddetli bir FOXP3 ekspresyonu görülmektedir. **Sarı Ok:** Epitel **Siyah Ok:** Bağ Doku **Bar:** 50 µm



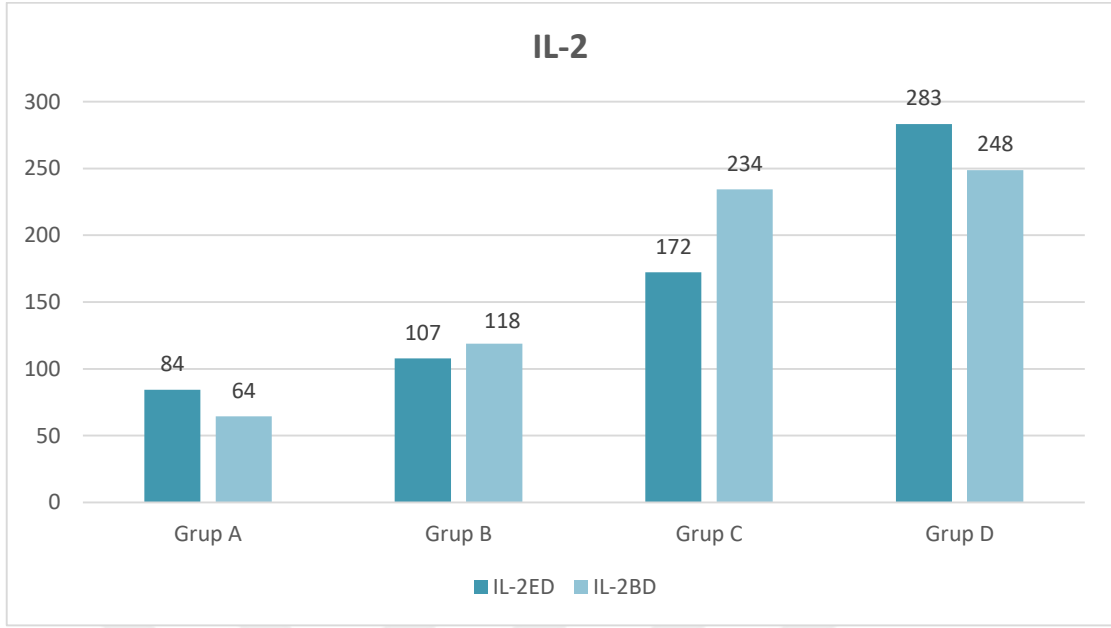
Şekil 4.3: CD69 H Skor Değerleri Grafiği

Membranöz ve sitoplazmik bir ekspresyon gösteren CD69, sağlıklı bireylerde hem epitelde hem de bağ dokusunda düşük şiddette bir boyanma sergilemiştir.

Grup B’de, hem epitelde hem de bağ dokuda Grup A’ya göre istatistiksel olarak ileri derece anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p < 0,001$). Epitel dokuda Grup B ve Grup D’nin istatistiksel verileri arasında anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$). Yine epitel dokuda Grup C, Grup B ve Grup D’ye göre daha düşük ($p < 0,001$), Grup A’ya göre ise daha yüksek ($p < 0,001$) ekspresyon göstermiştir. Bağ doku verilerinde Grup B, Grup C ve Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$). Her üç grup da Grup A’ya göre daha yüksek değerler sergilemektedir ($p < 0,001$).

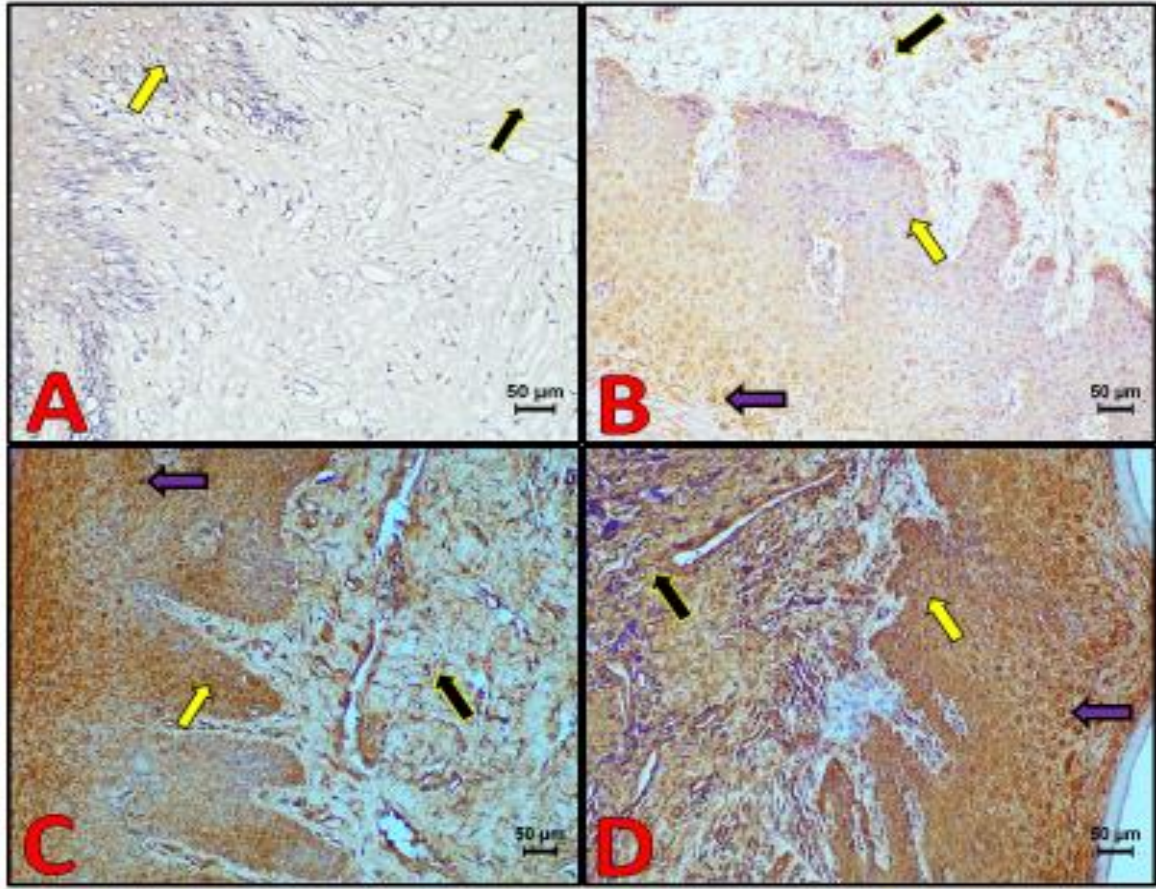


Şekil 4.4: CD 69'un İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi: **A (Sağlıklı Grup):** Epitel ve bağ dokuda hafif şiddetli bir ekspresyon görülmektedir. **B (Sağlıklı+Sigara Kullanan Grup):** Epitel ve bağ dokuda şiddetli bir ekspresyon görülmüştür. Epitelde kalınlaşma ve kalınlaşmanın olduğu yerlerde spinöz hücrelerin de boy olarak arttığı görülmektedir (**yıldız**). **C (Periodontitisli Grup):** Periodontitisli gruplarda epitel ve bağ doku arasındaki geçiş bölgesinde, özellikle epitelin stratum bazale tabakasında şiddetli CD69 ekspresyonu görülmektedir (**kesikli çizgi**). **D (Periodontitis+Sigara Kullanan Grup):** Bu grupta da yine hem epitelde hem de bağ dokusunda şiddetli bir CD69 ekspresyonu görülmektedir. **Sarı Ok:** Epitel **Siyah Ok:** Bağ Doku **Bar:** 50 µm

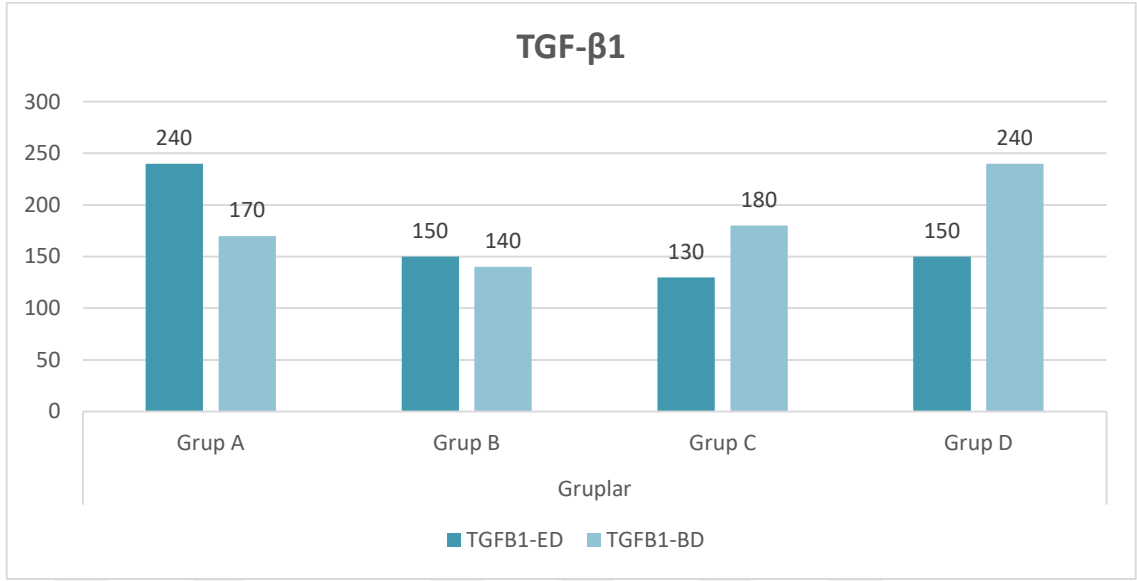


Şekil 4.5: IL-2 H Skor Değerleri Grafiği

IL-2 sağlıklı bireylerde epitelde ve bağ dokuda düşük şiddetli bir ekspresyon sergilemiştir. Epitel doku verilerinde Grup A ve Grup B arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$). Epitel dokuda C grubu, Grup A ve Grup B'ye göre ileri derecede anlamlı daha yüksek; Grup D'ye göre ileri derecede anlamlı daha düşük ekspresyon gösterirken ($p < 0,001$); Grup D diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı daha yüksek ekspresyon göstermektedir ($p < 0,001$). IL-2 bağ doku değerleri değerlendirildiğinde ise Grup C ve Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$); ancak her iki grup da hem Grup B hem de Grup A'dan istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık gösterecek şekilde daha yüksek ekspresyon göstermiştir ($p < 0,001$). Grup B de Grup A'ya göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık gösterecek şekilde daha yüksek ekspresyon göstermiştir ($p < 0,001$).



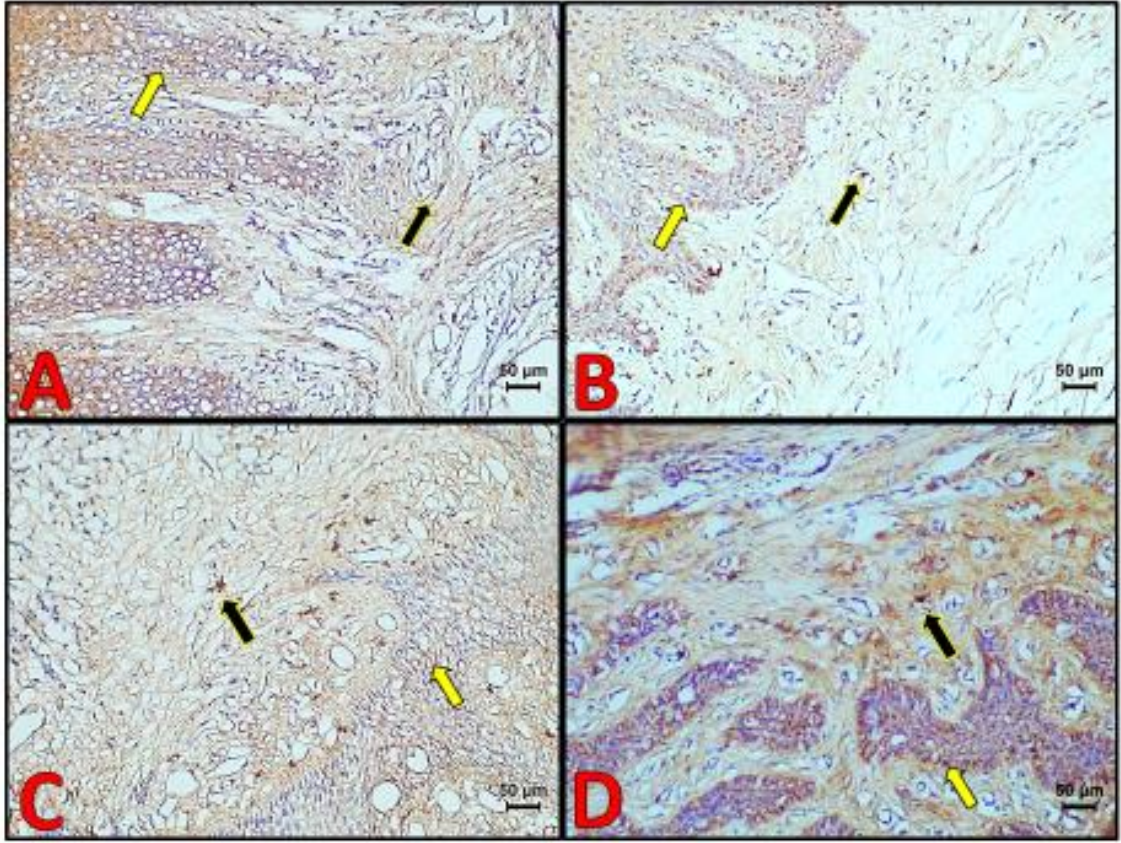
Şekil 4.6: IL-2'in İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi: **A (Sağlıklı Grup):** Epitel ve bağ dokuda hafif şiddetli bir ekspresyon görülmektedir **B (Sağlıklı+Sigara Kullanan Grup):** Epitel ve bağ dokuda orta şiddetli bir ekspresyon görülmüştür. Sigara içen bireylerde epitelde yer alan spinoz hücrelerin hem sayısının hem de hücre hacminin arttığı ve bu hücrelerde IL-2 ekspresyonunun diğer epitelyal hücrelere göre daha baskın olduğu görülmüştür (**mor ok**). **C (Periodontitisli Grup):** Epitelde sağlıklı gruplara göre artan ve şiddetli bir ekspresyon görülmektedir, bağ dokuda ise infiltrasyonun arttığı ve bu bölgelerde şiddetli bir IL-2 ekspresyonunun olduğu görülmektedir. **D (Periodontitis+Sigara Kullanan Grup):** Bu grupta da yine hem epitelde hem de bağ dokuda orta şiddetli bir IL-2 ekspresyonu görülmektedir. **Sarı Ok:** Epitel **Siyah Ok:** Bağ Doku **Mor ok:** Epitelyal Spinöz Hücreler **Bar:** 50 μ m



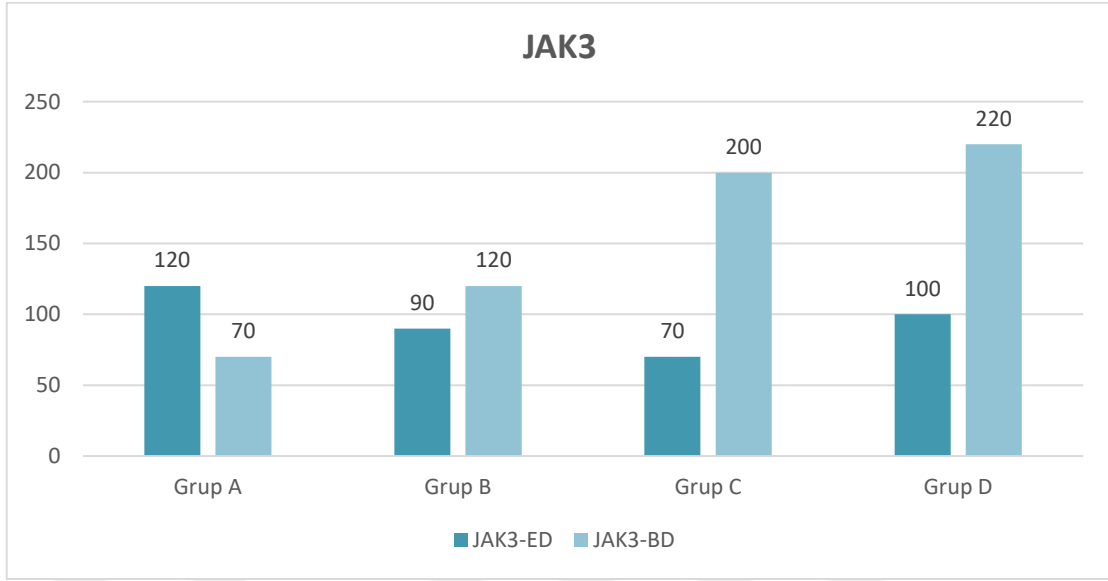
Şekil 4.7: TGF-β1 H Skor Değerleri Grafiği

Epitel dokuda TGF-β1 ekspresyonları karşılaştırıldığında; Grup B, Grup C ve Grup D arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$). En yüksek değerler Grup A'da görülmekte olup, bu değerler diğer her üç grubun değerlerinden de istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p = 0,002$).

Bağ dokuda ise; Grup A, Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$). Ancak Grup D ile diğer gruplar arasında, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0,001$). En yüksek ekspresyon seviyeleri Grup D'de izlenmektedir.



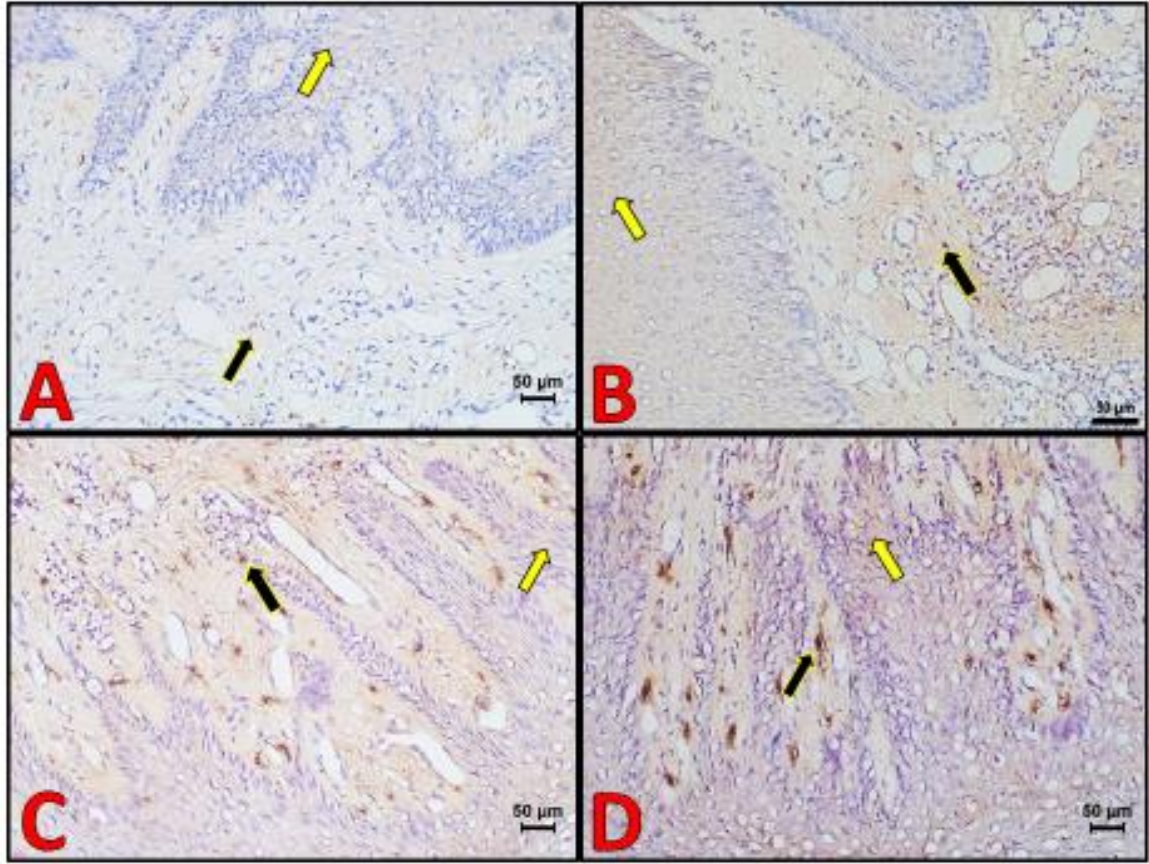
Şekil 4.8: TGF- β 1'in İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi: **A (Sağlıklı Grup):** Sitoplazmik bir ekspresyon sergileyen TGF- β 1 epitel dokuda şiddetli, bağ dokuda ise orta şiddetli bir ekspresyon göstermiştir. **B (Sağlıklı+Sigara Kullanan Grup):** Sigara kullanan sağlıklı grupta ise epitel ve bağ dokuda sağlıklı gruba göre azalan genel olarak orta şiddetli bir ekspresyon görülmüştür. **C (Periodontitisli Grup):** Epitelde sağlıklı gruplara göre azalan orta şiddetli ve bağ dokuda ise yine orta şiddetli bir TGF- β 1 ekspresyonu görülmektedir. **D (Periodontitis+Sigara Kullanan Grup):** Bu grupta da periodontitisli gruba göre hem epitelde hem de bağ dokuda artmış bir TGF- β 1 ekspresyonu görülmektedir. **Sarı Ok:** Epitel **Siyah Ok:** Bağ Doku **Bar:** 50 μ m



Şekil 4.9: JAK3 H Skor Değerleri Grafiği

Epitel dokudaki JAK3 ekspresyonunda; Grup A ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p= 0,029$). Grup A'da Grup C'ye göre daha yüksek değerler izlenmektedir. Grup B ve Grup D'nin epiteldeki değerleri ise hem birbirleri ile hem de Grup A ve Grup C ile benzerlik göstermektedir.

Bağ dokuda ise Grup A, Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p< 0,001$). Ancak Grup D ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen ($p> 0,05$); Grup D'nin verileri hem Grup B hem de Grup A ile ileri derecede anlamlı farklılık göstermektedir ($p< 0,001$). En yüksek değerler Grup C ve Grup D'de; en düşük değerler Grup A'da gözlenmektedir.



Şekil 4.10: JAK3'ün İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi: **A (Sağlıklı Grup):** Sitoplazmik bir ekspresyon sergileyen JAK3 bağ dokuda epitel dokudan daha az olmak üzere genel olarak hafif şiddetli bir ekspresyon göstermiştir. **B (Sağlıklı+Sigara Kullanan Grup):** Sigara kullanan sağlıklı gruplarda ise epitel dokuda sağlıklı gruba göre azalan ve bağ dokuda ise artan olmak üzere genel olarak orta şiddetli bir ekspresyon görülmüştür. **C (Periodontitisli Grup):** Epitelde sağlıklı gruplara göre azalan ve bağ dokuda ise şiddetli bir şekilde artmış bir JAK3 ekspresyonu görülmektedir, bağ dokuda infiltrasyonun arttığı ve bu bölgelerde şiddetli bir JAK3 ekspresyonu dikkati çekmektedir. **D (Periodontitis+Sigara Kullanan Grup):** Bu grupta da periodontitisli gruba göre hem epitelde hem de bağ dokuda artmış bir JAK3 ekspresyonu görülmektedir. **Sarı Ok:** Epitel **Siyah Ok:** Bağ Doku **Bar:** 50 µm

Tablo 4.5: Biyobelirteçlerin Epitel Doku Değerleri Arasındaki Korelasyon

Analizi Tablosu

	FOXP3 ED		CD69 ED		IL-2 ED		TGFB1 ED	
	r	p	r	p	r	p	r	p
CD69 ED	0,374	0,025*						
IL-2 ED	0,015	0,931*	0,468	0,004**				
TGFB1 ED	-0,244	0,151*	-0,107	0,536**	-0,34	0,042		
JAK3 ED	-0,454	0,005*	-0,097	0,576**	-0,174	0,31**	0,297	0,079**

*Spearman's korelasyon analizi

** Pearson korelasyon analizi

FOXP3 ED'nin CD69 ED ile arasında pozitif yönlü, düşük seviyede istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi ($p < 0,05$); JAK3 ED ile arasında negatif yönlü, düşük seviyede istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir ($p < 0,05$). IL-2 ED'nin CD69 ED ile arasında pozitif yönlü, orta seviyede istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi ($p < 0,05$); TGF- β 1 ED ile arasında negatif yönlü, düşük seviyede istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Diğer belirteçler arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir ($p > 0,05$).

Tablo 4.6: Biyobelirteçlerin Bağ Doku Değerleri Arasındaki Korelasyon Analizi Tablosu

	FOXP3 BD		CD69 BD		IL-2 BD		TGFB1 BD	
	r	p	r	p	r	p	r	p
CD69 BD	0,732	<0,001						
IL-2 BD	0,638	<0,001	0,632	<0,001				
TGFB1 BD	0,079	0,648	0,022	0,898	0,408	0,013		
JAK3 BD	0,589	<0,001	0,603	<0,001	0,802	<0,001	0,461	0,005

Pearson korelasyon analizi

FOXP3 BD'nin JAK3 BD ile orta seviyede; CD69 BD ve IL-2 BD ile de yüksek seviyede, pozitif yönlü istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir ($p < 0,001$). CD69 BD'nin; IL-2 BD ve JAK3 BD ile arasında pozitif yönlü, yüksek seviyede istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir ($p < 0,001$). TGF- β 1 BD'nin; IL-2 BD ve JAK3 BD ile arasında pozitif yönlü,

orta seviyede istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir ($p < 0,05$). JAK3 BD ile IL-2 BD arasında pozitif yönlü, yüksek seviyede istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı korelasyon ilişkisi gözlenmiştir ($p < 0,001$).

Bu tez çalışmasında sigaranın sağlıklı ve periodontitisli bireylerdeki Treg hücreleri üzerindeki etkilerini anlayabilmek için sağlıklı, sigara kullanan sağlıklı, Evre III Derece C periodontitis ve sigara kullanan Evre III Derece C periodontitisli bireylerde FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1 ve JAK3 biyobelirteçlerinin diş eti dokusundaki yoğunluğu immunohistokimyasal analizle değerlendirilmiştir.

T lenfositler kazanılmış bağışıklığın merkezinde yer alan hücrelerdir ve B hücrelerinin spesifik antikorlar üretmesine yardımcı olmaktadır (Campbell ve ark., 2016). T lenfosit alt kümeleri arasındaki dengesizlik periodontal hastalıklar için tetikleyici bir unsur olabilmektedir (Kinane ve ark., 2017). T lenfositlerin önemli bir alt kümesini oluşturan Treg'ler bu enflamasyon sürecini hafifletmekte ancak tamamen sonlandırmamaktadır, bu durum dokularda orta derecede bir yanıt oluşturulmasına neden olarak doku yenilenmesinin ve onarımının temelini oluşturmaktadır (Garlet ve ark., 2014). Treg'lerin, başta Th1 ve Th17 lenfositler olmak üzere efektör T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin üretimini baskıladığı gösterilmiştir; fakat periodontitisin patogenezindeki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Garlet ve arkadaşları (2014) Treg'lerin enflamasyonu hafiflettiğini ve doku onarımında rol oynadığını belirtmiştir. Periodontitiste Treg'lerin bu onarımı, aktif periodontal lezyonları stâbil lezyonlara dönüştürerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Garlet ve ark., 2014). Parachuru ve arkadaşları (2018) ise kronik periodontitis lezyonlarında Treg hücrelerinin arttığını göstermiştir (Parachuru ve ark., 2018).

Literatürde Treg hücrelerinin periodontal hastalıkların patogeneğinde etkilerini inceleyen çalışmalar olmasına rağmen; bu konuda yapılan insan çalışmalarının az olması, Treg'lerin fonksiyonlarının ve alveolar kemik rezorpsiyonunu baskılama potansiyellerinin net bir şekilde anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Gonzales, 2015).

Sigara, periodontal hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde de rol oynayan önemli bir risk faktörüdür. Sigara içen bireylerde doğal ve kazanılmış bağışıklık hücre fonksiyonlarında bozuklukların meydana geldiği bildirilmektedir (Aishwaraya ve ark., 2022; Elisia ve ark., 2020). Örneğin; nötrofillerin ve makrofaj hücrelerinin fonksiyonları bozulmaktadır. Bunun yanı sıra sigara içen bireylerde bu bakteriyel antijenlere yanıt olarak DC'ler tarafından üretilen IL-1 β , IL-10, IL-12 ve TNF-a gibi sitokinlerin daha düşük seviyelerde üretildiği ve T hücrelerinin çoğalma yeteneğinin nikotine bağlı olarak azaldığı belirtilmektedir (Aishwaraya ve ark., 2022; Ko ve ark., 2015). Sigaranın, Th1/Th2 dengesini Th2'nin baskın olduğu tarafa yönlendirebileceği, bunun da periodontitisin şiddetini artırabileceği ya da tedavi edilen kişilerde hastalığın nüksetmesine neden olabileceği belirtilmektedir (de Heens ve ark., 2009). Sigaranın, enflamasyon durumunda baskılayıcı özellik gösteren Treg'ler üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Treg hücrelerinin sayısını azaltarak veya baskılayıcı özellikte olmayan Treg'lerin yoğunluğunu artırarak düzenleyici T hücrelerinin immünoşüpresif fonksiyonunu bozmaktadır (Qui ve ark., 2017). Bunlar gibi nedenlerle sigara, periodontal hastalıklarda periodontal doku yıkımını artırarak hastalığın ilerlemesinde rol oynayan bir risk faktörü olarak tanımlanmış; 2017'de güncellenen periodontal hastalıkların sınıflandırılmasında da periodontitisin derecesini modifiye eden faktörler arasında yerini almıştır (Tonetti ve ark., 2018).

Sigaranın periodontal hastalıkların gelişimini ve ilerlemesini, Treglerin fonksiyonlarını etkilediği bilinmesine rağmen, literatürde sigaranın sağlıklı ve periodontitisli bireylerdeki Treg biyobelirteçleri üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı bilgi vardır. Periodontal hastalıkların 2017 güncel sınıflandırma sistemine göre periodontitis hastalarını evre ve derece olarak sınıflandıran ve sigaranın bu hastalar üzerindeki Treg biyobelirteçlerine etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan özgünlük taşımaktadır.

Bu çalışmada Treg hücre biyobelirteçleri olarak FOXP3, CD69, IL-2, TGF- β 1 ve JAK3 kullanılmıştır. FOXP3, Treg'lerin değerlendirilmesi için kullanılan en spesifik belirteçtir (Chu ve ark., 2011). CD69, timik ve periferik CD4+CD25+FOXP3+Treg hücrelerinin yaklaşık yarısı tarafından eksprese edilen, erken aktivasyon belirteci olduğu da bildirilen bir proteindir (Cortés ve ark., 2014; González-Amaro ve ark., 2013). Ancak CD69; T hücrelerine ek olarak trombositler, B lenfositler, NK hücreleri, monositler, nötrofiller ve eozinofiller tarafından da eksprese edilmektedir (Ziegler ve ark., 1994). IL-2, TGF- β 1 ile birlikte, timusta ve periferik dokularda CD4+T hücrelerinin; FOXP3 eksprese eden Treg'lere farklılaşmasını uyarmaktadır (Gorabi ve ark., 2020). Ayrıca bu sitokinler FOXP3+Treg hücrelerinin sahip olduğu baskılayıcı özellikleri de negatif feedback mekanizmasıyla arttırmaktadır (Sakaguchi ve ark., 2020). IL-2, Treg farklılaşmasını ve FOXP3 ekspresyonunu uyarırken; aynı zamanda Th17 hücrelerini de antagonize etmektedir (Veldhoen ve ark., 2006). IL-2 sinyaline yanıt olarak çeşitli proteinler eksprese edilmektedir. Bu ekspresyona aracılık eden sinyal yollarından birisi de JAK/STAT yoludur (Arenes-Ramirez ve ark., 2015). Treg hücreleri farklılaştıktan sonra baskılayıcı fonksiyonunun güçlendirilmesi aşamasında önce IL-2 sitokininin JAK1 ve JAK3'e bağlanması gerekmektedir (Coskun ve ark., 2013).

TGF- β , Treg hücrelerinin baskılayıcı özelliklerini FOXP3 üzerinden gerçekleştirir (Zheng ve ark., 2002). TGF- β , hem periferik bağışıklıkta saf T hücrelerinin FOXP3+Treg hücrelerine farklılaşmasını uyarırken hem de Th17 hücrelerinin farklılaşmasına katılır. İmmun yanıtların düzenlenmesi ve enflamasyonun azaltılması; T hücrelerinin aktivasyonundan sonra eksprese edilen CD69'un enflamatuvar alanlarda doğrudan TGF- β sentezini uyarmasıyla gerçekleşmektedir (Sancho ve ark., 2003). TGF- β ise, hem Treg hücrelerinin hem de Th17 hücrelerinin farklılaşmasına katılır. CD69 ise, T hücresi farklılaşması sırasında TGF- β üzerinden bağışıklık yanıtlarını düzenleyerek Th17/Treg dengesinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Cortés ve ark., 2014).

Bu çalışmanın FOXP3 epitel doku verileri incelendiğinde, Grup B ve Grup C arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak hem Grup B'de hem de Grup C'de, Grup A'ya göre FOXP3 seviyeleri daha yüksektir ($p < 0,001$).

FOXP3 bağ doku verileri incelendiğinde ise; Grup C, hem Grup A'dan hem de Grup D'den daha yüksek FOXP3 seviyeleri göstermektedir ($p < 0,001$). Grup B, Grup A'ya göre daha yüksek değerler göstermesine rağmen iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Grup D, Grup A'ya göre daha yüksek değerler; Grup C'ye göre ise daha düşük değerler göstermektedir ($p < 0,001$).

Literatürde FOXP3'ün ekspresyonuyla ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar FOXP3'ün hastalık durumunda arttığını, bazı çalışmalar da azaldığını göstermiştir. Nakajima ve arkadaşları (2005) ile Cardoso ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmalarda, kronik periodontitis hastalarından alınan diş eti dokusunda CD25⁺FOXP3⁺ hücrelerinin ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (Cardoso ve ark., 2008; Nakajima ve ark., 2005). Parachuru ve arkadaşları (2018), immunofloresan ve

immunohistokimya tekniklerini kullanarak sağlıklı/gingivitis ve kronik periodontitisli dokular üzerinde FOXP3⁺ hücrelerinin ekspresyonunu değerlendirmiştir. Kronik periodontitisli dokularda FOXP3⁺ hücrelerinin daha fazla olduğu ve hastalığın ilerlemesine bağlı olarak FOXP3⁺ seviyelerinin de arttığı gösterilmiştir (Parachuru ve ark., 2018). Da Motta ve arkadaşlarının (2020) periodontitisten etkilenen dokuları immünohistokimya yöntemiyle güncel sınıflandırma sistemine göre değerlendirdiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, kontrol grubuna göre FOXP3⁺ hücrelerin periodontitiste arttığı ve Evre III-Derece B periodontitiste Evre IV-Derece C periodontitis hastalarına göre sayıca daha fazla bulunduğu gösterilmiştir (da Motta ve ark., 2020). Giro ve arkadaşları (2021), perimplantitisten etkilenen dokularda sağlıklı periimplant dokulara göre daha fazla FOXP3 eksprese edildiğini bulmuştur (Giro ve ark., 2021).

Ancak Ernst ve arkadaşları (2007) periodontal açıdan hastalıklı diş eti dokularında, RANKL⁺ lenfositler tarafından FOXP3'ün çok az miktarda eksprese edildiğini ya da hiç eksprese edilmediğini belirtmiştir (Ernst ve ark., 2007). Bu çalışmanın sonuçları, Ernst ve arkadaşlarının (2007) bulguları dışındaki diğer çalışmaların bulgularıyla uyumlu görünmektedir.

Literatürde sigaranın periodontal dokulardaki FOXP3 değerleri üzerine etkisini araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden başka alanlardaki çalışmalar da incelenmiştir. Akrom ve arkadaşları (2021) sigara dumanının Treg hücrelerinden FOXP3 ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (Akrom ve ark., 2021). Duarte ve arkadaşları (2011) ise sağlıklı, kronik periodontitisli, sigara kullanan kronik periodontitisli ve tip-2 diyabeti olan kronik periodontitisli bireylerde, FOXP3⁺ hücreleri değerlendirmiştir. FOXP3⁺ hücrelerinin sağlıklı gruba göre, tüm periodontitis gruplarında arttığı gözlemlenmiştir. Ancak kronik periodontitis ve sigara kullanan kronik periodontitis

grubu arasındaki FOXP3 seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Duarte ve ark., 2011). Qiu ve arkadaşları (2010) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada sigara dumanına maruz kalan grupta, sigarayı bırakan grupta ve kontrol grubunda FOXP3 ekspresyonunu karşılaştırmıştır. Akciğerde sigaraya maruz kalan gruplarda FOXP3 ekspresyonunun, kontrol grubuna göre azaldığı bulunmuştur (Qiu ve ark., 2010).

FOXP3 bağ doku değerlerinin, hem periodontitis içen hem de sigara içen periodontitis gruplarında sağlıklı gruba göre artması Duarte ve arkadaşlarının (2011) bulgularıyla uyumludur. Epitel dokuda da periodontitisli grup; sağlıklı gruba göre daha yüksek FOXP3 seviyesi göstermektedir. Ancak Duarte'den farklı olarak sigara içen periodontitis grubu, periodontitis grubuna göre hem epitel hem de bağ dokuda daha düşük FOXP3 seviyesi sergilemektedir. Bu bulgunun, Qui ve arkadaşlarının (2010) çalışma bulgularıyla uyumlu olduğu söylenebilir. Bu iki grup arasındaki fark bağ doku verilerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir ($p < 0,001$). Yine bağ doku verilerinde sağlıklı sigara içen grup, sağlıklı gruba göre daha yüksek FOXP3 seviyesi göstermektedir. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir ($p > 0,05$). Buna göre, sigaranın FOXP3 ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi sağlıklı gruplar arasında gözlenmemiş; ancak periodontitis gruplarında gözlenmiştir.

CD69 verileri değerlendirildiğinde, sağlıklı gruplar arasında hem epitelde hem de bağ dokuda sigara kullanan grupta daha yüksek CD69 ekspresyonu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Periodontitis gruplarında ise, epitel dokuda sigara kullanan grupta daha yüksek ekspresyon ($p < 0,001$); bağ dokuda ise, benzer ekspresyon gözlenmiştir. Sigara içen, sağlıklı ve periodontitisli grupların hem epitel hem de bağ doku verileri arasında istatistiksel fark gözlenmemektedir ($p > 0,05$). Periodontitis grubunda sağlıklı gruba göre hem epitelde hem de bağ dokuda CD69 ekspresyonu artmaktadır ($p < 0,001$).

Literatürde sağlıklı ve periodontitisli diş eti dokularında CD69 ekspresyonunu değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur. Mahanonda ve arkadaşları (2018), sağlıklı ve periodontitisli diş eti dokusunda, periodontitisli grupta sağlıklı kontrol grubuna göre epitel ve bağ dokuda daha yüksek sayıda CD69⁺T hücresi bulunduğunu göstermiştir (Mahanonda ve ark., 2018). Yine Deli ve arkadaşlarının (2020) sağlıklı ve periodontitisli diş eti örnekleri üzerinde yaptığı immunohistokimyasal çalışmada da CD69⁺T hücrelerinin periodontitisli bireyler hem epitel hem de bağ dokuda daha yüksek düzeyde eksprese edildiği bulunmuştur (Deli ve ark., 2020). Vitales-Noyola ve arkadaşları (2017) tarafından sağlıklı ve kronik periodontitisli bireylerde kan örnekleri ve diş eti örnekleri alınarak akış sitometri, immunofloresan, immunohistokimya yöntemleriyle CD69⁺Treg lenfositlerinin seviyeleri ölçülmüştür. Aktif periodontal hastalığı olan hastaların periferik kanlarında ve enflame diş eti dokularında inaktif periodontal hastalığı olanlara göre CD69⁺Treg hücrelerinin sayıca daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Vitales-Noyola ve ark., 2017). Bu çalışmanın bulguları; yukarda belirtilen üç çalışmanın bulgularıyla uyumluluk göstermektedir.

Sigara kullanan bireylerin periodontal dokularında ise CD69 ekspresyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tsuyusaki ve arkadaşları (2011), sigara dumanının neden olduğu akut pulmoner enflamasyonda CD69'un rolünü araştırmak için CD69 eksikliği olan fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada ise CD69'un sigara dumanı kaynaklı akut pulmoner enflamasyonun uyarılmasında, rol oynadığını göstermiştir. Alveoler makrofajlarda sigaraya maruz kalınca CD69 ekspresyonunun uyarıldığı belirtilmiştir. Horvatova ve arkadaşları (2009) sigara kullanan ve kullanmayan bireyler arasında CD69 ekspresyonunda anlamlı bir farklılık bulmamıştır (Horvatova ve ark., 2009).

Bu çalışmada sigaranın sağlıklı bireylerin hem epitel hem bağ dokularındaki ve periodontitisli bireylerin epitel dokularındaki CD69 ekspresyonunu uyarması Tsuyusaki ve arkadaşlarının (2011) bulgularıyla uyumludur. Sigaranın periodontitisli bireylerde bağ dokuda anlamlı bir farklılığa neden olmaması da, Horvatova ve arkadaşlarının (2009) çalışma bulgularını desteklemektedir.

IL-2 verileri incelendiğinde, epitel doku verilerinde Grup A ve Grup B arasında farklılık yoktur ($p > 0,05$). Epitel dokuda C grubu, Grup A ve Grup B'ye göre daha yüksek; Grup D'ye göre daha düşük ekspresyon gösterirken ($p < 0,001$); Grup D diğer tüm gruplardan daha yüksek ekspresyon göstermektedir ($p < 0,001$). IL-2 bağ doku değerleri değerlendirildiğinde ise Grup C ve Grup D arasında anlamlı farklılık yoktur ($p > 0,05$); ancak her iki grup da hem Grup B'den hem de Grup A'dan daha yüksek ekspresyon göstermiştir ($p < 0,001$). Grup B de Grup A'ya göre daha yüksek ekspresyon göstermiştir ($p < 0,001$).

Bu çalışmanın IL-2 verileri değerlendirildiğinde, periodontitis gruplarında sağlıklı gruplara göre daha yüksek IL-2 seviyeleri bulunmuştur ($p < 0,001$). Hem sağlıklı gruplarda hem de hastalıklı gruplarda, sigara içen gruplar daha yüksek IL-2 ekspresyonu göstermiştir. Ancak bu farklar, sağlıklı gruplarda bağ dokuda; hastalıklı gruplarda ise epitel dokuda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,001$).

Literatür incelendiğinde, periodontitisli bireylerde IL-2 ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğunu bildirerek, bu çalışmanın bulgularını destekleyen çalışmalar vardır (Górska ve ark., 2003; Miranda ve ark., 2020; Okui ve ark., 2012). Okui ve arkadaşları (2012) IL-2'nin periodontitisli dokularda sağlıklı bölgelere göre daha yoğun olduğunu göstermiştir (Okui ve ark., 2012). Benzer şekilde Miranda ve arkadaşları

(2020) da periodontitisli bireylerin sağlıklı ve hastalıklı bölgelerindeki DOS IL-2 seviyelerinin hastalıklı bölgelerde arttığını göstermiştir (Miranda ve ark., 2020). Yine Górska ve arkadaşları (2003) da periodontitisli hastalarda serum IL-2 seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bulmuştur (Górska ve ark., 2003). Ancak Andrukhov ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında ise periodontitisli hastaların serumdaki IL-2 seviyelerinin, sağlıklı bireylere göre azaldığı gösterilmiştir (Andrukhov ve ark., 2011).

Literatürde, sigara ve IL-2 ile ilgili çelişkili veriler bulunmaktadır. Ouyang ve arkadaşları (2000), sigaranın IL-1 β , IL-2, IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimini baskıladığını göstermiştir (Ouyang ve ark., 2000). Yine Hagiwara ve arkadaşları (2001) da, sigara kullananlarda IL-2 ekspresyonunun sigara kullanmayanlara göre azaldığını belirtmiştir (Hagiwara ve ark., 2001). Ancak Piaggieschi ve arkadaşları (2021) tarafından IL-2'nin sigarayla ilişkili enflamatuvar durumlarda dolaşımdaki seviyesinin arttığı belirtilmektedir (Piaggieschi ve ark., 2021). Sağlıklı, sigara kullanan, tip 2 diyabet ve sigara kullanan diyabetli hastalardan oluşturulan gruplarda periodontal olarak etkilenen bölgelerdeki DOS sitokin seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışmada kontrol grubuna göre tüm gruplarda IL-2 seviyelerinin arttığı gösterilmektedir (Pasarin ve ark., 2023). Çalışmamız; Piaggieschi ve arkadaşları (2021) ile Pasarin ve arkadaşlarının (2023) çalışmalarını destekler niteliktedir. Zeidel ve arkadaşları (2002) ise sigaranın IL-2 değerlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir (Zeidel ve ark., 2002). Ancak, bizim çalışmamızda sağlıklı grubun epitel doku verilerinde Grup A ve Grup B arasında fark olmaması, hastalıklı grupların bağ doku verilerinde de her ne kadar Grup D'de Grup C'ye göre daha yüksek IL-2 seviyeleri görülmesine rağmen iki grup arasındaki

verilerin istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmemesi Zeidel ve arkadaşlarının (2002) bulgusuyla benzerlik göstermektedir.

TGF- β 1 verileri değerlendirildiğinde, epitel doku verilerinde en yüksek değerler sağlıklı grupta gözlenmiştir. Diğer grupların hepsinde daha düşük TGF- β 1 seviyeleri gözlenirken; aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Bağ doku verilerinde ise en yüksek değerler sigara içen periodontitis grubunda gözlenmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Literatür araştırıldığında bu çalışmaya göre farklı sonuçlar bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Nakajima ve arkadaşlarının (2005) diş eti biyopsileri üzerinde yaptığı bir çalışma, periodontitisli bireylerde TGF- β 1 seviyelerinin gingivitisli bireylere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Nakajima ve ark., 2005). Yine Mize ve arkadaşları da (2015) kronik periodontitis hastalarında TGF- β 1 ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğunu göstermiştir (Mize ve ark., 2015). Steinsvoll ve arkadaşları (1999) da, sağlıklı ve kronik periodontitisli bireylerdeki TGF- β 1⁺ hücrelerin dağılımını incelemiş ve kronik periodontitisli bireylerde sağlıklı dokulardan 100 kat daha fazla TGF- β 1⁺ hücresi tespit etmiştir. TGF- β 1⁺ hücre yoğunlunun ise, hem epitelde hem de bağ dokusunda arttığını bulmuştur (Steinsvoll ve ark., 1999). TGF- β 1'in kronik periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireylerin diş eti dokusundaki yoğunluğunun immunohistokimyasal yöntemle karşılaştırıldığı Al-Rubaie'nin (2013) çalışmasında klinik periodontal parametrelerle TGF- β 1'in pozitif bir korelasyon gösterdiği ve TGF- β 1 ekspresyonunun periodontitisle birlikte arttığı bulunmuştur (Al-Rubaie, 2013). Ancak Sancho ve arkadaşları (2003) tarafından CD69 eksikliği olan fareler üzerinde deneysel artrit modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada, TGF- β 1 seviyelerinin enflamatuvar alanlarda azaldığı gözlenmiştir (Sancho ve ark., 2003).

Bu çalışma, periodontal hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalardan farklı olarak TGF- β 1 ekspresyonunun periodontitisle birlikte özellikle epitelde anlamlı şekilde azaldığını; bağ dokuda ise fark olmadığını göstermiştir. Sadece Sancho ve arkadaşları (2003) da bizim epitel dokudaki bulgumuza benzer, enflamasyonla birlikte TGF- β 1 seviyelerinin azaldığını göstermiştir. Bu çalışmada Evre III Derece C periodontitis hastalarının seçilmiş olması; diğer çalışmaların ise kronik periodontitisli bireylerde yapılmış olması sonuçlarımızın farklılık göstermesinin bir nedeni olabilir.

Literatürde sigara içen ve içmeyen kronik periodontitis hastalarının DOS örneklerinde periodontal tedavi öncesi ve sonrası TGF- β 1 konsantrasyonlarını değerlendirilmiştir. Tedavi öncesinde sigara içenlerde TGF- β 1 konsantrasyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Başlangıç tedavisinden sonra ise sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre DOS'taki TGF- β 1 seviyelerinde artış görülmüş ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Çalışmanın periodontal olarak sağlıklı dokularda sigaranın DOS'taki TGF- β 1 seviyelerini etkilemediği sonucuna varmıştır (Stein ve ark., 2004). Stein ve arkadaşlarının (2004) çalışmaları, bu çalışmadaki TGF- β 1'in sağlıklı grupların bağ dokusundaki bulguları ile uyumluluk göstermektedir. Yin ve arkadaşlarının (2003) deri fibroblast kültürlerini ELISA yöntemi ile test ettiği bir çalışmada; sigara dumanı ekstraktının, TGF- β 1 sayısını arttırdığı ancak TGF- β 1'in aktif formunu değil işlevsel olmayan latent formunu uyardığı belirtilmiştir (Yin ve ark., 2003). Bu çalışmanın bağ doku verilerinde sigara içen periodontitis grubunda, periodontitis grubuna göre artış göstermesi Yin ve arkadaşlarının (2003) çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Artan TGF- β 1'in aktif ya da latent formda olup olmadığı ile ilgili bu çalışma herhangi bir bilgi sunmamaktadır.

JAK3 verileri değerlendirildiğinde; epitel dokudaki JAK3 ekspresyonunda; Grup A ve Grup C arasında farklılık vardır ($p = 0,029$). Grup A'da Grup C'ye göre daha yüksek değerler izlenmektedir. Grup B ve Grup D'nin epiteldeki değerleri ise hem birbirleri ile hem de Grup A ve Grup C ile benzerlik göstermektedir.

Bağ dokuda ise Grup A, Grup B ve Grup C arasında farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$). Ancak Grup D ve Grup C arasında farklılık bulunmamasına rağmen ($p > 0,05$); Grup D'nin verileri, hem Grup B hem de Grup A ile farklılık göstermektedir ($p < 0,001$). En yüksek değerler Grup C ve Grup D'de; en düşük değerler Grup A'da gözlenmektedir.

Bu çalışmanın JAK3 bulguları değerlendirildiğinde, epitel dokuda en yüksek JAK3 değerleri sağlıklı grupta; bağ dokuda en yüksek JAK3 değerleri sigara içen periodontitis grubundadır. Epitel doku için sağlıklı gruplar ve hastalıklı gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında, sağlıklı sigara içen grupta değerlerde azalma; hastalıklı sigara içen grupta değerlerde artma görülmüştür. Ancak bu artış ve azalışlar gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa neden olmamıştır. Sadece periodontitis grubu sağlıklı gruba göre daha düşük değerler göstermekte olup iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$).

JAK3 bağ doku verilerinde ise, Grup C ile Grup D arasında fark olmayıp her iki grupta sağlıklı gruplara göre daha yüksek değerler göstermektedir ($p < 0,001$). Sağlıklı gruplarda ise sigara içen grupta, sigara içmeyen gruba göre bağ dokuda anlamlı artış görülmektedir.

Literatüre bakıldığında bu çalışmada olduğu gibi JAK3'ün periodontal sağlık ve hastalık durumlarındaki seviyelerini değerlendiren çalışmaya rastlanılmamıştır. Godoi ve arkadaşlarının (2023) sıçanlarda oluşturulan periodontitis modelinde JAK

inhibisyonunun alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisinin değerlendirdiği bir çalışmada, JAK inhibitörünün kemik kaybı üzerinde koruyucu bir rolünün olduğu gösterilmiştir (Godoi ve ark., 2023). Ancuta ve arkadaşları da (2020) periodontitisli hastaların başlangıçta ve JAK1-3 inhibitörü ile tedavisinden 24 hafta sonra periodontal durumlarını karşılaştırdığı bir klinik çalışma, tedavi sonrasında periodontal enflamasyonda azalma olduğunu göstermiştir (Ancuța ve ark., 2020). Ancak bu çalışmaların aksine Lü ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında ise periodontal hastalığı olan farelerdeki JAK3 inhibisyonu, enflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve kemik rezorpsiyonunu arttırmıştır (Lü ve ark., 2020).

Mishra ve arkadaşları (2013) JAK3 inhibisyonun, proenflamatuvar sitokin seviyelerini arttırdığı ve enflamatuvar hastalıkların ilerlemesini hızlandığını göstermiştir (Mishra ve ark., 2013). Yine Yoshida ve arkadaşları (2012) da JAK3 inhibisyonunun Th17 hücrelerinin aktivitesini arttırdığı ve enflamasyonu şiddetlendirdiğini göstermiştir (Yoshida ve ark., 2012). Ociepa ve arkadaşları (2022) oral mukoza tutulumu olan pemfigus vulgaris, büllöz pemfigoid gibi hastalıklarda JAK3 ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Ociepa ve ark., 2022).

Sigaranın periodontal dokulardaki JAK3 seviyelerine etkisini değerlendiren çalışmaya da rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada ise, JAK3 epitel ve bağ dokuda birbirinden farklı şekilde ekspresyon göstermiştir. Periodontitiste JAK3 ekspresyonu sağlıklı bireylere göre bağ dokuda artmış, epitelde ise azalmıştır. JAK3'ün hastalıkta bağ dokuda artış göstermesi, *P. gingivalis* varlığında JAK3'ün antienflamatuvar olarak görev yaptığını ve periodontal hastalığın şiddetini azalttığını belirten Lü ve arkadaşlarının (2020) çalışma bulgularıyla

uyumludur. Yine Mishra ve arkadaşları (2013) ile Yoshida ve arkadaşları (2012) JAK3'ün antienflamatuvar özellik gösterdiğini belirtmektedir.

Sigaranın JAK3/STAT3/NF-kB sinyalleriyle ilgili proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı ifade edilmektedir (Huan ve ark., 2017). Yoo ve arkadaşlarının (2011) JAK3 gen polimorfizmleri ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştırdığı bir çalışmanın sonuçları, JAK3 seviyeleri ve akciğer kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir (Yoo ve ark., 2011). Bu çalışmada sigara, sağlıklı bireylerde bağ dokuda JAK3 ekspresyonunu uyarmış, epitelde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Buradaki bağ doku bulgusu Huan ve arkadaşlarının (2017) bulgularıyla uyumludur.

Bu çalışmanın biyobelirteçlerinin immunohistokimyasal bulguları dışında diğer bulguları değerlendirildiğinde yaş verilerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermesi önem arz edebilir. Bu fark sadece Grup B ($34 \pm 9,04$) ve Grup D ($48 \pm 6,34$) arasında tespit edilmiştir. Yaş faktörü biyobelirteç seviyeleri üzerinde bir belirleyici olabilir (Castañeda-Delgado ve ark., 2017). Bu nedenle bu çalışmada yaş ile biyobelirteç değerleri arasında korelasyon ilişkisi de araştırılmıştır. Yaş ile sadece IL-2 arasında orta seviyede, pozitif yönlü korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde yaşlı bireylerde T lenfositler tarafından daha düşük seviyede IL-2 üretimi olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Song ve ark., 1993; Whisler ve ark., 1996). Ancak bu çalışmalarda yaşlı bireyler üzerinde bir araştırma yapılmış ve yaşlanmanın T hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Örneğin, Whisler ve arkadaşlarının (1996) çalışmasında yaşlı bireylerdeki yaş ortalaması 78 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise Grup B ve Grup D arasında anlamlı yaş farkı olsa da her iki grup da orta yaşlı bireylerden oluşmaktadır. Aynı zamanda bu çalışmada Grup

D'nin yaş ortalaması daha yüksek olmasına rağmen; Grup D Grup B'ye göre daha yüksek IL-2 ED ve BD değerleri göstermiştir.

Bu çalışmada biyobelirteçlerin epitel doku ve bağ doku verileri arasındaki korelasyon ilişkileri de araştırılmıştır. Bağ doku verileri incelendiğinde, TGF- β 1 BD'nin FOXP3 BD ve CD69 BD ile aralarında anlamlı korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir. Ancak diğer tüm biyobelirteç değerleri arasında orta seviyede ve yüksek seviyede korelasyon ilişkisi tespit edilmiştir. Bu bulgu da araştırılan biyobelirteçlerin literatürde belirtildiği gibi FOXP3 ekspresyonunu tetikleyen ortak sinyal yolları üzerinde yer aldığını desteklemektedir (Martín & Sánchez, 2011).

5. LİMİTASYONLAR

Bu çalışmanın bazı limitasyonları mevcuttur. Bu nedenle bu çalışmanın bulguları bu limitasyonlar dikkate alınarak değerlendirilmelidir.

1. Bu çalışma kesitsel nitelikte ve tek merkezde yürütülmüş bir çalışmadır.
2. Çalışma gruplarında periodontitis hasta grubu olarak sadece Evre III Derece C periodontitis hastaları çalışmaya dâhil edilmiştir.
3. Bu çalışmada sadece immunohistokimya analizi kullanılmıştır. Bu yöntemin eksiklikleri arasında tüm antijenlerin eşit derecede korunup tespit edilebilirliğinin mümkün olmaması, polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tanısına göre daha az duyarlı ve spesifik olması, laboratuvarlar arasında belli standardize yöntemlerin olmaması sayılabilir. Ancak bu yöntem immunofloresan tekniklere göre karşıt boyama ile spesifik antijen etrafında dokunun görünür morfolojiye sahip olması, boyanmış belirteçlerin sonuçlarının niceliksel olarak rapor edilebilmesi, hastalıkların teşhis prognoz ve tespitinde güvenilir bir yöntem olması nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir (Schacht & Kern, 2015).
4. Histolojik bulguların her zaman klinik tanıya uymayabileceği ve ayrıca incelenen doku örneklerinin hastalığın ilerlemesinin farklı aşamalarında elde edilmiş olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.
5. Bireyler sigara içme durumlarını kendileri bildirmiştir. Objektif bir inceleme için sigara içme durumunun bir göstergesi olarak idrar veya serumda nikotin düzeyinin değerlendirilmesi daha yararlı olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Evre III Derece C periodontitis hastalarının diş eti dokusunda sağlıklı bireylere göre daha fazla FOXP3 eksprese edilmektedir. Sigara, Evre III Derece C periodontitis hastalarının diş eti bağ dokusunda FOXP3 ekspresyonunu baskılamaktadır.
2. Evre III Derece C periodontitis hastalarında, sağlıklı bireylere göre diş eti dokusunda CD69 ekspresyonu artmaktadır. Sigara, sağlıklı periodontal dokularda CD69 ekspresyonunu uyarmaktadır. Evre III Derece C periodontitis hastalarının ise epitel dokularındaki CD69 ekspresyonunu uyarmaktadır.
3. Evre III Derece C periodontitis hastalarında, sağlıklı bireylere göre diş eti dokusunda IL-2 ekspresyonu artmaktadır. Sigara, sağlıklı periodontal dokularda bağ dokuda IL-2 ekspresyonunu uyarmaktadır. Evre III Derece C periodontitis hastalarının ise epitel dokularındaki IL-2 ekspresyonunu uyarmaktadır.
4. Evre III Derece C periodontitis hastalarında, sağlıklı bireylere göre epitel dokuda TGF- β 1 ekspresyonu azalmaktadır; bağ dokudaki TGF- β 1 ekspresyonu etkilenmemektedir. Sigara sağlıklı bireylerin epitel dokusundaki TGF- β 1 ekspresyonunu azaltmakta; Evre III Derece C periodontitis hastalarının bağ dokusundaki TGF- β 1 ekspresyonunu uyarmaktadır.
5. Evre III Derece C periodontitis hastalarında, sağlıklı bireylere göre JAK3 ekspresyonu diş eti epitel dokusunda azalmakta, bağ dokusunda artmaktadır. Sigara sağlıklı bireylerin epitel dokusunda JAK3 değerlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Ancak sağlıklı diş eti bağ dokusunda artışa neden olmaktadır.

Sonuç olarak; periodontitiste FOXP3, CD69, IL-2 ekspresyonu artmakta; TGF- β 1 ve JAK3 değerleri ise epitelde azalmakta, bağ dokuda artmaktadır. Sigara CD69 ve IL-2 ekspresyonunu uyarmakta; FOXP3 ve JAK3 ekspresyonunu sağlıklı bireylerde uyarmakta, FOXP3'ü periodontitisli bireylerde baskılamaktadır. Sigara TGF- β 1 ekspresyonunu ise sağlıklı bireylerde epitel üzerinden baskılamakta, hastalıklı bireylerde bağ doku üzerinden uyarmaktadır.



7. KAYNAKÇA

- Aguero, A., Garnick, J. J., Keagle, J., Steflik, D. E., & Thompson, W. O. (1995). Histological location of a standardized periodontal probe in man. *Journal of periodontology*, 66(3), 184-190.
- Ainamo, J., & Bay, I. (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International dental journal*, 25(4), 229-235.
- Ainamo, J., & Löe, H. (1966). Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. *The Journal of Periodontology*, 37(1), 5-13.
- Ainamo, J., & Talari, A. (1976). The increase with age of the width of attached gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 11(4), 182-188.
- Aishwaraya, V., Subramanian, S., Prakash, P., Appukuttan, D., Crena, J., & Venkadassalopathy, S. (2022). Role of immuno-inflammatory cells modified by smoking in periodontitis. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 615-620.
- Akalin, F. A., Toklu, E., & Renda, N. (2005). Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *Journal of clinical periodontology*, 32(3), 238-243.
- Akrom, A., Purnamasari, T. J., Nurfaiz, Z., Adnan, A., Darmawan, E., & Muhlis, M. (2021). Nicotine level associated with decreasing Treg number in smoker healthy volunteers. *Int. J. Public Heal. Sci*, 10(1), 88.
- Al-Rubaie, (2013). M. S. Assessment of transforming growth factor beta one (TGF- β 1) immunohistochemical (IHC) expression profile in the gingival tissue of patients with different forms of periodontal diseases.
- Alvarez, C., Monasterio, G., Cavalla, F., Córdova, L. A., Hernández, M., Heymann, D., Garlet, G. P., Sorsa, T., Pärnänen, P., & Lee, H.-M. (2019). Osteoimmunology of oral and maxillofacial diseases: translational applications based on biological mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 10, 1664.
- Alvarez, C., Rojas, C., Rojas, L., Cafferata, E. A., Monasterio, G., & Vernal, R. (2018). Regulatory T lymphocytes in periodontitis: a translational view. *Mediators of Inflammation*, 2018.
- Alvarez, C., Suliman, S., Almarhoumi, R., Vega, M. E., Rojas, C., Monasterio, G., Galindo, M., Vernal, R., & Kantarci, A. (2020). Regulatory T cell phenotype and anti-osteoclastogenic function in experimental periodontitis. *Scientific reports*, 10(1), 19018.
- Ancuța, C., Pomirleanu, C., Mihailov, C., Chiriac, R., Ancuța, E., Iordache, C., Bran, C., & Țănculescu, O. (2020). Efficacy of baricitinib on periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint bone spine*, 87(3), 235-239.
- Andrukhov, O., Ulm, C., Reischl, H., Nguyen, P. Q., Matejka, M., & Rausch-Fan, X. (2011). Serum cytokine levels in periodontitis patients in relation to the bacterial load. *Journal of periodontology*, 82(6), 885-892.
- Aras, Ş. Y., & Sarı, E. K. (2017). İmmun Sistem Hücrelerinde CD Molekülleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 206-214.
- Arenas-Ramirez, N., Woytschak, J., & Boyman, O. (2015). Interleukin-2: biology, design and application. *Trends in immunology*, 36(12), 763-777.

- Attias, M., Al-Aubodah, T., & Piccirillo, C. (2019). Mechanisms of human FoxP3⁺ Treg cell development and function in health and disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 197(1), 36-51.
- Axelsson, P., Paulander, J., & Lindhe, J. (1998). Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol*, 25(4), 297-305.
- Bartold, P. M., Cantley, M. D., & Haynes, D. R. (2010). Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 55-69.
- Bartold, P. M., Walsh, L. J., & Narayanan, A. S. (2000). Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*, 24(1), 28-55.
- Belibasakis, G. N., Bostanci, N., Hashim, A., Johansson, A., Aduse-Opoku, J., Curtis, M. A., & Hughes, F. J. (2007). Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microbial pathogenesis*, 43(1), 46-53.
- Berglundh, T., Liljenberg, B., & Lindhe, J. (2002). Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 29(8), 705-709.
- Bergström, J. (1989). Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community dentistry and oral epidemiology*, 17(5), 245-247.
- Bergström, J. (2004). Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92, 1-8.
- Betelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2007). TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology*, 8(4), 345-350.
- Bi, C. S., Wang, J., Qu, H. L., Li, X., Tian, B. M., Ge, S., & Chen, F. M. (2019). Calcitriol suppresses lipopolysaccharide-induced alveolar bone damage in rats by regulating T helper cell subset polarization. *Journal of Periodontal Research*, 54(6), 612-623.
- Biolcati, E., Carranza Jr, F., & Cabrini, R. (1953). Variaciones y Alterciones De La Queratinizacion En Encias Humanas Clinicamente Sana. *Rev Asoc Odontol Argent*, 41, 446.
- Bluestone, J. A., & Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, 3(3), 253-257.
- Brecx, M., Gautschi, M., Gehr, P., & Lang, N. (1987). Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 22(6), 468-472.
- Bremser, A., Brack, M., & Izcue, A. (2015). Higher sensitivity of Foxp3⁺ Treg compared to Foxp3-conventional T cells to TCR-independent signals for CD69 induction. *PLoS One*, 10(9), e0137393.
- Broere, F., & van Eden, W. (2019). T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Nijkamp and Parnham's principles of immunopharmacology*, 23-35.
- Campbell, L., Millhouse, E., Malcolm, J., & Culshaw, S. (2016). T cells, teeth and tissue destruction—what do T cells do in periodontal disease? *Molecular Oral Microbiology*, 31(6), 445-456.
- Cardoso, C. R., Garlet, G. P., Moreira, A. P., Júnior, W. M., Rossi, M. A., & Silva, J. S. (2008). Characterization of CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *Journal of Leucocyte Biology*, 84(1), 311-318.

- Castañeda-Delgado, J. E., Frausto-Lujan, I., González-Curiel, I., Montoya-Rosales, A., Serrano, C. J., Torres-Juarez, F., ... & Rivas-Santiago, B. (2017). Differences in cytokine production during aging and its relationship with antimicrobial peptides production. *Immunological Investigations*, 46(1), 48-58.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. In (Vol. 89, pp. S1-S8): Wiley Online Library.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000, 64(1), 57-80.
- Celedon, J. C., Lange, C., Raby, B. A., Litonjua, A. A., Palmer, L. J., DeMeo, D. L., Reilly, J. J., Kwiatkowski, D. J., Chapman, H. A., & Laird, N. (2004). The transforming growth factor- β 1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Human molecular genetics*, 13(15), 1649-1656.
- Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, F., & Olive, D. (1995). CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(3), 1007-1013.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S3-S23.
- Chapple, I. L., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., & Goldstein, M. (2018). 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. *Journal of periodontology*, 89, S74-S84.
- Cheng, G., Yu, A., & Malek, T. R. (2011). T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunological reviews*, 241(1), 63-76.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature immunology*, 17(11), 1322-1333.
- Chu, S., Zhong, X., Zhang, J., Lao, Q., He, Z., & Bai, J. (2011). The expression of Foxp3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients. *International immunopharmacology*, 11(11), 1780-1788.
- Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*, 79, 1569-1576.
- Cortés, J. R., Sánchez-Díaz, R., Bovolenta, E. R., Barreiro, O., Lasarte, S., Matesanz-Marín, A., Toribio, M. L., Sánchez-Madrid, F., & Martín, P. (2014). Maintenance of immune tolerance by Foxp3⁺ regulatory T cells requires CD69 expression. *Journal of Autoimmunity*, 55, 51-62.
- Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology*, 70(4), 326-336.

- Coskun, M., Salem, M., Pedersen, J., & Nielsen, O. H. (2013). Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacological research*, 76, 1-8.
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M. J., & Haynes, D. (2003). Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 38(4), 380-387.
- Çağlayan, G., Aşan, E., & Külekçi, G. (2010). Periodontoloji.
- da Motta, R. J., Almeida, L. Y., Villafuerte, K. R., Ribeiro-Silva, A., León, J. E., & Tirapelli, C. (2020). FOXP3+ and CD25+ cells are reduced in patients with stage IV, grade C periodontitis: A comparative clinical study. *Journal of Periodontal Research*, 55(3), 374-380.
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J., & Shevach, E. M. (2007). Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, 178(7), 4022-4026.
- de Heens, G. T., Van der Velden, U., & Loos, B. (2009). Cigarette smoking enhances T cell activation and a Th2 immune response; an aspect of the pathophysiology in periodontal disease. *Cytokine*, 47(3), 157-161.
- De Jong, T., Bakker, A., Everts, V., & Smit, T. (2017). The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *Journal of Periodontal Research*, 52(6), 965-974.
- de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., Del Hoyo, G. M., Cibrián-Vera, D., Bonay, P., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Navarro, P., Gutierrez-Gallego, R., & Ramirez-Huesca, M. (2014). The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Molecular and cellular biology*.
- Deli, F., Romano, F., Gualini, G., Mariani, G. M., Sala, I., Veneziano, F., Bertero, L., Cassoni, P., & Aimetti, M. (2020). Resident memory T cells: Possible players in periodontal disease recurrence. *Journal of Periodontal Research*, 55(2), 324-330.
- Deng, J., Lu, C., Zhao, Q., Chen, K., Ma, S., & Li, Z. (2022). The Th17/Treg cell balance: crosstalk among the immune system, bone and microbes in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 57(2), 246-255.
- Diker, K. (2005). İmmunoloji. İkinci baskı. *Medisan Yayın Evi, Ankara*, 125-137.
- Duarte, P. M., Santos, V. R., Dos Santos, F. A., de Lima Pereira, S. A., Rodrigues, D. B., & Napimoga, M. H. (2011). Role of smoking and type 2 diabetes in the immunobalance of advanced chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 82(3), 429-438.
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T., Brenchley, L., Abe, T., Hurabielle, C., & Martin, D. (2018). A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science translational medicine*, 10(463), eaat0797.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguillon, J. C., Puente, J., Pozo, P., & Gamonal, J. (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 80(2), 290-296.
- Elisia, I., Lam, V., Cho, B., Hay, M., Li, M. Y., Yeung, M., Bu, L., Jia, W., Norton, N., & Lam, S. (2020). The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. *Scientific reports*, 10(1), 19480.

- Ernst, C., Lee, J., Nakanishi, T., Karimbux, N., Rezende, T., Stashenko, P., Seki, M., Taubman, M., & Kawai, T. (2007). Diminished forkhead box P3/CD25 double-positive T regulatory cells are associated with the increased nuclear factor-kB ligand (RANKL+) T cells in bone resorption lesion of periodontal disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 148(2), 271-280.
- Feinerman, O., Jentsch, G., Tkach, K. E., Coward, J. W., Hathorn, M. M., Sneddon, M. W., Emonet, T., Smith, K. A., & Altan-Bonnet, G. (2010). Single-cell quantification of IL-2 response by effector and regulatory T cells reveals critical plasticity in immune response. *Molecular systems biology*, 6(1), 437.
- Feng, C., Woodside, K. J., Vance, B. A., El-Khoury, D., Canelles, M., Lee, J., Gress, R., Fowlkes, B., Shores, E. W., & Love, P. E. (2002). A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *International immunology*, 14(6), 535-544.
- Figueredo, C., Lira-Junior, R., & Love, R. (2019). T and B cells in periodontal disease: new functions in a complex scenario. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3949.
- Fiorini, T., Musskopf, M. L., Oppermann, R. V., & Susin, C. (2014). Is there a positive effect of smoking cessation on periodontal health? A systematic review. *Journal of periodontology*, 85(1), 83-91.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology*, 6(11), 1142-1151.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.-J., Garrone, P., Garcia, E., & Saeland, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*, 183(6), 2593-2603.
- Frank, D. A., Robertson, M. J., Bonni, A., Ritz, J., & Greenberg, M. E. (1995). Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7779-7783.
- Gálvez, J. (2014). Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*, 89(12), 1349-1363.
- Garlet, G. P., Martins Jr, W., Fonseca, B. A., Ferreira, B. R., & Silva, J. S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 31(8), 671-679.
- Garlet, G. P., Sfeir, C., & Little, S. (2014). Restoring host-microbe homeostasis via selective chemoattraction of Tregs. *Journal of dental research*, 93(9), 834-839.
- Gasteiger, G., & Kastenmuller, W. (2012). Foxp3+ regulatory T-cells and IL-2: the Moirai of T-cell fates? *Frontiers in Immunology*, 3, 179.
- Gavin, M. A., Rasmussen, J. P., Fontenot, J. D., Vasta, V., Manganiello, V. C., Beavo, J. A., & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445(7129), 771-775.
- Gemmell, E., Yamazaki, K., & Seymour, G. J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000*, 43(1), 14-40.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews*, 228(1), 273-287.

- Ginhoux, F., & Guillemins, M. (2016). Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439-449.
- Giro, G., Tebar, A., Franco, L., Racy, D., Bastos, M. F., & Shibli, J. A. (2021). Treg and TH17 link to immune response in individuals with peri-implantitis: a preliminary report. *Clinical Oral Investigations*, 25, 1291-1297.
- Glimcher, M. J. (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instructional course lectures*, 36, 49-69.
- Godoi, M. A., Camilli, A. C., Gonzales, K. G., Costa, V. B., Papathanasiou, E., Leite, F. R., & Guimarães-Stabili, M. R. (2023). JAK/STAT as a Potential Therapeutic Target for Osteolytic Diseases. *International journal of molecular sciences*, 24(12), 10290.
- Gonzales, J. R. (2015). T-and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontology 2000*, 69(1), 181-200.
- González-Amaro, R., Cortés, J. R., Sánchez-Madrid, F., & Martín, P. (2013). Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends in molecular medicine*, 19(10), 625-632.
- González-Amaro, R., & Marazuela, M. (2016). T regulatory (Treg) and T helper 17 (Th17) lymphocytes in thyroid autoimmunity. *Endocrine*, 52, 30-38.
- González-Santiago, A. E., Mendoza-Topete, L. A., Sánchez-Llamas, F., Troyo-Sanromán, R., & Gurrola-Díaz, C. M. (2011). TGF- β 1 serum concentration as a complementary diagnostic biomarker of lung cancer: establishment of a cut-point value. *Journal of clinical laboratory analysis*, 25(4), 238-243.
- Gorabi, A. M., Hajighasemi, S., Kiaie, N., Hayat, S. M. G., Jamialahmadi, T., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2020). The pivotal role of CD69 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 111, 102453.
- Górska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M., & Madaliński, K. (2003). Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 30(12), 1046-1052.
- Greene, A. H. (1962). A study of the characteristics of stippling and its relation to gingival health. *The Journal of Periodontology*, 33(2), 176-182.
- Hagiwara, E., Takahashi, K.-I., Okubo, T., Ohno, S., Ueda, A., Aoki, A., Odagiri, S., & Ishigatsubo, Y. (2001). Cigarette smoking depletes cells spontaneously secreting th1 cytokines in the human airway. *Cytokine*, 14(2), 121-126.
- Han, X., Lin, X., Seliger, A., Eastcott, J., Kawai, T., & Taubman, M. (2009). Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(3), 190-196.
- Hartigan-O'Connor, D. J., Hirao, L. A., McCune, J. M., & Dandekar, S. (2011). Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6(3), 221-227.
- Hassell, T. M. (1993). Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*, 3(1), 9-38.
- Haxhinasto, S., Mathis, D., & Benoist, C. (2008). The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺ Foxp3⁺ cells. *The Journal of experimental medicine*, 205(3), 565-574.
- Horvathova, M., Jahnova, E., Szabova, M., Tulinska, M., Kuricova, M., Liskova, A., Volkovova, K., & Dusinska, M. (2009). The relationship between cell surface

- markers, cytokines, ageing, and cigarette smoking. *Bratisl Lek Listy*, 110(7), 394-400.
- Huan, W., Tianzhu, Z., Yu, L., & Shumin, W. (2017). Effects of ergosterol on COPD in mice via JAK3/STAT3/NF- κ B pathway. *Inflammation*, 40, 884-893.
- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., & Hirokawa, K. (2001). Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus. *Endocrinology*, 142(4), 1419-1426.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *cell*, 126(6), 1121-1133.
- Johnson, G. K., & Guthmiller, J. M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontology 2000*, 44(1), 178-194.
- Kajiya, M., Giro, G., Taubman, M. A., Han, X., Mayer, M. P., & Kawai, T. (2010). Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal of oral microbiology*, 2(1), 5532.
- Keklikoğlu, N., Balcioglu, H., Bolat, I., Işık, S. Y., Gerek, M., Erdilek, D., Firatli, E., & Selmin, A. (2011). Kronik Periodontitisli Hastalarda Sement Kalınlığının Değerlendirilmesi. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 44(3), 175-179.
- Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 25(1), 8-20.
- Kinane, D. F., Peterson, M., & Stathopoulou, P. G. (2006). Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 40(1), 107-119.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-14.
- Kistler, J. O., Booth, V., Bradshaw, D. J., & Wade, W. G. (2013). Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS One*, 8(8), e71227.
- Ko, H. K., Lee, H. F., Lin, A. H., Liu, M. H., Liu, C. I., Lee, T. S., & Kou, Y. R. (2015). Regulation of cigarette smoke induction of IL-8 in macrophages by AMP-activated protein kinase signaling. *Journal of cellular physiology*, 230(8), 1781-1793.
- Kobayashi-Sakamoto, M., Hirose, K., Isogai, E., & Chiba, I. (2004). NF- κ B-dependent induction of osteoprotegerin by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 315(1), 107-112.
- Kong, Y. (1999). Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, and Peninger JM. *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature*, 397, 315-323.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 27, 485-517.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., & Gillespie, M. T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 103(9), 1345-1352.

- Kulkarni, C., & Kinane, D. F. (2014). Host response in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 65(1), 79-91.
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*, 48(2), 202-213.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
- Kyllar, M., Witter, K., & Tichy, F. (2010). Gingival stippling in dogs: clinical and structural characteristics. *Research in veterinary science*, 88(2), 195-202.
- Lacey, D., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M., Dunstan, C., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., & Scully, S. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 93(2), 165-176.
- Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of periodontology*, 89, S9-S16.
- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical periodontology and implant dentistry, 2 Volume Set*. John Wiley & Sons.
- Lappin, D., MacLeod, C., Kerr, A., Mitchell, T., & Kinane, D. (2001). Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clinical & Experimental Immunology*, 123(2), 294-300.
- Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2007). TH-17 differentiation: of mice and men. *Nature immunology*, 8(9), 903-905.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., & Hennighausen, L. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371-381.
- Lee, P. W., Severin, M. E., & Lovett-Racke, A. E. (2017). TGF- β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. *European journal of immunology*, 47(3), 446-453.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1-and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 26(5), 579-591.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 24, 99-146.
- Liberal, R., Grant, C. R., Longhi, M. S., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2015). Regulatory T cells: mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB life*, 67(2), 88-97.
- Listgarten, M. (1970). Changing concepts about the dento-epithelial junction. *Journal of the Canadian Dental Association*, 36(2), 70-75.
- Loos, B. G., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 26-39.
- Löe, H., & Silness, J. (1963). Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica*, 21(6), 533-551.
- Lü, L., Yakoumatos, L., Ren, J., Duan, X., Zhou, H., Gu, Z., Mohammed, M., Uriarte, S. M., Liang, S., & Scott, D. A. (2020). JAK3 restrains inflammatory responses and protects against periodontal disease through Wnt3a signaling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(7), 9120.

- Mahanonda, R., Champaiboon, C., Subbalekha, K., Sa-Ard-Iam, N., Yongyuth, A., Isaraphithakkul, B., Rerkyen, P., Charatkulangkun, O., & Pichyangkul, S. (2018). Memory T cell subsets in healthy gingiva and periodontitis tissues. *Journal of periodontology*, 89(9), 1121-1130.
- Martín, P., Gómez, M., Lamana, A., Cruz-Adalia, A., Ramírez-Huesca, M., Ursa, M. A., Yáñez-Mo, M., & Sánchez-Madrid, F. (2010). CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. *Molecular and cellular biology*, 30(20), 4877-4889.
- Martín, P., & Sánchez-Madrid, F. (2011). CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses. *Science signaling*, 4(165), pe14-pe14.
- Mattos, C. M., & Santana, R. B. (2008). A quantitative evaluation of the spatial displacement of the gingival zenith in the maxillary anterior dentition. *Journal of periodontology*, 79(10), 1880-1885.
- McKee, M., Zalzal, S., & Nanci, A. (1996). Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 245(2), 293-312.
- Medara, N., Lenzo, J. C., Walsh, K. A., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., & Darby, I. B. (2021). Peripheral T helper cell profiles during management of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 48(1), 77-91.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Meyle, J., & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69(1), 7-17.
- Mian, M. F., Lauzon, N. M., Stämpfli, M. R., Mossman, K. L., & Ashkar, A. A. (2008). Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *Journal of Leucocyte Biology*, 83(3), 774-784.
- Mian, M. F., Pek, E. A., Mossman, K. L., Stämpfli, M. R., & Ashkar, A. A. (2009). Exposure to cigarette smoke suppresses IL-15 generation and its regulatory NK cell functions in poly I: C-augmented human PBMCs. *Molecular immunology*, 46(15), 3108-3116.
- Miranda, T. S., de Freitas Figueiredo, N., Figueiredo, L. C., da Silva, H. D. P., Rocha, F. R. G., & Duarte, P. M. (2020). Cytokine profiles of healthy and diseased sites in individuals with periodontitis. *Archives of oral biology*, 120, 104957.
- Mishra, J., Verma, R. K., Alpini, G., Meng, F., & Kumar, N. (2013). Role of Janus kinase 3 in mucosal differentiation and predisposition to colitis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31795-31806.
- Mize, T. W., Sundararaj, K. P., Leite, R. S., & Huang, Y. (2015). Increased and correlated expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor beta 1 in surgically removed periodontal tissues with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(3), 315-319.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (2005). Pillars Article: Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J. Immunol.*, 1986, 136: 2348–2357. *The Journal of Immunology*, 175(1), 5-14.
- Muhlemann, H., Zander, H., & Halberg, F. (1954). Mitotic activity in the periodontal tissues of the rat molar. *Journal of dental research*, 33(4), 459-467.

- Murphy, K. M., & Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), 933-944.
- Naderi, N. J., Semyari, H., & Elahinia, Z. (2015). The impact of smoking on gingiva: a histopathological study. *Iranian journal of pathology*, 10(3), 214.
- Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G., & Yamazaki, K. (2005). Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *Journal of dental research*, 84(7), 639-643.
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 11.
- Nędzi-Góra, M., Kowalski, J., & Górka, R. (2017). The immune response in periodontal tissues. *Archivum immunologiae et therapiarum experimentalis*, 65, 421-429.
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2011). *Carranza's clinical periodontology*. Elsevier health sciences.
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2018). *Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book: Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Nouri-Shirazi, M., & Guinet, E. (2003). Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology*, 109(3), 365-373.
- Ociepa, K., Danilewicz, M., Wągrowiska-Danilewicz, M., Peterson-Jęckowska, R., Wójcicka-Rubin, A., Lewkowicz, N., Zajdel, R., & Żebrowska, A. (2022). Expression of the selected proteins of JAK/STAT signaling pathway in diseases with oral mucosa involvement. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 323.
- Offenbacher, S. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of periodontology*, 1(1), 821-878.
- Ohlrich, E., Cullinan, M., & Seymour, G. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian dental journal*, 54, S2-S10.
- Okui, T., Aoki, Y., Ito, H., Honda, T., & Yamazaki, K. (2012). The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *Journal of dental research*, 91(6), 574-579.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., & Li, M. O. (2010). Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, 32(5), 642-653.
- Ouyang, Y., Virasch, N., Hao, P., Aubrey, M. T., Mukerjee, N., Bierer, B. E., & Freed, B. M. (2000). Suppression of human IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and TNF- α production by cigarette smoke extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), 280-287.
- Page, R. C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 26(3), 230-242.
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34(3), 235-249.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., & Graziani, F. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89, S173-S182.

- Parachuru, V., Coates, D., Milne, T., Rich, A., & Seymour, G. (2018). FoxP3⁺ regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 53(4), 622-635.
- Pasarin, L., Martu, M.-A., Ciurcanu, O. E., Luca, E. O., Salceanu, M., Anton, D., Martu, C., Martu, S., & Esanu, I. M. (2023). Influence of Diabetes Mellitus and Smoking on Pro-and Anti-Inflammatory Cytokine Profiles in Gingival Crevicular Fluid. *Diagnostics*, 13(19), 3051.
- Payne, W., Page, R. C., Ogilvie, A., & Hall, W. (1975). Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 10(2), 51-64.
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 929-979.
- Piaggesechi, G., Rolla, S., Rossi, N., Brusa, D., Naccarati, A., Couvreur, S., Spector, T. D., Roederer, M., Mangino, M., & Cordero, F. (2021). Immune trait shifts in association with tobacco smoking: a study in healthy women. *Frontiers in Immunology*, 12, 637974.
- Pollizzi, K. N., & Powell, J. D. (2014). Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 435-446.
- Preber, H., & Bergström, J. (1985). Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontologica Scandinavica*, 43(5), 315-320.
- Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2019). Periodontitis and diabetes. *British dental journal*, 227(7), 577-584.
- Song, L., Kim, Y. H., Chopra, R. K., Proust, J. J., Nagel, J. E., Nordin, A. A., & Adler, W. H. (1993). Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Experimental gerontology*, 28(4-5), 313-321.
- Qiu, F., Liang, C.-L., Liu, H., Zeng, Y.-Q., Hou, S., Huang, S., Lai, X., & Dai, Z. (2017). Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*, 8(1), 268.
- Qiu, S., Bai, J., Zhong, X., Huang, Q., Chen, H., & Liu, G. (2010). CD4 (+) Foxp3 (+) regulatory T cells in inflammation and emphysema after smoking cessation in rats. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua Jiehe he Huxi Zazhi= Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 33(9), 688-692.
- Radulovic, K., Manta, C., Rossini, V., Holzmann, K., Kestler, H. A., Wegenka, U. M., Nakayama, T., & Niess, J. H. (2012). CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. *The Journal of Immunology*, 188(4), 2001-2013.
- Rane, S. G., & Reddy, E. P. (1994). JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene*, 9(8), 2415-2423.
- Repeke, C. E., Ferreira Jr, S. B., Claudino, M., Silveira, E. M., de Assis, G. F., Avila-Campos, M. J., Silva, J. S., & Garlet, G. P. (2010). Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1⁺ and CCR5⁺ in RANKL⁺ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone*, 46(4), 1122-1130.
- Ries, W. L., Seeds, M. C., & Key, L. L. (1989). Interleukin-2 stimulates osteoclastic activity; Increased acid production and radioactive calcium release. *Journal of Periodontal Research*, 24(4), 242-246.

- Ritchey, B., & Orban, B. (1953). The crests of the interdental alveolar septa. *The Journal of Periodontology*, 24(2), 75-87.
- Romagnani, S. (1996). Th1 and Th2 in human diseases. *Clinical immunology and immunopathology*, 80(3), 225-235.
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of allergy, asthma & immunology*, 85(1), 9-21.
- Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological reviews*, 241(1), 260-268.
- Saijo, K., Park, S. Y., Ishida, Y., Arase, H., & Saito, T. (1997). Crucial role of Jak3 in negative selection of self-reactive T cells. *The Journal of experimental medicine*, 185(2), 351-356.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6(4), 345-352.
- Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B., Tanaka, A., Ichiyama, K., & Ohkura, N. (2020). Regulatory T cells and human disease. *Annual review of immunology*, 38, 541-566.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490-500.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), 1151-1164.
- Sánchez-Díaz, R., Blanco-Dominguez, R., Lasarte, S., Tsilingiri, K., Martín-Gayo, E., Linillos-Pradillo, B., de la Fuente, H., Sánchez-Madrid, F., Nakagawa, R., & Toribio, M. L. (2017). Thymus-derived regulatory T cell development is regulated by C-type lectin-mediated BIC/microRNA 155 expression. *Molecular and cellular biology*, 37(9), e00341-00316.
- Sancho, D., Gómez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordón-Alonso, M., García-López, M. A., de la Fuente, H., Martínez-A, C., Lauzurica, P., & Sánchez-Madrid, F. (2003). CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 112(6), 872-882.
- Schacht, V., & Kern, J. S. (2015). Basics of immunohistochemistry. *Journal of investigative dermatology*, 135(3), 1-4.
- Schroeder, H. E. (1969). Melanin containing organelles in cells of the human gingiva I. Epithelial Melanocytes. *Journal of Periodontal Research*, 4(1), 1-18.
- Seymour, G. J., & Gemmell, E. (2001). Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica Scandinavica*, 59(3), 167-173.
- Silness, J., & Løe, H. (1964). Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica*, 22(1), 121-135.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernandez, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23, 329-355.

- Simonet, W., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H., Wooden, S., Bennett, L., & Boone, T. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *cell*, 89(2), 309-319.
- Singer, B. D., King, L. S., & D'Alessio, F. R. (2014). Regulatory T cells as immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 46.
- Sreedevi, M., Ramesh, A., & Dwarakanath, C. (2012). Periodontal status in smokers and nonsmokers: a clinical, microbiological, and histopathological study. *International journal of dentistry*, 2012.
- Stein, S. H., Green, B. E., & Scarbecz, M. (2004). Augmented transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid of smokers with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 75(12), 1619-1626.
- Steinsvoll, S., Halstensen, T., & Schenck, K. (1999). Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *Journal of clinical periodontology*, 26(6), 366-373.
- Sterlacci, W., Wolf, D., Savic, S., Hilbe, W., Schmid, T., Jamnig, H., Fiegl, M., & Tzankov, A. (2012). High transforming growth factor β expression represents an important prognostic parameter for surgically resected non-small cell lung cancer. *Human pathology*, 43(3), 339-349.
- Takatori, H., Kanno, Y., Chen, Z., & O'Shea, J. J. (2008). New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. *Modern rheumatology*, 18(6), 533-541.
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., & Taniguchi, T. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, 408(6812), 600-605.
- Takeichi, O., Haber, J., Kawai, T., Smith, D., Moro, I., & Taubman, M. (2000). Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *Journal of dental research*, 79(8), 1548-1555.
- Tarnow, D. P., Magner, A. W., & Fletcher, P. (1992). The effect of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence or absence of the interproximal dental papilla. *Journal of periodontology*, 63(12), 995-996.
- Taubman, M. A., Valverde, P., Han, X., & Kawai, T. (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *Journal of periodontology*, 76, 2033-2041.
- Taylor, C., & Burns, J. (1974). The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *Journal of clinical pathology*, 27(1), 14.
- Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 638-649.
- Tie, Y., Tang, F., Wei, Y.-q., & Wei, X.-w. (2022). Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 61.
- Tipton, D. A., & Dabbous, M. K. (1995). Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *Journal of periodontology*, 66(12), 1056-1064.
- Tompkins, K. A. (2016). The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connective tissue research*, 57(2), 69-90.

- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 89, S159-S172.
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of clinical periodontology*, 45, S44-S67.
- Tsuyusaki, J., Kuroda, F., Kasuya, Y., Ishizaki, S., Yamauchi, K., Sugimoto, H., Kono, T., Iwamura, C., Nakayama, T., & Tatsumi, K. (2011). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is attenuated in CD69-deficient mice. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 31(6), 434-439.
- Turner, J. A., Stephen-Victor, E., Wang, S., Rivas, M. N., Abdel-Gadir, A., Harb, H., Cui, Y., Fanny, M., Charbonnier, L.-M., & Fong, J. J. H. (2020). Regulatory T cell-derived TGF- β 1 controls multiple checkpoints governing allergy and autoimmunity. *Immunity*, 53(6), 1202-1214. e1206.
- Van der Velden, U., Varoufaki, A., Hutter, J. W., Xu, L., Timmerman, M. F., Van Winkelhoff, A. J., & Loos, B. G. (2003). Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*, 30(7), 603-610.
- Van Dyke, T., & Serhan, C. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of dental research*, 82(2), 82-90.
- Vardavas, C. I., Plada, M., Tzatzarakis, M., Marcos, A., Warnberg, J., Gomez-Martinez, S., Breidenassel, C., Gonzalez-Gross, M., Tsatsakis, A. M., & Saris, W. H. (2010). Passive smoking alters circulating naïve/memory lymphocyte T-cell subpopulations in children. *Pediatric allergy and immunology*, 21(8), 1171-1178.
- Vargas-Hernández, A., & Forbes, L. R. (2019). JAK/STAT proteins and their biological impact on NK cell development and function. *Molecular immunology*, 115, 21-30.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., & Stockinger, B. (2006). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189.
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., García, L., Valle, I. D., Silva, A., & Gamonal, J. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of periodontology*, 77(10), 1772-1780.
- Vitales-Noyola, M., Martínez-Martínez, R., Loyola-Rodríguez, J. P., Baranda, L., Niño-Moreno, P., & González-Amaro, R. (2017). Quantitative and functional analysis of CD 69⁺ T regulatory lymphocytes in patients with periodontal disease. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(7), 549-557.
- Wang, L., Wang, J., Jin, Y., Gao, H., & Lin, X. (2014). Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *Journal of periodontology*, 85(5), 740-750.
- Wang, R. D., Wright, J. L., & Churg, A. (2005). Transforming growth factor- β 1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 33(4), 387-393.
- Wang, W., Wang, X., Lu, S., Lv, H., Zhao, T., Xie, G., Du, Y., Fan, Y., & Xu, L. (2021). Metabolic disturbance and Th17/Treg imbalance are associated with progression of gingivitis. *Frontiers in Immunology*, 12, 670178.

- Wing, K., & Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology*, 11(1), 7-13.
- Whisler, R. L., Beiqing, L., & Chen, M. (1996). Age-related decreases in IL-2 production by human T cells are associated with impaired activation of nuclear transcriptional factors AP-1 and NF-AT. *Cellular immunology*, 169(2), 185-195.
- Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., Silvennoinen, O., & O'Shea, J. J. (2004). The janus kinases (jaks). *Genome biology*, 5(12), 1-6.
- Yanbaeva, D. G., Dentener, M. A., Creutzberg, E. C., Wesseling, G., & Wouters, E. F. (2007). Systemic effects of smoking. *Chest*, 131(5), 1557-1566.
- Yang, J., Wu, J., Zhang, R., Yao, M., Liu, Y., Miao, L., & Sun, W. (2017). Porphyromonas gingivalis oral infection promote T helper 17/Treg imbalance in the development of atherosclerosis. *Journal of Dental Sciences*, 12(1), 60-69.
- Yin, L., Morita, A., & Tsuji, T. (2003). Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF- β . *Experimental dermatology*, 12, 51-56.
- Yoo, W., Jung, H.-Y., Lim, S., Sung, J. S., Park, K. H., Ryu, J. S., Shin, S. W., Kim, J. S., Seo, J. H., & Kim, Y. H. (2011). An association study of polymorphisms in JAK3 gene with lung cancer in the Korean population. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 43(2), 108.
- Yoshida, H., Kimura, A., Fukaya, T., Sekiya, T., Morita, R., Shichita, T., Inoue, H., & Yoshimura, A. (2012). Low dose CP-690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 418(2), 234-240.
- Yucel-Lindberg, T., & Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*, 15, e7.
- Zambon, J., Grossi, S., Machtei, E., Ho, A., Dunford, R., & Genco, R. (1996). Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *Journal of periodontology*, 67, 1050-1054.
- Zeidel, A., Beilin, B., Yardeni, I., Mayburd, E., Smirnov, G., & Bessler, H. (2002). Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 46(8), 959-964.
- Zhang, W., Lin, H., Zou, M., Yuan, Q., Huang, Z., Pan, X., & Zhang, W. (2022). Nicotine in inflammatory diseases: anti-inflammatory and pro-inflammatory effects. *Frontiers in Immunology*, 13, 826889.
- Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., & Horwitz, D. A. (2002). Generation ex vivo of TGF- β -producing regulatory T cells from CD4⁺ CD25⁻ precursors. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4183-4189.
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y. P., & Rudensky, A. Y. (2008). TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, 453(7192), 236-240.
- Zhou, Y., Quan, G., Liu, Y., Shi, N., Wu, Y., Zhang, R., Gao, X., & Luo, L. (2023). The application of Interleukin-2 family cytokines in tumor immunotherapy research. *Frontiers in Immunology*, 14, 1090311.
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem cells*, 12(5), 456-465.

EK-1



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



Sayı : 83116987 - 819
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 22.12.2022
Toplantı No : 2022/22
Proje No : 22-KAEK-288

22.12.2022

Sayın, Dr. Öğretim Üyesi Gözde IŞIKER KARA

Etik Kurulumuzun 22.12.2022 tarihli toplantısında görüşülen 22-KAEK-288 kayıt numaralı **“Sağlıklı, gingivitisli ve periodontitisli bireylerde düzenleyici T hücresi (Treg) biyobelirteçlerinin araştırılması”** başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

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

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç.Dr. Muzaffer KATAR
Başkan



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



Sayı : 83116987 - 333
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 11.05.2023
Toplantı No : 2023/09
Proje No : 22-KAEK-288

11.05.2023

Sayın, Dr. Öğretim Üyesi Gözde IŞIKER KARA

13.04.2023 tarihli dilekçeniz 11.05.2023 tarihli etik kurul toplantımızda görüşülmüştür.

Buna göre, yürütücülüğünü yapmış olduğunuz ve 22.12.2022 tarihli toplantımızda görüşülerek uygun bulunan **22-KAEK-288** numaralı **“Sağlıklı, Gingivitisli ve Periodontitisli Bireylerde Düzenleyici T Hücreleri (Treg) Biyobelirteçlerinin Araştırılması”** başlıklı çalışmanızın ilgi dilekçeniz doğrultusunda;

1. Çalışmanın isminin “Sağlıklı ve Periodontitisli Bireylerde Sigaranın Düzenleyici T Hücreleri (Treg) Biyobelirteçleri Üzerine Etkisinin Araştırılması” olması,
 2. Çalışma gruplarının sayısını aynı kalmış kaydıyla grupların içeriğinin grup B Sigara İçen Sağlıklı Periodontal Dokulara Sahip Bireyler, grup C Sigara İçen Evre 3 Derece C Periodontitisli Bireyler olarak değiştirilmesi ve
 3. İmmunohistokimya analizinde kullanılacak markerlardan IL-10 yerine ERK1 biyobelirtecinin araştırılması,
- olarak değiştirilmesi ile ilgili isteklerinizin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç.Dr. Muzaffer KATAR
Başkan

EK-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmacının/Hekimin Açıklaması

Periodontal hastalıkların mekanizmasını anlamak amacıyla bir bilimsel araştırma yapmayı planlamaktayız. Yapılması planlan araştırmanın ismi "Sağlıklı ve Periodontitisli Bireylerde Sigaranın Düzenleyici T Hücreleri (Treg) Biyobelirteçleri Üzerine Etkisinin Araştırılması" dır.

Gingivitis ve Periodontitis tanısı konan ve/veya bunların tedavisi nedeniyle klinik takibi yapılan hastalar üzerinde uygulanacak olan bu çalışmaya, tıbbi durumunuz bu koşullara uyduğu için sizi de davet ediyoruz. Ancak hemen belirtilmelidir ki araştırmaya katılıp katılmamak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu bilimsel çalışmaya katılma kararını tamamen hür iradeniz ile vermelisiniz. Bu kararı verirken hiç kimse tarafından size telkin ve baskıda bulunulamaz.

Kararınızdan önce söz konusu bilimsel araştırma ve bu araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda yapılacak işlemler hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra bu bilimsel araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bilimsel çalışma hakkında bilgiler

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, 25-60 yaş aralığında, sistemik bir rahatsızlığı bulunmayan, Gingivitis ve Periodontitis tanısı koyulmuş bir birey olmanızdır. Bu araştırma Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı işbirliği ile gerçekleştirilecektir.

Bu araştırmada araştırılacak olan Treg biyobelirteçleri periodontal dokularda, enflamasyonu, yumuşak doku kaybı ve alveolar kemik rezorpsiyonunu kontrol ederek periodontal sağlığın korunmasında önemlidir. Treg'lerin, fizyolojik ve patolojik koşullar altında kemik döngüsünün korunmasında önemli bir role sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle Treg'ler tarafından düzenlenen immüno-supresif mekanizmalar, doku yıkımı ile ilişkili karmaşık enflamatuvar hastalıkların tedavisinde araştırılan bir konudur.

Treg biyolojisi hakkındaki bilgimiz arttıkça, periodontitis sırasında Treg'in stabilitesini ve işlevini geliştirmek için tasarlanmış yeni tedaviler geliştirilebilecektir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı: sağlıklı ve periodontal enflamasyon durumunda diş etinde bulunan Treg hücre biyobelirteçlerini (IL-2, TGF-β1, CD69, FOXP3, JAK3) araştırmaktır. Kronik enflamatuvar ve otoimmün bozuklukları olan hastalarda CD69 +Treg'lerin bozulmuş baskılayıcı işlevleri vardır. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg hücreleri arasında FoxP3+CD69⁺ Treg'lerin tanımlanması, böyle bir hücre alt kümesi için enflamasyona ve otoimmüniteye karşı koruyucu bir etki gösterdiği için, immün homeostaz ve otoimmün reaktivitenin düzenlenmesi için yeni bir protokol olabilir.

Çalışma için sizden diş eti örneği alınacaktır.

Bunun için flep operasyonu, gingivektomi, kuren boyu gibi işlemler sonrasında elde edilen diş eti örnekleri kullanılacaktır.

Çalışma kapsamında bilinmesi gereken durumlar ve araştırmacılar ile gönüllülerin uyması gereken kurallar

- Araştırmaya katılmanız durumunda;
1. Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
2. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
3. Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
4. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz çok büyük bir hassasiyetle korunacaktır.
5. Çalışma sırasında meydana gelebilecek sağlığınız ile ilgili ve diğer olumsuzlukların sorumluluğu araştırmacılara aittir.
6. Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
7. Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemelerinizde hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtimam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Katılımcının (Gönüllü) / Hastanın Beyanı

Araştırmanın adı :
Araştırma sorumlusu :
Tarih :
İmza :

Sayın Dt. Kübra BAŞARAN tarafından, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı işbirliği ile bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler tarafıma aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam, hekim ile aramda kalması gereken, bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı gösterileceği, araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı kesin ve net bir şekilde belirtilmiştir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Benden herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacağı net ve kesin bir şekilde ifade edilmiştir.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğum bildirilmiştir. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının da bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun, araştırma sürecinde araştırma ile ilgili ortaya çıkabilecek sağlık durumuyla ilgili olumsuzluklarda sorumluluk araştırmacılara ait olup parasal bir yük altına girmeyeceğim.

Araştırma sırasında araştırma ile ilgili bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; günün herhangi bir saatinde Dt. Kübra BAŞARAN'a,numaralı telefondan ulaşarak danışabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı herhangi bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (gönüllü) olarak yer alma kararını tamamen hür iradem ile almış bulunuyorum. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllük içerisinde kabul ediyorum.

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Görüşme Tanığı

Adı, Soyadı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Katılımcı (Gönüllü) ile Görüşen Araştırmacı

Adı, Soyadı, Ünvanı :
Adres :
Telefon :
İmza :

Araştırmanın adı :
Araştırma sorumlusu :
Tarih :
İmza :

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:

Kübra BAŞARAN

Öğrenim Bilgileri:

Lise: Nazilli Anadolu Öğretmen Lisesi 2008-2012

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi 2012-2017

Uzmanlık: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi 2021-

İş Deneyimi:

Özel İsa Nuri İNCE Diş Polikliniği 2019-2021

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği

Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı