**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

# RATLARDA DENEYSEL OLARAK İNDÜKLENEN PERİODONTİTİS MODELİNDE ALVEOLAR KEMİK KAYBI ÜZERİNE SİSTEMİK ERİTROPOETİN UYGULAMASININ ETKİSİ

**Amin ADİL**

**Periodontoloji Anabilim Dalı**

**Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR**

**ESKİŞEHİR**

**2020**

**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

# RATLARDA DENEYSEL OLARAK İNDÜKLENEN PERİODONTİTİS MODELİNDE ALVEOLAR KEMİK KAYBI ÜZERİNE SİSTEMİK ERİTROPOETİN UYGULAMASININ ETKİSİ

**Amin ADİL**

**Periodontoloji Anabilim Dalı**

**Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR**

**Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2020-3073 proje numarası ile desteklenmiştir.**

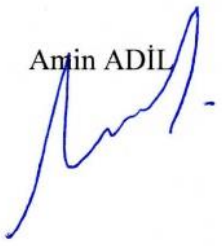
**ESKİŞEHİR**

**2020**

## UZMANLIK TEZİ BEYANNAMESİ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum "**RATLARDA DENEYSEL OLARAK İNDÜKLENEN PERİODONTİTİS MODELİNDE ALVEOLAR KEMİK KAYBI ÜZERİNE SİSTEMİK ERİTROPOETİN UYGULAMASININ ETKİSİ**" başlıklı araştırmayı danışmanım Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR'in rehberlik ve sorumluluğunda tamamladığımı; çalışma protokolü ve süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı, verilerin tarafımdan toplandığını, örneklerin tarafımca hazırlandığını; deney, analiz ve görüntüleme işlemlerinin ilgili laboratuar ve görüntüleme merkezinde tarafımca yapıldığını/yaptırıldığını, tez metnini hazırlarken kaynakçanın eksiksiz olarak gösterildiğini, tezin yazım kılavuzu kurallarına uygun olarak hazırlandığını ve belirtilen hususların aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Amin ADİL



# İÇİNDEKİLER

**TEŞEKKÜR** ..... **IV**

**ÖZET** ..... **V**

**ABSTRACT** ..... **VI**

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **VII**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **IX**

**TABLOLAR DİZİNİ** ..... **X**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. GENEL BİLGİLER** ..... **4**

2.1.Periodontal Hastalık ..... 4

2.1.1.Periodontal Hastalıkların Sınıflaması ..... 4

2.1.2.Gingivitis ..... 5

2.1.3.Periodontitis ..... 7

2.2.Sitokinler ..... 12

2.2.1.İnterlökin 1 ..... 14

2.2.2.İnterlökin 6 ..... 15

2.2.3.TNF-alfa ..... 16

2.2.4.Sitokinler ve Periodonsiyum ..... 17

2.3.Periodontitiste Kemik Kaybı ..... 18

2.3.1.RANK, RANK-L ve Osteoprotegrin (OPG) ..... 22

2.4.Deneysel Periodontitis ..... 24

2.5.Eritropoetin.....25

2.5.1.Eritropoetin'in Üretimi ve Yıkımı.....26

2.5.2.Eritropoetin İle İndüklenen Sinyal Sistemleri.....28

2.5.3.Eritropoez Stimüle Edici Ajanlar (ESA'lar).....29

2.5.4.Eritropoetin'in Hematopoetik Olmayan Fonksiyonları.....31

2.5.5.Eritropoetin'in Anti-inflamatuar Etkisi.....32

2.5.6.Eritropoetin'in Kemik Üzerindeki Etkisi.....34

**3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....36**

3.1. Çalışma Tasarımı.....36

3.2.Periodontitis İndüksiyonu.....37

3.3.Darbapoetin-alfa Uygulaması.....38

3.4.Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Örneklerin Hazırlanması.....39

3.5.Mikro Bilgisayarlı Tomografi Analizi.....41

3.6.qRt-PCR yöntemi ile dişeti TNF-α, IL-1β, IL-6, EPO ve EPO-R mRNA düzeyleri tayini.....42

3.7.Histolojik Analiz.....43

3.7.1.Örneklerin Parafine Gömme İşlemine Hazırlık.....43

3.7.2.Parafin Doku Takibi.....44

3.7.3.Boyamaya Hazırlık.....45

3.7.4.Hematoksilen-Eozin Boyaması.....45

3.8.İmmünhistokimyasal Analiz.....46

3.9.İstatistiksel Analiz.....46

**4. BULGULAR ..... 48**

4.1. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi Analiz Bulguları ..... 48

4.2. Histolojik Analiz Bulguları ..... 49

4.3.qRT-PCR Analizi Bulguları ..... 50

4.4. İmmmünhistokimyasal Analiz Bulguları ..... 53

**5. TARTIŞMA ..... 56**

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 63**

**KAYNAKLAR ..... 64**

**EKLER ..... 83**

**EK-1.ÖZGEÇMİŞ ..... 83**

**EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ ..... 85**

# TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, hem pratik hem teorik bilgi ve deneyimini aktaran tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Hakan Özdemir'e,

Değerli destek ve katkılarından dolayı Dr. Öğ. Üyesi. Başak Şeker, Doç. Dr. Nesrin Saruhan ve Doç. Dr. İbrahim Şevki Bayrakdar hocalarıma,

Her zaman yanımda olan, motivasyon çabalarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Emine Zeynep Bal ve Arş. Gör. Tuğba Kavalcı'ya,

Çalışmamda ve uzmanlık sürecimin daha verimli geçmesinde olan katkılarından dolayı arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet Mimaroğlu ve Arş. Gör. Merve Tekelioğlu'na,

Beni yetiştiren, yoluma ışık olan ve sevgilerini her zaman hissettiren annem ve babama sonsuz teşekkürler.

# ÖZET


**Amaç**

Bu araştırmada amacımız deneysel olarak indüklenen periodontitis varlığında sistemik olarak uygulanan Eritropoetin (EPO)'nin periodontal dokulardaki inflamasyon ve kemik kaybı üzerindeki etkilerini gözlemlemek ve terapötik etkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem**

Çalışmada 250-300 gram ağırlığında 50 adet 12-14 haftalık erkek Sprague Dawley rat kullanılmıştır. Ratlar beş eşit gruba ayrıldı: Kontrol grubu (K, n=10), Periodontitis grubu (P, n=10), Kontrol+Darbepoetin alfa 0.25 µg/kg/gün grubu (K+EPO 0.25, n=10), Periodontitis+Darbepoetin alfa 0.1 µg/kg/gün grubu (P+EPO 0.1, n=10) ve Periodontitis+Darbepoetin alfa 0.25 µg/kg/gün grubu (P+EPO 0.1, n=10). Deneysel periodontitis oluşturmak için ratların sağ mandibular 1.moları dişlerine 4/0 ipek ligatürler submarjinal olarak yerleştirildi. 11 günlük EPO uygulamasından sonra ratlar sakrifiye edildi. Ratlardan dişeti örnekleri ve mandibula total olarak alınmıştır. Mikro-bilgisayarlı tomografi (Mikro-BT) analizi yaparak alveoler kemik kaybı miktarı mandibular 1.molar ve 2.molar arasında interproksimal bölgede mine-sement sınırından alveoler kret arası mesafeler ölçülerek hesaplanmıştır. Gruplardan alınan diğer kemik örneklerinde histolojik yöntemlerle osteoklast hücre sayımı yapılmıştır ve immünhistokimyasal yöntemlerle apoptoz oranı hesaplanmıştır. qRT-PCR yöntemi ile EPO, EPO-R, TNF-α, IL-1β ve IL-6 mRNA düzeyleri ölçülmüştür.

**Bulgular**

Mikro-BT analizi sonuçlarına göre, P+EPO 0.1 (0,7980±0,05978) ve P+EPO 0.25 (0,7720±0,03967) gruplarında kemik kaybı miktarı periodontitis (1,2720±0,07729) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Yapılan histolojik analizlerin sonucuna göre, P+EPO 0.1 ve P+EPO 0.25 gruplarında osteoklastik aktivite periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). İmmünhistokimyasal analizin sonuçlarına göre TUNEL boyaması incelendiğinde, P+EPO 0.1 (7,060±4,076) ve P+EPO 0.25 (10,19±9,746) gruplarında apoptotik hücre indeksi periodontitis (44,93±16,86) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). qRt-PCR yöntemi analizi sonucunda, P+EPO 0.1 ve P+EPO 0.25 gruplarında TNF-α, IL-1β ve IL-6 gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna yakın bulunmuştur ($p>0.05$). EPO-R gen ekspresyon düzeyleri ise P+EPO 0.1 ve P+EPO 0.25 gruplarında periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek çıkmıştır ($p>0.05$).

**Sonuç**

Bu çalışmanın sonucunda EPO'nin anti-inflamatuar, antiapoptotik ve sitoprotektif etkileriyle periodontal hastalık esnasında perioodontal dokuları koruyabileceğini söyleyebiliriz.



**Anahtar Kelimeler:** Ertiropoetin, İnflamasyon, Periodontitis

# ABSTRACT

**Aim**

In this study, our aim is to observe and investigate the therapeutic effect of Erythropoietin (EPO) systemically applied in the presence of experimentally induced periodontitis on inflammation and bone loss in periodontal tissues.

**Material and Method**

In this study, fifty 12-14 week old male Sprague Dawley rats weighing 250-300 grams were used. Rats were divided into five equal groups: Control group (K, n = 10), Periodontitis group (P, n = 10), Control + Darbepoetin alpha 0.25 µg / kg / day group (K + EPO 0.25, n = 10), Periodontitis + Darbepoetin alpha 0.1 µg / kg / day group (P + EPO 0.1, n = 10) and Periodontitis + Darbepoetin alpha 0.25 µg / kg / day group (P + EPO 0.1, n = 10). To create experimental periodontitis, 4/0 silk ligatures were placed submarginally in the right mandibular 1st molar teeth of the rats. After 11 days of EPO application, the rats were sacrificed. Gingival samples and mandible were collected from rats. By micro-computed tomography (Micro-CT) analysis, the amount of alveolar bone loss was calculated by measuring the distances between the mandibular 1st molar and the 2nd molar between the alveolar crest in the interproximal region. In other bone samples taken from the groups, osteoclast cell counts were performed by histological methods and the rate of apoptosis was calculated by immunohistochemical methods. EPO, EPO-R, TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA levels were measured by qRT PCR method.

**Results**

According to micro-computed tomography (Micro-ct) analysis, bone loss amount in group P+ EPO 0.1 (0.7980 ± 0.05978) and group P+ EPO 0.25 (0.77720 ± 0.03967) was decreased significantly compared to the periodontitis group (1,2720 ± 0,07729) ($p<0.05$). According to the results of histological analysis, the osteoclastic activity is significantly lower in the P+ EPO 0.1 and P+ EPO 0.25 groups compared to the periodontitis group ($p<0.05$). According to the results of the immunohistochemical analysis, apoptotic cell index was statistically significantly lower in the P+ EPO 0.1 (7,060 ± 4,076) and P+ EPO 0.25 (10,19 ± 9,746) groups compared to the periodontitis group (44.93 ± 16.86) ($p <0.05$). According to the results of qRt-PCR method analysis, TNF-α, IL-1β and IL-6 gene expression levels were found close to the control group in P+ EPO 0.1 and P+ EPO 0.25 groups ($p>0.05$). EPO-R gene expression levels were higher in P+ EPO 0.1 and P+ EPO 0.25 groups, although not statistically significant compared to the periodontitis group ($p>0.05$).

**Conclusion**

As a result of this study, we can say that EPO can protect the perioodontal tissues during periodontal disease with its anti-inflammatory, antiapoptotic and cytoprotective effects.



**Key Words:** Erythropoietin, İnflammation, Periodontitis

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| AA: | Amiloid A |
| ABY: | Akut böbrek yetmezliği |
| Ark.: | Arkadaşları |
| APA | Amerikan periodontoloji akademisi |
| APF | Avrupa periodontoloji federasyonu |
| BMP: | Kemik morfojenik protein |
| CRP: | C-reaktif protein |
| CSF: | Koloni uyarıcı faktör |
| COX: | Siklooksijenaz |
| DAB: | Diaminobenzidin |
| DOS: | Dişeti oluğu sıvısı |
| DSÖ: | Dünya sağlık örgütü |
| EGF: | Epidermal büyüme faktörü |
| EphB4: | Efrin B4 reseptör |
| EPO: | Eritropoetin |
| EPO-R: | Eritropoetin reseptörü |
| ESA: | Eritropoetzi stimüle edici ajanlar |
| Fas-L: | Fas ligand |
| FGF: | Fibroblast büyüme faktörü |
| GFR: | Glomerüler filtrasyon hızı |
| GM-CSF: | Granülosit-makrofaj koloni uyarma faktörü |
| GP: | Glikoprotein |
| HB | Hemoglobin |
| HSC: | Hematopoetik kök hücre |
| HİF: | Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü |
| HİV: | İnsan immün yetmezlik virüsü |
| İCAM-1: | Hücreler arası yapışma molekülü-1 |
| İG: | İmmünoglobülin |
| İGF: | İnsan gingival fibroblastı |
| İL: | İnterlökin |
| iNOS | İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| İL-1RI: | İnterlökin 1 reseptörü |
| İRAK: | İnterlökin 1 reseptörü ile aktifleştirilen protein kinaz |
| İ/R: | İskemi/repürfüzyon |
| JAK: | Janus kinaz |
| JNK | Jun N-terminal kinaz |
| KAL | Klinik ataçman kaybı |
| KSP: | Kemik sialoprotein |
| MAPK: | Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz |
| MCP: | Monosit kemoatraktan protein |
| M-CSF: | Makrofaj koloni uyarıcı faktör |
| MDP: | Mikrobiyal dental plak |
| Mikro-BT: | Mikro bilgisayarlı tomografi |
| MİP: | Makrofaj inflamatuar protein |
| MMP: | Matriks metalloproteinaz |
| NF-kB: | Nükleer faktör kappa B |
| NO: | Nitrik oksit |

| | |
|---|---|
| OAF: | Osteoklast aktive edici faktör |
| OPG: | Osteoprotegrin |
| OPN: | Osteopontin |
| PAF: | Platelet aktive edici faktör |
| PDGF: | Trombosit kaynaklı büyüme faktörü |
| PG: | Porphyromonas gingivalis |
| PGE-2: | Prostogalndin E2 |
| PBMP: | Patojene bağlı moleküler paternler |
| PH: | Prolil hidroksilaz |
| Pİ3K: | Fosfotidilinositol 3-kinaz |
| PKMH: | Periferik kan mononükleer hücreler |
| PMNL: | Polimorfonükleer lökosit |
| RANK: | Reseptör aktivatör nükleer kappa B |
| RANKL: | Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand |
| RBC: | Kırmızı kan hücreleri |
| RhEPO: | Rekombinant insan eritropoetini |
| RKK | Radiyolojik kemik kaybı |
| STAT: | Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörü |
| SIL-6R: | Çözünebilir IL-6 reseptörü |
| TGF: | Transforme edici büyüme faktörü |
| TNF-α: | Tümöt nekroz edici faktörü alfa |
| TRAİL: | TNF ile ilgili apoptoz indükleyici ligand |
| VEGF: | Vasküler endotelyal büyüme faktörü |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil no:** **Sayfa no:**

**Şekil 2.1.** Periodontitisin patogenezi .....11

**Şekil 2.2.** Kemik rezorpsiyon/apozisyon döngüsü.....19

**Şekil 2.3.** RANK, RANKL VE OPG mekanizması.....23

**Şekil 2.4.** EPO'in hematopoetik olmayan etkileri .....31

**Şekil 3.1.** Erkek sprague dawley rat .....36

**Şekil 3.2.** Birinci moların çevresine steril 4/0 ipek ligatür submarjinal olarak yerleştirilmesi ...38

**Şekil 3.3.** Darbepoetin alfa (Aranesp).....38

**Şekil 3.4.** İntramusküler EPO uygulaması .....39

**Şekil 3.5.** Rezeke edilmiş mandibular çene.....40

**Şekil 3.6.** Deney prosedürü .....40

**Şekil 3.7.** SkyScan 1172 yazılımıyla alınan 3B görüntü.....41

**Şekil 3.8.** DataViewer 1.5.4.0 yazılımıyla kemik kaybı ölçümü .....41

**Şekil 4.1.** Kemik kaybı ortalamaları (mm).....48

**Şekil 4.2.** Hematoksilen-Eozin boyaması .....49

**Şekil 4.3.** IL-1β ekspresyon düzeyleri. .....50

**Şekil 4.4.** IL-6 ekspresyon düzeyleri. .....51

**Şekil 4.5.** TNF-α ekspresyon düzeyleri.....52

**Şekil 4.6.** EPO-R ekspresyon düzeyleri .....53

**Şekil 4.7.** Kemik kesitlerinde yapılan TUNEL boyaması sonucu elde edilen apoptotik hücre indeksi (%). .....54

**Şekil 4.8.** TUNEL boyaması .....55

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo no:** **Sayfa no:**

**Tablo 2.1.** Periodontal ve peri-implant hastalıklar ve durumların sınıflaması 2017. .....4

**Tablo 2.2.** Bozulmamış periodonsiyumda klinik sağlık ve gingivitis koşulları .....6

**Tablo 2.3.** Azalmış periodonsiyumda klinik sağlık ve gingivitis koşulları .....6

**Tablo 2.4.** Stabil periodontitis durumunda klinik sağlık ve gingivitis koşulları .....7

**Tablo 2.5.** Periodontitisin evreleri.....9

**Tablo 2.6.** Periodontitisin dereceleri .....10

**Tablo 3.1.** Hedef gen primerlerinin 20 bazlı sekans dizilimleri.....43

**Tablo 3.2.** Parafin takip protokolü .....44

**Tablo 4.1.** Kemik kaybı istatistiksel analiz sonuçları.....48

**Tablo 4.2.** Osteoklast hücre sayımı istatistiksel analiz sonuçları .....49

**Tablo 4.3.** IL-1β gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi .....50

**Tablo 4.4.** IL-6 gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi .....51

**Tablo 4.5.** TNF-α gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi .....52

**Tablo 4.6.** EPO-R gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi.....53

**Tablo 4.7.** TUNEL apoptotik hücre indeksi istatistiksel analizi .....54

# 1. GİRİŞ

Periodontal hastalık, dişi destekleyen yapıların kaybıyla karakterize yaygın bir kronik inflamatuar hastalıktır. Plak biyofilmi ve ilişkili konakçı yanıtları periodontitis patogenezinde anahtar elementlerdir.[1]

Periodontitis, dentogingival bölgede biriken mikroorganizmalar tarafından başlatılan multifaktöriyel bir hastalıktır.[1] Periodontitis, gram negatif anaerobik veya fakültatif bakterilere karşı inflamatuar hücreler ve onların ürettiği sitokinler vasıtasıyla gelişen ve konak cevabı sonucu oluşan alveoler kemik rezorpsiyonu, bağ dokusu yıkımı ve ataçman kaybı ile karakterize bir hastalıktır.[1-3]

Sitokinler, periodontal hastalığın immün cevabının bütün evrelerinde anahtar role sahiptir.[4, 5] Sitokinler arasında en çok bağlantılı olan pro-inflamatuar sitokinler interlökin 1 beta (IL-1β) ve tümör nekroz edici faktörü alfa (TNF-α)'dır. Bu sitokinlerin ikisi de periodonsiyumdaki doğal immün cevapların başlangıcında, düzenlenmesinde ve daimi hale gelmesinde anahtar rol oynayarak vasküler değişikliklere sebep olurlar ve subgingival bakteriler varlığında normal immün cevabın bir parçası olarak nötrofiller gibi efektör hücrelerin periodonsiyuma göçünü sağlarlar.[6]

Genel olarak, kemik kaybının altında yatan temel nedenlerin osteoblast ve osteoklast aktiviteleri ve bakteri ürünleri ve inflamatuar sitokinler arasındaki dengenin bozulmasının olduğu kabul edilmektedir.[7]

Periodontitis, periodontal hastalıkların en yaygın görülen formudur ve periodonsiyumda meydana gelen ataçman ve alveolar kemik kaybı epizodik karakterlidir. Periodontitis, plak ve diş taşı birikimi ile ilişkilidir. Hastalığın ilerleme hızı normal konak-bakteri ilişkisini etkileyebilen lokal, sistemik veya çevresel faktörlerden

etkilenmektedir. Dişlere bağlı anatomik faktörler, dental restorasyonlar ve uygulamalar gibi lokal faktörler plak birikimini, diabetes mellitus ve HIV enfeksiyonları gibi sistemik hastalıklar konak savunmasını ve sigara kullanımı, stres gibi çevresel faktörler de plak birikimine karşı gelişen konak cevabını etkileyebilir.[8] Periodontitiste kemikte meydana gelen kayıp, diş kaybından sorumludur. Kemik kaybının önlenmesi periodontal hastalığın tedavisinde anahtar klinik öneme sahiptir. Kemik yıkımı mikrobiyal problemlere karşı konak immün ve inflamatuar cevap ile ilişkilendirilmektedir. Kemik yıkımına, konakçı bağışıklık ve mikrobiyal mücadeleye inflamatuar yanıt aracılık eder. TNF-α, IL-1β, IL-6 ve prostoglandin E2 (PGE2), inflamatuar osteoliz durumlarında osteoklast aktivitesini de teşvik eder.[7]

Yıkıcı inflamatuar periodontal hastalıkların patojenik süreçleri, subgingival plak mikroflorası ve spesifik patojenlerden türetilen lipopolisakkaritler gibi faktörler tarafından tetiklenir. Bunlar konakçı inflamatuar ve bağışıklık hücresi etkileri ile yayılır ve T ve B hücrelerinin aktivasyonu, Th1-Th2-Th17 düzenleyici ekseninin düzenlenmesi yoluyla adaptif bağışıklık tepkisini başlatır.[7]

Periodontal tedavi ile mikrobiyal etyoloji ve periodontitisle ilgili risk faktörlerini kontrol altına alarak, enfeksiyonun ilerleyişini durdurmak ve hasar görmüş dokuların sağlıklı durumlarına geri dönmeleri amaçlanmaktadır.[9]

Yeterli kan temini, kemik iyileşmesinde ve kas-iskelet sistemi dokusunda kemik yenilenmesi için kritik öneme sahiptir.[10] Yeni damarlanma, yüksek derecede metabolik olarak aktif kemiğe oksijen ve besinleri getirir ve inflamatuar hücreler ve kıkırdak ve kemik öncü hücrelerinin bölgeye ulaşması için bir yol görevi görür. Anjiyogenez, kan damarı büyümesini indüklemek için inflamatuar hücreler ve stromal hücreler tarafından

üretilen çeşitli büyüme faktörleri, özellikle vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tarafından düzenlenir.[10]

EPO, % 60 protein ve % 40 karbonhidrattan oluşan, 165 aminoasit içeren 30 kDa ağırlığında glikoprotein yapısında, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve sitoprotektif etkileri olan hematopoezden sorumlu hormondur.[11] Ayrıca yapılan hayvan deneylerinde EPO'nin kemik rejenerasyonu üzerinde pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir. Kemik iyileşmesi ve rejenerasyon modellerinde EPO ile indüklenen osteogenezis, in vitro olarak gözlenen osteoblast proliferasyonunun ve farklılaşmasının doğrudan uyarılmasına atfedilmiştir.[12]

Çalışmamızın amacı, ratlarda deneysel olarak oluşturulan periodontitis üzerine sistemik EPO uygulamasının kemik kaybı üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık, oral hastalıkların küresel yüküne önemli ölçüde katkıda bulunur ve çeşitli kronik hastalıklarla ortak risk faktörlerini paylaşır. Son zamanlarda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya çapında periodontal hastalıkların kontrolünün güçlendirilmesinin önemini vurguladı.[13]

### 2.1.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflaması

En kaba anlamıyla 'periodontal hastalık' terimi hem gingivitis hem de periodontitis anlamına gelir. Avrupa periodontoloji federasyonu (APF) ve Amerikan periodontoloji akademisi (APA) yaptıkları ortak bir çalışma ile 1999 yılındaki periodontal hastalık sınıflamasını değiştirmişler ve 'Periodontal ve Periimplant Hastalıklar ve Durumların Sınıflaması 2017' başlığı ile yeni bir sınıflama tanımlamışlardır (Tablo 2.1).[14]

**Tablo 2.1.** Periodontal ve peri-implant hastalıklar ve durumların sınıflaması 2017.

**A. Periodontal Hastalıklar ve Durumlar**

**1. Periodontal Sağlık, Gingival Hastalıklar ve Durumlar**
- Periodontal Sağlık ve Gingival Sağlık
- Gingivitis (Biyofilm tarafından indüklenen)
- Gingival Hastalıklar (Biyofilm tarafından indüklenmeyen)

**2. Periodontitis**
- Nekrotizan Periodontal Hastalıklar
- Periodontitis
- Sistemik Bir Hastalığın Bulgusu Olarak Periodontitis

**3. Periodonsiyumu Etkileyen Diğer Durumlar**
- Periodontal Destek Dokuları Etkileyen Sistemik Hastalıklar ve Durumlar
- Periodontal Abseler ve Endodontik-Periodontal Lezyonlar
- Mukogingival Deformiteler ve Durumlar
- Travmatik Oklüzal Kuvvetler
- Diş ve Protez İlişkili Faktörler

**B. Periimpalnt Hastalıklar ve Durumlar**
- Periimplant Sağlık
- Periimplant Mukozitis
- Periimplantitis
- Periimplant Yumuşak ve Sert Doku Yetersizlikleri

Periodontal hastalıklar, insanları yüzyıllardır etkilemiş en yaygın kronik hastalıklar arasındadır.[15] Dünya populasyonunun %60-90'ini etkileyen bu hastalıklar[16] yetişkinlerde görülen diş kaybının en önemli sebeplerinden birisidir.[17]

Periodontal hastalığın, subgingival ortamda biyofilmin gelişmesinden, sosyal ve alışkanlık faktörlerinden ve hepsinin konakçının altta yatan bağışıklık ve inflamatuar tepkileri ile modüle edildiği ve kontrol edildiği heterojen etiyolojilere sahip olduğu açıktır.[18-20]

### 2.1.2. Gingivitis

Gingivitis, dişetinin inflamatuar bir durumudur ve dişler yüzeyinde biriken mikrobiyal dental plağa (MDP) karşı doğrudan bağışıklık tepkisidir. Gingivitis, sigara içme, bazı ilaçlar, ergenlik ve hamilelikte meydana gelen hormonal değişiklikler gibi çeşitli faktörlerle modifiye olur.[21]

Gingivada 'Dental plak biyofilm tarafından indüklenmeyen gingival hastalıklar' ve 'Dental plak tarafından indüklenen gingivitis' olmak üzere 2 geniş kategoride gingival hastalık görülür. Dental plak biyofilm tarafından indüklenmeyen gingival hastalıklar bakteriyel plağın sebep olmadığı ve dolayısıyla plağın eliminasyonu ile çoğu kez düzelmeyen bir dizi durumu kapsar. 'Dental plağın indüklediği gingivitis' bozulmamış periodonsiyum üzerinde gelişebileceği gibi azalmış periodonsiyum (non-periodontitis hastası ya da stabil periodontitis hastası) üzerinde de gelişebilir (Tablo 2.2,2.3,2.4).[22]

**Tablo 2.2.** Bozulmamış periodonsiyumda klinik sağlık ve gingivitis koşulları

| **Bozulmamış Periodonsiyum** | **Sağlıklı** | **Gingivitis** |
|---|---|---|
| **Ataçman kaybı** | - | - |
| **Sondalama derinliği(Psödocep hariç)** | ≤3mm | ≤3mm |
| **Sondalamada kanama** | <%10 | >%10 |
| **Radyolojik kemik kaybı** | - | - |

**Tablo 2.3.** Azalmış periodonsiyumda klinik sağlık ve gingivitis koşulları

| **Azalmış Periodonsiyum**<br><br>**(Non periodontitis)** | **Sağlıklı** | **Gingivitis** |
|---|---|---|
| **Ataçman kaybı** | + | + |
| **Sondalama derinliği(Psödocep hariç)** | ≤3mm | ≤3mm |
| **Sondalamada kanama** | <%10 | >%10 |
| **Radyolojik kemik kaybı** | +/- | +/- |

**Tablo 2.4.** Stabil periodontitis durumunda klinik sağlık ve gingivitis koşulları

| **Tedavi Edilmiş (Stabil) Periodontitisli Hasta** | **Sağlıklı** | **Periodontitis Hikayesi Olan Gingivitis Hastası** |
|---|---|---|
| **Ataçman kaybı** | + | + |
| **Sondalama derinliği (Psödocep hariç)** | ≤4mm ( 4mm veya daha derin kanamalı cep olmayacak ) | ≤3mm |
| **Sondalamada kanama** | <%10 | >%10 |
| **Radyolojik kemik kaybı** | + | + |

### 2.1.3. Periodontitis

Periodonsiyumun dişeti dışındaki diğer bileşenlerinin de etkilendiği ileri periodontal yıkım durumudur. Kronik inflamatuar bir hastalık olup, başarı ile kontrol edilebilmektedir.[23]

Kronik inflamasyon, enfeksiyona ve / veya diğer tetikleyicilere yanıt olarak ortaya çıkan ve doku hasarına yol açan karmaşık bir biyolojik süreçtir.[24]

Periodontitis, hem oral mikrobiyota hem de doğal ve kazanılmış bağışıklığın disbiyozunu içeren pro-inflamatuar olaylarla karakterize bir periodontal hastalıktır.[25]

Periodontitis stabil kalabildiği gibi (remisyon) alevlenme (exacerbation) dönemlerine de girebilir. Stabil bir periodontitis hastası periodontitisin nüks etmesi açısından (rekürrens) bir gingivitis veya sağlıklı bireyden daha yüksek bir risk taşır.[23]

Evreleme kabaca hasarın boyutu ve geçmişi ile ilgili bir değerlendirmedir. İlk olarak klinik ataçman kaybı (KAK) kullanılarak belirlenmelidir, mevcut değilse radyolojik kemik kaybı (RKK) kullanılmalıdır. Öncelikle periodontitisle ilişkili diş kaybı hakkındaki bilgiler -eğer mevcutsa- evre tanımını değiştirebilir. Bu kompleks faktörlerinin yokluğunda bile durum böyledir. Komplekslik faktörleri, evreyi daha yüksek bir evreye kaydırabilir, örneğin, furka tutulumu sınıf II veya III, KAK'dan bağımsız olarak Evre III veya IV'e kaydırabilir. Evre III ve Evre IV arasındaki ayrım öncelikle komplekslik faktörlerine dayanmaktadır. Örneğin, yüksek düzeyde bir mobilite ve/veya posterior diş kaybına bağlı kapanışın çökmesi, Evre IV tanısını işaret eder. Bununla birlikte, verilen herhangi bir durum için, komplekslik faktörlerinin sadece bir kısmı olmayabilir, genel olarak, teşhisin daha yüksek bir evreye kaydırılması için sadece bir komplekslik faktörü alınır. Bu vaka tanımlarının, en uygun klinik tanıya ulaşmak için sağlam klinik değerlendirme ile uygulanması gereken kurallar olduğu vurgulanmalıdır. Tedavi sonrası hastalar için KAK ve RKK hala primer evre belirleyicileridir. Eğer bir evre kompleksite faktörü (faktörleri) tedavi ile ortadan kaldırılırsa, asıl evre komplekslik faktörü, bakım fazı yönetiminde her zaman göz önünde bulundurulması gerektiğinden, aşama daha düşük bir aşamaya gerilememelidir (Tablo2.5).[23]

**Tablo 2.5.** Periodontitisin evreleri

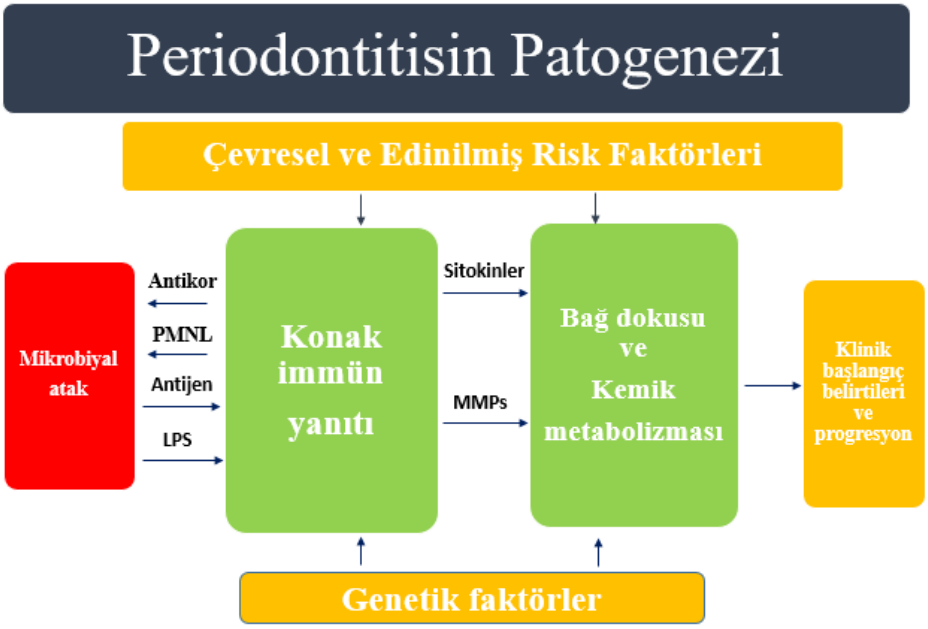
| **Periodontitis Evreleri** | | **Evre I:**<br>**Hafif periodontitis** | **Evre II:**<br>**Orta periodontitis** | **Evre III:**<br>**Şiddetli periodontitis (Ek diş kaybı potansiyeli olan )** | **Evre IV:**<br>**Şiddetli periodontitis (dentisyon kaybı potansiyeli olan )** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Şiddet** | **En fazla kaybın olduğu dişte interdental KAK** | 1-2 mm | 3-4 mm | ≥ 5mm | ≥ 5mm |
| | **RKK** | Koronal üçlü<br>(<%15) | Koronal Üçlü<br>(%15-%33) | Kökün yarısından fazla | Kökün yarısından fazla |
| | **Diş kaybı** | Periodontal kaynaklı diş kaybı yok | | Periodontitise bağlı diş kaybı<br>≤4 diş | Periodontitise bağlı diş kaybı<br>≥5 diş |
| **Kompleks oluşu** | **Bölgesel özellikler** | Max.SD≤4mm<br>Genelde horizontal kemik kaybı | Max.SD ≤5mm<br>Genelde horizontal kemik kaybı | Evre II'ye ek olarak:<br>SD≥ 6mm<br>Vertikal kemik kaybı ≥ 3<br>Furka tutulumu Sınıf II veya III<br>Orta şiddette kret kaybı | Evre III'e ek olarak:<br>Kompleks rehabilitasyon ihtiyaç nedenleri:<br>Çiğneme yetersizliği, Sekonder oklüzal travma (mobilite derecesi≥2), Şiddetli kret harabiyet, Posterior diş kaybına bağlı kapanışın çökmesi, dişlerde yer değiştirme, Ön dişlerde öne doğru açılma, Karşılığı olan 10 dişten toplam 20 dişten az diş varlığı |
| **Boyut ve yayılım** | **Tamamlayıcı olarak evreye ekle** | Etkilenmiş diş sayısına göre dişlerin %30'undan azı etkilendiğinde lokalize, daha fazlası genel veya kesici-molar tiplemesi olarak evreye ilave edilecek | | | |

Derecelendirme hastalığın ve tedavinin olası seyri üzerinde bir değerlendirmedir. Temel kriterler ya direkt ya da indirekt progresyon kanıtlarıdır. Uygun olduğunda, direkt kanıt kullanılır; yokluğunda indirekt tahmini, en çok etkilenen diş veya olgu sunumunda yaşın bir fonksiyonu olarak kemik kaybı kullanılarak yapılır (kök uzunluğunun yüzdesi olarak ifade edilen radyografik kemik kaybı, hastanın yaşına bölünür, RKK/yaş). Klinisyenler başlangıçta B dereceli hastalığı ele almalıdır ve eğer varsa, A veya C derecesine doğru kayması için belirli kanıtlar aramalıdırlar. Derece, progresyon kanıtlarına dayanarak kurulduğunda, risk faktörlerinin varlığına bağlı olarak modifiye edilebilir (Tablo 2.6).[23]

**Tablo 2.6.** Periodontitisin dereceleri

| **Periodontitis Derecesi** | | | **Derece A:** **Yavaş hızda ilerleme** | **Derece B:** **Orta hızda ilerleme** | **Derece C:** **Hızlı ilerleme** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primer kriter** | **Direkt progresyon kanıtı** | Longitudinal data (RKK veya KAL) | 5 yıldan fazla kayıp yok | <2mm<br>5 yıldan fazla | ≥2mm 5 yıldan fazla |
| | **İndirekt progresyon kanıtı** | % Kemik kaybı/yaş | <0.25 | 0.25-1 | >1 |
| | | Fenotip | Düşük düzeyde yıkımı olan fazla biyofilm birikintileri | Biyofilmle uyumlu yıkım | Plak birikimi ile orantısız fazla hasar. Hızlı progresyon ve/veya erken başlangıçlı hastalık dönemlerini düşündüren spesifik klinik modeller(örn. Molar-kesici paterni, standart tedaviye beklenen yanıtın olmaması) |
| **Dereceyi değiştirebilecek özellikler** | **Risk faktörleri** | Sigara | - | <10sigara/gün | ≥10sigara/gün |
| | | Diyabet | - | HbA1c<7 | HbA1c≥7 |

Periodontitis, MDP'ta bulunan bakteriler nedeniyle dişin destek dokularında meydana gelen inflamatuar bir hastalıktır. Bu hastalığın sonucunda dişetinde inflamasyon, cep oluşumu, klinik ataçman ve alveolar kemik kaybı meydana gelir.[8] MDP, periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesindeki en önemli etiyolojik faktördür. MDP'ta bulunan patojenler tarafından salgılanan proteolitik enzimler dokularda yıkıma sebep olur.[26] Aynı zamanda toksin ve lipopolisakkarit gibi patojen ürünlerinin de konak hücre gruplarını uyarmasıyla yıkıcı enzimler salgılatabilir ya da lenfosit ve makrofajlardan sitokin salgılanmasıyla immün cevabın tetiklenmesi sonucunda yıkıma sebep olabilir (Şekil 2.1).[26]




**Şekil 2.1.** Periodontitisin patogenezi

MDP, dişe yapışan biyofilmin form kazanmasıyla oluşan yumuşak eklentilerdir. Biyofilm, öncelikle diş-bakteri etkileşimiyle oluşur. Biyofilm tabakası bakteri ve antimikrobiyal ajanlar arasında bariyer görevi görür. Bu yüzden biyofilmin zor bir terapötik hedef olduğu bilinir.[27] MDP; organik ve inorganik olmak üzere iki tür bileşen içermektedir. Organik bileşenler: tükürük, dişeti oluğu sıvısı (DOS) ve bakteri ürünlerini

kapsar. İnorganik bileşenler ise: glikoproteinler, polisakkaritler (dekstran baskın), proteinler (albumin vb.) ve lipitleri içerir.[28]

Pelikıl üzerine öncelikle *Actinomyces* ve *Streptococcus* türleri tutunur. Actinomyces viscosus fimbriya adı verilen adezinleri yardımıyla dental pelikılın prolinden zengin proteinlerine tutunur.[29]

Kronik inflamasyon, sitokin ağlarındaki etkileşimlere atfedilen çeşitli mediyatörler tarafından yönlendirilir. Sitokinler pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar gruplara ayrılabilir ve nispi konsantrasyonları arasındaki dengesizlikler periodontitiste doku tahribatına yol açabilir.[30, 31] IL-lα, IL-lβ, TNF-α, IL-6 ve IL-17 dahil olmak üzere pro-inflamatuar sitokinler akut ve kronik inflamasyon ve doku hasarına katkıda bulunurken, IL-10 gibi sitokinler tarafından antagonist etkileri olan ikinci bir grup oluşur.[30]

Lipid mediatörleri, büyüme faktörleri veya kemokinler gibi diğer mediyatörler de inflamasyonun devam etmesinde önemli bir role sahiptir.[32, 33] Diyetten sitokinlere kadar çeşitli potansiyel tedaviler, inflamasyonu baskılayabilen daha ileri araştırmalar için gereklidir.[34] Sitokin bazlı tedavi stratejilerinin hem periodontitisi hem de sistemik sağlığı iyileştirme potansiyeli vardır.[35]

### 2.2. Sitokinler

Sitokinler, hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanan ve değiştirilmiş gen regülasyonu ile hücrede fenotipik değişikliklere yol açan hücre içi sinyalleşme kaskadlarını başlatan çözünebilir proteinlerdir.[4]

Sitokinler kendi ekspresyonlarını otokrin veya parakrin tarzında indükler ve çok sayıda hücre tipi üzerinde pleiotropik etkilere sahiptir. Periodontal hastalık da dahil olmak üzere inflamasyonda temel rol oynarlar.[36]

Bir patojene maruz kaldığında ortaya çıkan bağışıklık tepkisinin türü, hastalığa karşı direncin veya duyarlılığın belirlenmesinde hayati öneme sahiptir. Lokal olarak indüklenen sitokinlerin önemi, yakın bölgedeki hücrelerin fonksiyonu üzerindeki farklı etkileri nedeniyle çok önemlidir, bu da daha sonra yanıtın seyrini ve dolayısıyla belirli patojene karşı direnci veya duyarlılığı belirler.[37]

Sitokinler, giderek artan sayıda hastalığın immünopatolojisinde büyük öneme sahiptir ve "uygun" sitokinlerin üretimi, koruyucu bağışıklığın geliştirilmesi için gereklidir. "Uygunsuz" sitokinler ortaya çıkarsa, yıkıcı veya ilerleyici hastalık ortaya çıkabilir.[38]

Sitokinler, farklı efektör hücrelerin üretimi ve aktivasyonu üzerinde büyük etkisi olan hücre regülatörleridir.[39] Sitokinler, bağışıklık ve inflamasyonun başlangıcı ve efektör aşamalarında yer alan düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir, burada yanıtın genliğini ve süresini düzenlerler. Genellikle geçici olarak üretilirler ve son derece güçlüdürler. Ayrıca pikomolar konsantrasyonlarda etki ederler ve genellikle nispeten düşük sayılarla eksprese edilen spesifik hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşirler. Sitokinler ilk aşamada bir ağda birbirlerini uyararak etkileşirler; ikinci aşamadaysa hücre yüzey reseptörlerinin transmodülasyonunu sağlarlar ve üçüncü aşamada hücre fonksiyonu üzerinde sinerjistik, aditif veya antagonistik etkileşimler gösterirler.[39]

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, hem komensal hem de patojen olan tüm kolonize mikropları tanır ve bunlara yanıt verir. Komensal bakterilerin konakçı bağışıklığını hazırlamak ve doku bütünlüğünü korumak için periodonsiyumda gerekli düşük seviyeli sitokin tepkisini uyardığına dair güçlü kanıtlar vardır ve bağışıklık tepkisi, patojenik bakterilerin baskın olduğu plağın mikrobik bileşimindeki değişikliklere yanıt

olarak çoğaltılır.[40] 1976'da IL-2'nin keşfinden bu yana, bağışıklık hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma fonksiyonları için gerekli olan fazla sitokin keşfedilmiştir.[41]

### 2.2.1. İnterlökin 1

Adından da anlaşılacağı gibi, tarif edilen ilk interlökin olan IL-1, birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. 1980'lerin ortalarında moleküler tanımlanmasından önce, IL-1, yıllarca çeşitli biyolojik aktiviteleri tanımlayan farklı isimler altında (lökosit endojen mediyatörü, hematopoietin-1, endojen pirojen, katabolin ve osteoklast aktive edici faktör (OAF) gibi) incelenmiştir. Daha sonra IL-1-α, -β ve reseptör antagonist olmak üzere üç tip olarak belirlenmiştir. Bunların doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerindeki önemli rolleri ortaya çıkmıştır.[42]

Seksen beş yılında, OAF saflaştırıldı ve amino terminal sekansı, IL-1β'ninkiyle aynı olduğu belirlendi ve IL-1β'nın uyarılmış periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH'ler) tarafından üretilen OAF aktivitesine sahip ana protein olduğu sonucuna varılmıştır.[43] Daha sonra IL-lα ve IL-1β'nın rekombinant formlarının, kemik rezorpsiyonu, ateş ve prostaglandin sentezinin indüksiyonu gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu doğrulanmıştır.[44]

Hedef hücreler üzerinde IL-1 sinyali, spesifik bir reseptör olan tip I IL-1 reseptörüne (IL-1RI) bağlandıktan sonra gerçekleşir.[45] IL-IRI ağırlıklı olarak lenfositler, fibroblastlar, keratinositler ve hepatositler üzerinde eksprese edilir.[46] IL1 / IL-1RI bağlanmasından sonra mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) veya nükleer faktör-kappa B (NF-κB) yolları, IL-1 reseptörü ile aktifleştirilen protein kinazın (IRAK) fosforilasyonu yoluyla etkinleştirilir. IL-1β, ayrıca diğer mediyatörlerin (TNF-α, IL-6, MMP vs.) üretilmesini indüklemekle de görevlidir.[47]

IL-1β'nın periodontal hastalık patogenezinde, genellikle tedaviden sonra konsantrasyonları azalmış, dişeti biyopsi örneklerinde ve DOS'da düşük seviyelerde saptanması nedeniyle önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır.[48]

Yapılan deneysel periodontitisli hayvan çalışmalarında, IL-1β periodontal dokularda artmasıyla inflamasyonun ve doku yıkımının arttığı tespit edilmiştir.[49]

IL-1β, matriks metalopreteinaz (MMP)'ların uyarılması yoluyla güçlü bir kemik rezorpsiyonu ve bağ dokusu yıkım indükleyicisi olarak doğrulanmıştır.[50]

### 2.2.2. İnterlökin 6

IL-6, iltihaplanma, bağışıklık yanıtı ve hematopoez üzerinde pleiotropik etkiye sahip çözünür bir mediyatördür. Enfeksiyonlara ve akut faz yaralanmalarına yanıt olarak derhal ve geçici olarak ekprese edilir. Bu ekspresyon bir alarm sinyalini tetikler ve strese karşı konak savunma mekanizmalarını etkinleştirir. Ekspresyonun transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesine rağmen, IL-6'nın düzensiz sürekli sentezi kronik inflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etkiye sebep olur.[51]

IL-6, iltihaplanmanın ilk aşamasında lokal bir lezyonda sentezlendikten sonra, kan dolaşımı yoluyla karaciğere geçer, ardından C-reaktif protein (CRP), amiloid A (AA), fibrinojen, haptoglobin ve α1-antimimotripsin gibi çok çeşitli akut faz proteinlerinin hızlı indüksiyonu gerçekleşir.[52] Öte yandan, IL-6 fibronektin, albümin ve transferrin üretimini azaltır.[53]

IL-6 kemik iliği stromal hücrelerinde üretildiğinde, osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonu için vazgeçilmez olan RANKL'ı uyarır ve bu da kemik rezorpsiyonuna ve osteoporoza yol açar.[54]

IL-6, membrana bağlı IL-6 reseptörünü (IL-6R) bağlar ve membrana bağlı glikoproteinin 130'un (GP130) homodimerizasyonu ile sitoplazmik sinyali aktive eder.[55] Bu olay GP130 üzerinde farklı hücre içi tirozin kalıntılarını fosforile eden Janus kinazları (JAK) aktive eder.[56] Fosforile GP130, iki farklı sinyalleme kaskadı için bir yerleşme bölgesidir: sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)-3 ve MAPK'nın aktivatörü (klasik IL-6 sinyal yolu).[57] Ek olarak, GP130 eksprese eden hücreler, IL-6R'nin yokluğunda bile, bir IL-6 ve çözünebilir IL-6 reseptörü (sIL-6R) ile uyarılabilir.[58] IL-6'ya bağlandığında, sIL-6R bir agonist olarak hareket edebilir ve lenfositler ve makrofajlar gibi inflamatuar hücrelerin hücre yüzeyinden proteolitik bölünme ile salınır.[58]

IL-1β, insan gingival fibroblast (İGF)'larında belirgin bir şekilde IL-6 üretimini uyarır.[59] İGF'ler inflamasyonla ilişkili moleküller ile stimülasyondan sonra periodontitis lezyonlarında IL-6 üretir. Son zamanlarda, periodontitiste tipik bir patojen olan canlı Porphyromonas Gingivalis (PG)'in İGF'larında IL-6 üretimini arttırdığı bildirilmiştir.[60]

### 2.2.3. TNF-alfa

TNF-α, *in vitro* doğrudan sitotoksik / sitostatik etkilerine ve *in vivo* anti-tümör aktivitesinin sadece neoplastik hücreler üzerinde değil, aynı zamanda normal hücreler üzerinde de pleiotropik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.[61]

TNF-α, esas olarak makrofajlar tarafından salgılanır. TNFRSF1A / TNFR1 ve TNFRSF1B / TNFBR reseptörlerine bağlanabilir ve böylece işlev görür. Bu sitokin, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, lipit metabolizması ve pıhtılaşma dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. TNF-α, otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır.[62]

Monositler ve makrofajlar, TNF-α üreten güçlü hücre tipleridir. TNF-α'nın lokal hücresel etkileri, PMNL'lerin endotelyal hücrelere yapışmasını, PMNL'lerin

degranülasyonunu, fagositozun aktivasyonunu ve hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonunu içerir. TNF-α'nın osteoklastları IL-1 ile benzer şekilde aktive ederek kemik ve kıkırdak rezorpsiyonunu indüklediği bilinmektedir.[63]

TNF-α'nın miktarı, DOS ve hastalıklı periodontal dokularda yüksek seviyelerde gösterilmiştir ve deneysel çalışmalar, TNF-α'nın alveoler kemik rezorpsiyonunu indükleyen ve PGE2 ve MMP sekresyonunu indükleyerek periodontitisin patogenezinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir.[64]

### 2.2.4. Sitokinler ve Periodonsiyum

Kronik periodontal hastalıkta, MDP içindeki biyolojik olarak aktif maddeler, dişeti yumuşak dokularında ve periodonsiyumda lokal inflamatuar tepkiyi indükler.[65]

Biyofilm olgunlaşmasını takiben, periodontal ceplerde gelişen patojenik türler, bir dizi virülans faktörünü, antijeni veya konak savunma mekanizmalarından kaçan ve tipik olarak nötrofiller, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, T hücresi, immünoglobulin G (IgG) üreten B (plazma) hücrelerini içeren düzensiz inflamatuar etkileşimler yoluyla hücrelere ve dokulara zarar veren ürünler tarafından salınır.[66]

Periodonsiyumdaki istilacı patojenlere karşı fagositoz yeteneğine sahip nötrofiller, monositler, makrofajlar, vb. gibi çeşitli fagositlerin varlığı genellikle kısa ömürlüdür.[67] Bu, dirençli biyofilmin ve enfekte dokuların hücrelerinin oldukça eksik temizlenmesine sebep olur ve güçlü pro-inflamatuar mediyatörler ve sitokinlerin hüküm sürdüğü kalıcı bir kronik iltihapla sonuçlanır.[18]

IL-1β, IL-6 ve TNF-α, periodonsiyumdaki birçok hücre tipi tarafından üretilir; lökositler ve endotelyal hücreler üzerinde yapışma moleküllerinin yukarı regülasyonunu indükler, kemokinlerin üretimini ve iltihaplı tepkileri güçlendirir.[68] Periodonsiyumdaki pro-inflamatuar olaylar dizisi, burada LPS gibi bakteriyel ürünlerin, IL1-β ve TNF-α

ekspresyonunu indükler, bu da iltihaplanmayı artıran sitokinler, kemokinler ve siklooksijenaz (COX) ürünlerinin üretimini uyarır.[69] IL-1β, IL-6 ve TNF-α, periodontal iltihaplı dokularda MMP-1'i artırarak doku yıkımına neden olur.[70] MMP-1, iltihaplı periodontal dokuya ekstrasellüler olarak salınır ve kollajeni doğrudan parçalayarak veya fibrinolitik proteaz kaskadını aktive ederek bağ dokusunu tahrip edebilir. Aktifleştirilmiş MMP'ler ve endojen inhibitörler arasındaki dengesizlik, iltihaplı periodontal dokularda ekstrasellüler matrisin patolojik bozulmasına neden olur ve bu da diş kaybına neden olur.[71]

Önemli bir şekilde, biyofilmi farklı aşamalarda kolonize eden ve farklı patojenik potansiyele sahip bakteriler benzer konakçı yanıt yollarını etkiler. Bunun biyolojik sonuçları henüz tam olarak açıklanamamıştır, ancak bireysel türlerin bir dizi pro-inflamatuar sitokin (IL-1α, IL-1β, IL-6 ve IL-8) ve T hücresi uyarıcı sitokinlerle (IL-12, IL-23) ilişkili sinyalleme yolları üzerinde karakteristik etkileri olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu bilgilerin bir periodontal patogenez modeline nasıl entegre olduğu açık değildir, ancak bakteriyel çeşitliliği hücre içi sinyal yollarına ve sitokin salgılama profillerine bağlama potansiyeli olduğu açıktır.[72]

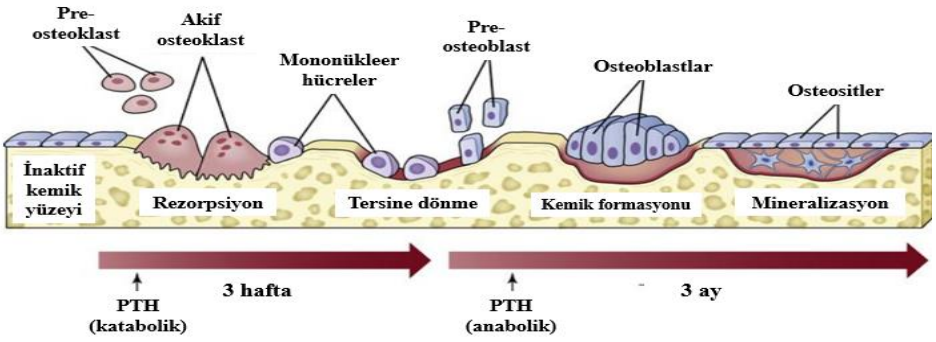
### 2.3. Periodontitiste Kemik Kaybı

Kemik, mekanik, beslenme ve hormonal etkilere yanıt olarak sürekli yenilenen, dikkat çekici derecede dinamik ve aktif bir dokudur. Sağlıklı bir yetişkinde osteoklastlar ile kemik rezorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından kemik oluşumu süreçleri arasında bir denge gereklidir.[73]

Kemik rezorpsiyonu iskelet ve serum kalsiyum seviyelerinin homeostazında önemli bir rol oynar ve uygun büyümenin, yeniden şekillenmenin ve iskeletin korunması için osteoblastların regülasyonu önemlidir.[73]

Alveoler kemik kaybı periodontitisin ilerlemesinin bir işaretidir ve önlenmesi periodontal hastalık tedavisinde önemli bir klinik sorundur. Kemik yıkımına, konakçı bağışıklık ve mikrobiyal mücadeleye inflamatuar yanıt aracılık eder.[7]

Dişeti dokusu ve kemik remodelling dengesini ve daha sonra periodontal kemik kaybının kontrolünü düzenleyen en az iki ana yol vardır. Birincisi, fizyolojik kemik remodelingi sırasında kemik oluşumu ve rezorpsiyonu arasında birleşen osteoblastlar ve stroma ile etkileşimleri içerir. Otokrin ve parakrin düzenlemeleri aracılığıyla, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi bir dizi büyüme faktörü, yeni kemik oluşumunu uyarmak için faaliyetlerini osteoblastlar üzerindeki reseptörleri aracılığıyla uygular. Paralel olarak, tiroid hormonu, paratiroid hormonu, insülin, progesteron, prolaktin, D3 vitamini, östrojenler ve retinoidler gibi endokrin hormon reseptörleri, lokal ve sinerjistik fonksiyonlara aracılık etmek için osteoblast yüzeylerinde de eksprese edilir (Şekil 2.2).[74]




**Şekil 2.2.** Kemik rezorpsiyon/apozisyon döngüsü

İkinci yol, lokal doku iltihabı ve travması veya sistemik saldırılar sırasında üretilen ve bu nedenle patolojik koşullar altında kemik kaybından (örneğin stres, iltihaplanma veya otoimmünite) sorumlu olan inflamatuar ve/veya osteoklastojenik sitokinler aracılarla ilgilidir. Bununla birlikte, bu homeostaz, artmış osteoklast sayısı ve aktivitesi sonucu geri dönüşümsüz kemik kaybı, morbidite ile sonuçlanan, kemik

rezorpsiyonunun dengesizleştiği veya düzensizleştiği periodontal hastalık ve romatoid artrit[75] gibi inflamatuar kemik hastalıklarında bozulur, bu da yaşam kalitesinin ve hatta yaşamı tehdit eden koşullara sebep olabilir.[76]

Kemik rezorpsiyonu ayrıca, osteoklastik rezorpsiyonun bir sonucu olarak ortaya çıkan iyonize kalsiyum ile doğrudan lokal olarak düzenlenir ve yeni kanıtlar endotelyal hücrelerin nitrik oksit ve endotelin dahil aracılarla da rol oynayabildiğini göstermiştir.[77]

Pre-osteoblastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik astar hücrelerinin tümü, kemik iliği stromundaki ilkel mezenkimal hücrelerden ve bağ dokusu kan damarlarına bitişik perisitlerden kaynaklanan osteojenik hücre çizgisinden kaynaklanır. Farklılaşmaları, osteokalsin, kemik sialoprotein (KSP), osteopontin (OPN) ve kollajen sentezini eksprese eden Osf2 / Cbfa geninin aktivasyonunu gerektirir ve bunu kemik morfogenetik proteini-2 (BMP-2) ve transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β)'dan stimülasyon takip eder.[78] Kemik oluşumundaki birincil rollerinin yanı sıra, osteoblastlar, kemokinleri, prostaglandinleri ve büyüme faktörlerini (örn. BMP, TGF-β, CSF-1, G-CSF, ve temel FGF) otokrin ve / veya parakrin aktivitesi ile eksprese eder.[79]

Osteoblastik hücreler, lokalizasyon, indüksiyon, stimülasyon ve rezorpsiyonun inhibisyonu yoluyla osteoklastların çevresel duyarlılığı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir.[80]

Osteoklastlar, hematopoietik kök hücrelerden türetilmiş, son derece spesifik ve hareketli kemik rezorbe edici hücrelerdir.[81] Osteoklastlar, mineralleşmiş kemiğin bozulmasından sorumludurlar ve bu nedenle normal iskelet büyümesi ve gelişimi, yaşam boyunca kemik bütünlüğünün korunması, yeniden modelleme yoluyla kalsiyum metabolizması ve homeostaz ve onarım için kritik öneme sahiptirler.[82]

Ortaya çıkan inflamatuar hücrelerin akışı, birincil kemik rezorpsiyon hücresi olan osteoklastlar yoluyla rezorpsiyonu destekleyen bir dizi sitokin, örneğin PGE2, IL-1β ve RANK-L üretir. Bu nedenle, patolojik inflamatuar koşullarda, uyarıcı inflamatuar hücre ürünleri osteoklast aktivitesini başlatır ve koruyucu ve yıkıcı süreçler arasındaki ince dengeyi bozar.[83] Buna periodontal hastalığın immünopatogenezi denir ve son on yılda bu alanda öncü araştırmalar "osteoimmunoloji" olarak adlandırılan yeni bir alan ortaya çıkarmıştır.[84]

Alveolar kemik kaybı için lokal osteoklast oluşumu ve stimülasyonu gereklidir. IL-1β, IL-6, IL-11, IL-17, TNF-α, TNF-β, TGF-β, kininler ve trombin gibi çoklu aracıların kemik rezorpsiyonunu uyarabildiği gösterilmiştir.[85] Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) / Koloni uyarucu faktör-1 (CSF-1), ODF/RANKL, IL, TNF gibi önemli faktörlere yanıt olarak ve osteokalsin içeren mineralize kemik parçacıkları ile temas halinde, hematopoetik öncüler, periferik kanda dolaşan monosit ve makrofaj türevi koloni oluşturan hücrelere farklılaşabilir ve son olarak olgun çok çekirdekli osteoklastlara dönüşürler.[86]

IL-1, TNF ve epidermal büyüme faktörünün (EGF) osteoblastları deaktive ettiği ve CSF-1 ve RANKL salınımını arttırdığı gösterilmiştir.[87] Osteoklast progenitörleri ve osteoblastlar / stromal hücreler arasındaki hücre-hücre etkileşimleri ve mineral faz; özellikle osteokalsin ile temas, terminal farklılaşmayı ve mononükleer hücre füzyonuna aracılık eder.[88] Hem CSF-1 hem de IL-1, osteoklast öncesi füzyonu uyarır.[89]

Rezorpsiyon aşamasında, osteoklastlar kemik matrisinin hem mineral hem de organik bileşenlerini gidermek için uyum halinde çalışırlar.[73] Rezorbe yüzeyin ayırt edici özelliği, Howship'ler veya rezorpsiyon lakünaları adı verilen taraklı erozyon görünümüdür.[81]

Rezorpsiyon fazı osteoklastın ömrü kadar yaklaşık 8-10 gün sürer. Rezorpsiyon lakünalarının tamamlanmasından sonra, osteoklast kemik yüzeyi boyunca hareket edebilir ve resorpsiyona yeniden başlayabilir veya apoptoz geçirebilir.[73]

Makrofajlar ve T lenfositler tarafından kaynaklanan kemik iltihabında lokal inflamatuar aracıların rolleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Doku üzerindeki efektör fonksiyonları, osteoblast ile uyarılan RANKL-üretim yolağı ile ilgili olarak yakın zamanda bildirildiği gibi doğrudan veya dolaylı olabilir. Periodontitiste alveolar kemik rezorpsiyonu, doğrudan veya dolaylı olarak hücresel inflamatuar infiltrat tarafından indüklenebilir.[86]

DOS, sadece dişeti sulkusunu sulamakla kalmayıp aynı zamanda ağız boşluğuna salınan karmaşık bir dizi protein bileşeni içerdiği gösterilmiştir.[90] Teşhis ve prognostik potansiyele sahip bu eksüda, periodontal kemik rezorpsiyonunun hücre dışı matris kaynaklı biyolojik belirteçlerinin erişilebilir bir kaynağıdır.[91]

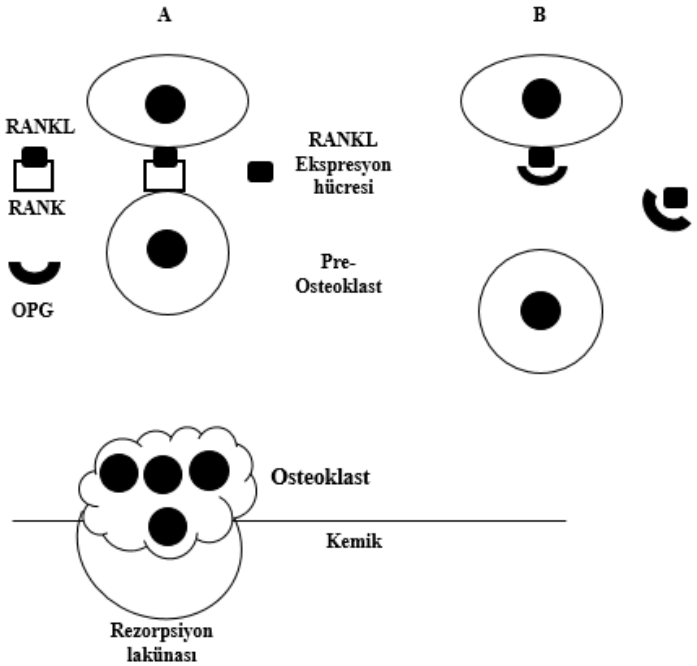
### 2.3.1. RANK, RANK-L ve Osteoprotegrin (OPG)

Osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, TNF ligandı ve reseptör süper ailelesinin üç üyesi tarafından modüle edilir: RANKL, RANK ve OPG. Bu üç peptidin tanımlanması, osteoklast farklılaşması ve aktivitesinin moleküler mekanizmalarını anlamamıza büyük katkı sağlamıştır.[83]

RANKL (nF-ligB ligandının reseptör aktivatörü), TNF süper ailesinin bir üyesidir (osteoklast farklılaşma faktörü olarak da bilinir: ODF, TRANCE ve TNFSF11). Osteoblastlar veya stromal hücreler tarafından bir membrana bağlı protein (mRANKL) veya çözünür formda (sRANKL) eksprese edilir. RANKL, osteoklast ve preosteoklast hücre yüzeyleri üzerindeki reseptörü RANK'a bağlandığında, çoğalmayı ve farklılaşmayı uyararak osteoklast oluşumunu teşvik eder.[92]

Tuzak reseptörü olan OPG, mRANKL'ı bağlayarak RANKL / RANK etkileşimleri ve osteoklast oluşumunu inhibe eden ve böylece uyarıcı hücre-hücre etkileşimini önleyen ve böylece osteoblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen hareketli bir proteindir. Bu nedenle, bu üç protein osteoblastların yönlendirdiği osteoklast farklılaşması için gereklidir ve osteoblastlardaki RANKL ve OPG arasındaki denge yeni osteoklast oluşumunu yönlendirir.[93]

Periodontal ligament ve dişeti fibroblastları dahil olmak üzere diğer yerleşik periodontal hücreler de kemik remodelasyonu ve rezorpsiyonunun düzenlenmesine katılırlar. Lökositler ve inflamatuar madiyatörler, osteoblastlar, periodontal ligament fibroblastları ve dişeti fibroblastları tarafından RANKL ve OPG ekspresyonunu etkileyen IL-1 ve PGE2 üretir. RANKL ayrıca aktifleştirilmiş T hücrelerinde eksprese edilir (Şekil 2.3).[94, 95]




**Şekil 2.3.** RANK, RANKL VE OPG mekanizması.

### 2.4. Deneysel Periodontitis

Ratlarda ve farelerde deneysel periodontitis modelleri, fizyolojik komplikasyonlardaki çeşitli biyolojik hipotezleri incelemek ve insan periodontitisinin radyografik, klinik, moleküler ve histolojik özelliklerini çoğaltmak için yararlı ve önemlidir. Hayvan periodontitis modelleri, hücrenin ve moleküler mekanizmaların yanı sıra hastalığın oluşması ve ilerlemesi sırasında yer alan biyolojik aracıların incelenmesine izin verir ve konakçı-mikrobiyal etkileşimler ve inflamasyon hakkında değerli bilgiler sağlar.[96] Bu noktada, ligatürle indüklenen periodontitis, toksinler, patojene bağlı moleküler paternler (PBMP'ler) ve mikrobiyal metabolizmanın ürünleri de dahil olmak üzere farklı virülans özelliklerine sahip hayvan türlerinde doğal olarak bulunan canlı mikropların katılımı nedeniyle periodontal araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır.[97]

Hayvanlarda periodontitisi indüklemek için kullanılan çeşitli yöntemler arasında en yaygın kullanılan model ligatür indüksiyonudur.[98] Mandibular veya maksillar molar dişlerin servikal bölgesi boyunca bir ipek ligatürün yerleştirilmesi, bakteriyel kolonizasyona yol açar, biyofilmin büyük birikimini uyarır, bu da apikal epitelyal göç ve kemik kaybı gibi klinik bir durumda gözlemlenenlere benzer hastalık semptomları ile sonuçlanır.[99]

Ligatürlerin kullanıldığı daha önce yayınlanmış çalışmalara göre, bağ dokusu ve kemik kaybı tahminen ratlarda ve farelerde 7-15 günlük bir süre zarfında meydana gelir. Bu özellik, ipek iplik çevresinde ve içinde bakteri türlerinin varlığından kaynaklanır, bu da hastalığın erken evrelerinde artmış kemik tahribatına yol açar.[99]

Daha önceki bir rapor, ligatürlerin steril sıçanlarda önemli bir kemik kaybına yol açmadığını ve diş çevresinde bakteri birikiminin hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol

oynadığını gösterdi.[100] Ancak, ligatür modelinin patogenezi sırasında travmatik hasar, özellikle rat modelleri kullanıldığında literatürde tarif edilmiştir.[101]

### 2.5. Eritropoetin

EPO, %60 protein ve %40 karbonhidrattan oluşan, 165 aminoasit içeren 30 kDa ağırlığında glikoprotein yapısında hematopoez den sorumlu hormondur. Çekirdeğin peptit terminalleri, reseptöre bağlanma yoluyla işlevselliğe aracılık ederken, dört karbonhidrat yan zinciri EPO'i kandaki bozulmaya karşı korur.[11]

Doğumdan önce karaciğer birincil üretim yeridir ve yetişkin yaşamındaki üretimin yaklaşık %10'unu oluşturur. Yetişkinlerde ise böbrek EPO'in birincil üretim bölgesidir.[11]

En iyi karakterize rolünde, renal tip I sitokin EPO, eritropoezin anahtar regülatörü olarak işlev görür. Böylece EPO, Fas Ligand (FasL)-Fas sinyallemesine müdahale ederek eritroid progenitör hücrelerin apoptozunu inhibe eder, böylece terminal eritroid farklılaşmasını sağlar. Olgun eritroid hücreler, temasa bağlı negatif geri besleme mekanizmaları ile olgunlaşmamış progenitörlerin üretimini baskılamak için FasL ve TNF ile ilgili apoptoz-indükleyici ligand (TRAIL) gibi apoptozu indükleyen ligandları yukarı doğru düzenler. Bunlar, eritroid gelişiminde temel transkripsiyon faktörü olan GATA1'in kaspazlarla bölünmesiyle sonuçlanır ve bu da olgunlaşmamış eritroid öncüllerinin düzenlenmiş apoptotik eliminasyonu ile sonuçlanır.[102, 103] Hem FasL hem de Fas ekspresyonunu aşağı modüle ederek EPO, dolaşımdaki kırmızı kan hücrelerinin (RBC) üretimini ve oksijen taşıma kapasitesini arttırır.[104]

Jak2-STAT-Bcl-2 yolları EPO'in koruyucu etkisinde rol alan temel sinyal iletim yollarıdır.[105] Kemik iliğindeki eritroid progenitör hücreler, hücre yüzeyindeki homodimerik EPO-R eksprese eder. EPO'in bağlanması JAK2 ve akış aşağı

fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B, MAP kinaz, protein kinaz C ve STAT sinyal yollarını aktive eder.[11]

EPO'de yüzyıllarca süren kapsamlı bir araştırmadan sonra, yapısı, üretimi ve hematopoetik etki şekli ayrıntılı olarak açıklanmış, fakat EPO'in temizlenmesi ve yıkımı henüz tam olarak anlaşılmamıştır.[11]

### 2.5.1. Eritropoetin'in Üretimi ve Yıkımı

Hipoksi üzerine, renal peritubüler fibroblastlar, oksijene duyarlı prolil hidroksilazlar (PH) yoluyla oksijen gerilimini azalttığında uyarılır ve bu da transkripsiyon proteini olan hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörü (HIF) yoluyla EPO gen ekspresyonunu arttırır ve daha sonra EPO'i dolaşım içine bırakır. Düşük oksijen gerilimine yanıt olarak EPO üretimini uyarabilen tek organ böbrek değildir. Görünüşe göre, kronik hipoksi, HIF'ne bağlı bir mekanizma ile epidermiste de algılanır. İç organlardan cilde kan akışının nitrik oksit (NO) aracılığıyla yeniden dağılımı böbrek EPO üretiminde ikincil bir artışla sonuçlanır.[106] Ayrıca gastrointestinal sistem, akciğer, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi gibi pek çok dokuda da EPO yapımı ve reseptörleri gösterilmiştir. Geçtiğimiz on yıllarda, EPO'in birçok dokuda da lokal olarak eksprese edildiği ve parakrin tarzda davrandığı iyi anlaşılmıştır.[107]

HIF, EPO ekspresyonunun kontrolü için gerekli olan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1α miktarı post-translasyonel olarak düzenlenirken, HIF-1β yapısal olarak ekprese edilir fakat regülasyonlarda katkısı olmadığı kabul edilir.[108] HIF-1 yolunun aktivasyonu yoluyla, gen transkripsiyon seviyesinde ve hem EPO hem de EPO-R üretiminde artış olur. Tüm HIF aile üyeleri (HIF-1, HIF-2 ve HIF-3), EPO ve EPO-R ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar. İskemik hasarı takiben ilk cevap HIF-1α yapımıdır. HIF-1 α; VEGF, glikolitik yol enzimleri gibi molekül ve

enzimlerin ekspresyonunda artışa neden olur.[109] İskemiye cevap olarak nötrofiller ve monositler iskemik alana hücum ederek TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 gibi pro-inflamatuar sitokinler salınmaya başlar. HIF-1α'nın doğrudan TNF-α salınımını arttırdığına dair yayınlar da mevcuttur. TNF- α'nın inflamatuvar olayları başlatıcı etkisini takiben salınan endotelin-1, PGE'ler, platelet aktive edici faktör (PAF) ile vasküler vazokonstriksiyona neden olarak glomerüler filtrasyon hızını (GFR) azaltmaktadır. Renal mezenkim hücrelerinden de TNF–α salınımı olduğu gösterilmiştir.[110]

EPO'in böbreği koruyucu etkisine TNF-α ve IL-6 gibi sitokin yapımının katılımının olup olmadığı henüz bilinmemektedir. EPO'in iskemik hasardan koruyucu etkisi bulunduğunu gösteren çalışmalar artmaktadır. EPO'in farklı doku ve hücrelerde iskemi-reperfüzyon (I/R) modellerinde uygulandığında önşartlanma benzeri etki yaratarak I/R hasarından koruyucu olduğu görülmüştür.[111] EPO'in akut böbrek yetmezliğinde (ABY), sisplatin ile oluşturulan akut tübüler toksisite modelinde [112] ve renal I/R hasarında anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve antioksidan etki göstererek koruyucu olduğu görülmüştür.[113]

EPO'in kandan temizlenmesi tam olarak anlaşılmamıştır, ancak EPO-EPO-R kompleksinin içselleştirilmesi ve bozulması yoluyla hem renal ve hepatik hem reseptör aracılı temizleme tarif edilmiştir. Son mekanizma, EPO'in temizlenmesinde hayati bir rol oynar. Dolayısıyla, EPO'in yarı ömrü, EPO'in reseptörüne afinitesine ve reseptör ekspresyonunun seviyesine bağlıdır. Karaciğerdeki bozulma, EPO'in şeker yan zincirlerinin bileşimine bağlıdır. Bu karbonhidratlar, galaktoz reseptörünün hepatositler üzerinde tanınmasını önler ve böylece hücre içi alım ve bozulmayı bloke eder. Bununla birlikte, yan zincirler kan akışında glikozidazlar ve proteinazlar tarafından yavaşça parçalanır ve daha sonra karaciğerde EPO bozulur.[11, 114]

Sağlıkta, kırmızı kan hücrelerinin yaklaşık % 1'i günlük olarak yenilenir ve EPO'in plazma seviyesi 4-30 IU / l arasında değişir, ancak anemik hastalarda 20.000 IU/l'ye kadar yükselebilir.[11]

Klinik öncesi hayvan deneyleri için ilgi çekici olan, memeliler arasında EPO'in DNA homolojisi yüksektir. Örneğin, insan EPO domuz EPO ile %80-82 oranında özdeştir ve delillerin bir araya getirilmesi organı rekombinant insan eritropoetin (rhEPO)'in memelilerde etkileri ortaya çıkarabildiğini açıklar.[115]

### 2.5.2. Eritropoetin İle İndüklenen Sinyal Sistemleri

RBC öncüllerinde, EPO'e eritropoetik cevap, bu sitokinin pikomolar konsantrasyonlarının EPO-R homodimerlerine bağlanması üzerine başlatılır. Bu, SRC homolojisi (SH)-2 alanları içeren proteinlerin bağlanmasını ve daha sonra JAK-2'nin ve STAT–5'in aktivasyonunu sağlar. Sonuç olarak, eritroid progenitörlerin apoptozu engellenirken, hemoglobin (HB) sentezi ve hücre döngüsü ilerlemesi teşvik edilir. STAT-5 yolağına paralel olarak, EPO-R homodimerler MAPK ve NF-kB yolaklarını aktive eder.[116]

Eritroid progenitörler dışındaki hücre tiplerinde EPO, EPO-R ve CD131'den oluşan bir reseptör, granülosit-makrofaj koloni uyarma faktörü (GM-CSF), IL-3 ve IL-5 tarafından paylaşılan beta ortak reseptör kullanır. Hangi tip hücrelerin fonksiyonel bir reseptör kompleksini eksprese ettiği hala tartışmalıdır, ancak çalışmaların çoğu parankimal, nöronal, bağışıklık ve neoplastik hücrelerin EPO'e duyarlı olduğunu göstermektedir. EPORβcR heteroreseptör kompleksinin aktivasyonu yüksek lokal EPO konsantrasyonları gerektirir, ancak STAT-5'in aktivasyonu dahil benzer sinyal transdüksiyon olaylarını kolaylaştırır. Bununla birlikte, EPO'in ekstrakropoietik etkilerinde başka sinyal yolları da bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla Jun Nterminal kinaz

(JNK) ve PI3K aktivasyonunu, MAPK yolunun aktivasyonunu ve NF-kB ailesi üyelerinin bağlanma aktivitesinin düzenlenmesini içerir.[117]

EPO, makrofajlar tarafından indüklenebilir NO sentaz (iNOS) yoluyla TNF-α, IL-6, IL12 / IL-23 alt birimleri ve NO gibi pro-inflamatuar faktörlerin oluşumunu engeller. Mekanik olarak, bu etkiler transkripsiyonel düzeyde aracılık eder, böylece EPO, NF-kB alt birimi p65'in IkB kinaz- IkB-α sinyali yoluyla aktivasyonunu azaltır, böylece NF-kB'nin sekanslarına bağlanma aktivitesini azaltır.[118]

EPO-R homodimerler ligand kaynaklı endositoz ve daha sonra JAK-2'ye bağlı bir mekanizma ile bozularak EPO-EPOR sinyallemesinin sonlandırılmasını ve böylece dolaşımdaki EPO seviyelerinin düzenlenmesini sağlar.[119]

### 2.5.3. Eritropoez Stimüle Edici Ajanlar (ESA'lar)

Seksen beş yılında, EPO'in nükleotit sekansının keşfi, klinik kullanım için rhEPO üretilmesini mümkün kılmıştır.[120]

Endojen EPO ve rhEPO, glikozilasyondaki küçük farklılıklar dışında aynıdır. RHuEPO biyolojik olarak doğal hormonla aynı özelliklere sahiptir ve günümüzde, özellikle kronik böbrek yetmezliği nedeniyle endojen EPO üretimi eksikliğinden kaynaklanıyorsa anemiyi tedavi etmek için kullanılır.[121]

EPO uygulamasının klinik uygulanabilirliği, daha uzun yarı ömürlü olan ESA'lar geliştirilerek arttırılmıştır. Glikozilasyon alternatifleri hem biyoyararlanımı ve EPO-R'ye afiniteyi hem de yarı ömürleri etkiler. Epoetin delta (Dynepo®) insan hücre hatlarında ve epoetin omega (Epomax®) bebek hamster böbrek hücrelerinde üretilir. Epoetin zeta'nın (Retacrit®, EPO biyobenzer) karbonhidrat bileşimi, endojen EPO'inkine benzerdir. İkinci kuşak ESA, darbepoetin alfa (Aranesp®), hiperglikozilasyon nedeniyle üç kat daha uzun bir yarı ömre sahiptir. Üçüncü nesil ESA'lar 130 saate kadar yarı ömre sahiptir.[122]

Seksen dokuz yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi, kronik böbrek yetmezliği nedeniyle yetersiz endojen EPO üretiminin neden olduğu aneminin tedavisi için rhEPO kullanımını onayladı. Onay, o zamandan beri geniş yelpazedeki endikasyonlara genişletildi, örneğin; kemoterapi veya HIV ile indüklenen anemi ve belirli ameliyat tipleri için planlanan hastalarda transfüzyon ihtiyacını azaltmak.[123]

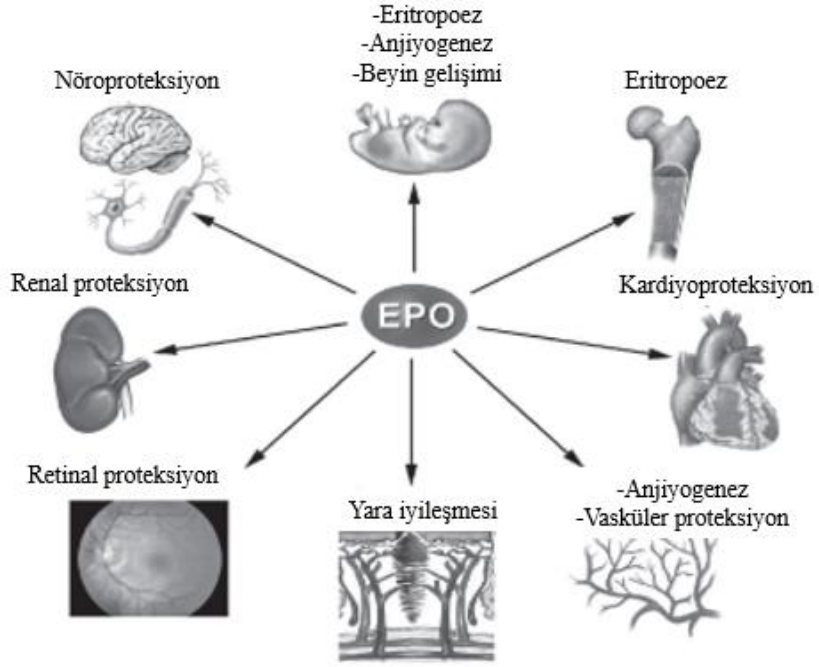
EPO üzerindeki çalışmalar, molekülün sialik asit içeren karbonhidrat içeriği ile serum yarı ömrü ve in vivo biyolojik aktivitesi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu, ancak reseptöre bağlanma afinitesi ile ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler, karbonhidrat içeriğinin, doğal olarak bulunmanın ötesinde artmasının, biyolojik aktivitesinin artmış bir moleküle yol açacağı hipotezine yol açtı. Bu hipotezi test etmek için hiperglisillenmiş rHuEPO analogları geliştirilmiştir. Darbepoetin alfa (5 N bağlantılı karbonhidrat zinciri (rHuEPO'dan iki tane daha fazla) içerecek şekilde tasarlanan yeni eritropoezis uyarıcı protein, NESP, ARANESPTM, Amgen Inc, Bin Oaks, CA) preklinik hayvan çalışmalarında değerlendirilmiştir. Artan sialik asit içeren karbonhidrat içeriğinden dolayı Darbepoetin alfa, artmış bir moleküler ağırlığa ve daha yüksek negatif yüke sahip olan, rHuEPO'dan biyokimyasal olarak farklıdır. RHuEPO ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 3 kat daha uzun serum yarı ömrüne sahiptir, in vivo potansiyeli daha yüksektir ve aynı biyolojik cevabı elde etmek için daha az sıklıkta uygulanabilir. Darbepoetin alfa şu anda anemi tedavisi ve insidansındaki azalma için insan klinik denemelerinde değerlendirilmektedir. Klinik kullanım için rHuEPO, güçlü in vivo biyolojik aktiviteye sahip izoformlar, iyon değişim kromatografisi, ters faz kromatografisi ve filtrasyon gibi hazırlayıcı yöntemler ile seçici olarak saflaştırılır.[122]

Darbepoetin alfa Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde üretilirler ve karbonhidratlar bakımından endojen EPO'den farklıdırlar. Yarı ömürleri yaklaşık 8

saattir. Birinci nesil rhEPO'in nispeten kısa yarı ömrü nedeniyle; epoetin alfa ve beta, anemik hastalar haftada birkaç kez EPO enjeksiyonlarına ihtiyaç duyarlar.[124]

### 2.5.4. Eritropoetin'in Hematopoetik Olmayan Fonksiyonları

Geçtiğimiz yirmi yılda EPO'in çeşitli dokularda pleiotropik etki gösterdiğine dair kanıtlar ortaya çıktı. Günümüzde EPO-R'nün endotel ve vasküler düz kasta salındığı ve bunun anjiyogeneze, daha hızlı yara iyileşmesine ve damar korumasına neden olduğu iyi bilinmektedir.[125, 126] Ayrıca, doku koruyucu ve anti-inflamatuar etkiler, çeşitli dokularda tarif edilmiştir. Diğer işlevler arasında EPO, vasküler salınımdan sonra nöroproteksiyon, miyokard enfarktüsü sonrası kardiyoproteksiyon ve böbrek hasarı sonrası renoproteksiyona neden olur (Şekil 2.4).[127]




**Şekil 2.4.** EPO'in hematopoetik olmayan etkileri

İnflamasyonun EPO tarafından inhibe edildiği öne sürülmüştür. Önerilen temel mekanizma, EPO'in, TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinleri antagonize etmesidir. Örneğin, TNF-α yaralanma merkezinde salınır ve apoptoz ve inflamasyonun çoğalmasına neden olarak çevredeki sağlıklı dokuya yayılır.[128]

Deneyler, homodimerik EPO-R'ne bağlanamayan EPO ile ilişkili moleküllerin, doku koruması sağlayabileceğini, ancak eritropoezi sağlayamayacağını göstermiştir. Bu reseptörle ilgili detaylar daha sonra iki EPO-R'nün sistein bağlantısı yoluyla kovalent bir şekilde iç içe geçmiş, antiparalel CD131'e bağlandığını gösterdiği yayınlanmıştır.[128]

Hematopoetik sistemden bilinen homodimerik EPO-R ile karşılaştırıldığında, bu reseptör, ligand EPO'i için düşük bir afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir. Doku koruyucu ve diğer pleiotropik eylemler bu nedenle eritropoezis uyarıcı eylemleri ortaya çıkarmak için gerekli olandan daha yüksek bir EPO dozu gerektirir.[128]

EPO-R / CD131 reseptör hipotezi, çeşitli dokularda test edildi. Çalışmalar, homodimerik EPO-R'ne bağlanamayan EPO türevli bileşenlerin pleiotropik etkilerini belgelemektedir, ancak sadece EPO-R / CD131 yoluyla etkilerine aracılık edebilmektedir.[128] Hematopoetik olmayan hücre içi sinyal yolakları, nitrik oksit üretimini ve JAK2, STAT3 / 5, PI3K / Akt ve MAPK yolakları yoluyla sinyalleşmeyi içerir.[129]

İki bin dörtte Brines ve ark., EPO'in pleiotropik etkilerine homodimerik EPOR yerine heterodimerik bir EPOR / CD131 reseptörü aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir.[130]

Brines tarafından bildirildiği gibi, bazı pleiotropik fonksiyonlar spesifik yolaklarla gerçekleşmiş olsa da, bu hücre içi sinyal yolaklarının çoğunun aktivasyonu çoğu zaman tam pleiotropik etki için gereklidir.[128] Bu yolların rolü ve net-pleiotropik etkiye olan katkıları daha fazla açıklığa ihtiyaç duymaktadır. Özellikle ilgi çekici olan JAK2, PI3K ve mTOR sinyalidir.[129, 131]

### 2.5.5. Eritropoetin'in Anti-inflamatuar Etkisi

EPO, eritroid, parankimal ve bağışıklık hücreleri üzerinde eksprese edilen iki ayrı reseptöre bağlanma üzerine eritropoietik ve bağışıklık modülatör etkileri olan çok fonksiyonlu bir sitokindir.[132]

Araştırmacılar, yararlı etkilerin kan akışındaki veya apoptozdaki değişikliklere değil, süperoksit dismutaz aktivitesinin korunmasına bağlı olduğunu ve EPO'in pleiotropik etkilerinin antioksidan ve antiinflamatuar özelliklerine bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.[133]

Önceki raporlar, inflamasyonun EPO direncinin en büyük bağımsız belirleyicilerinden biri olduğunu ve EPO tedavisinin inflamatuar mediatörler üzerindeki etkilerinin değerlendirmelerin yeterli olmadığını göstermektedir.[134]

Pro-inflamatuar sitokinler, EPO direncine neden olabilir ve eritroid progenitörlerin in vitro büyümesini inhibe edebilir.[135, 136] Ayrıca TNF-α ve IL-1, eritrosit zarlarına zarar verebilir ve eritrosit fagositozunu uyarabilir.[137, 138]

EPO, kronik inflamatuar bozukluklar ve bulaşıcı hastalıklarda güçlü bir antiinflamatuar sitokindir.[139, 140] EPO özellikle kimyasal doku hasarı, LPS stimülasyonu ve Salmonella enfeksiyonuna yanıt olarak pro-inflamatuar immün efektör hücrelerini aşağı regüle eder. Bununla birlikte, TGF-β, IL-10, IL-27, IL-35 ve adiponektin gibi antiinflamatuar aracıların ekspresyonu, en azından şimdiye kadar araştırılan fare modellerinde EPO tedavisi ile düzenlenememiştir.[118] Ek olarak EPO, bağışıklık hücresi farklılaşmasını ve çoğalmasını etkileyebilir ve inflamatuar koşullar altında ve *in vivo* kanser modellerinde T hücresi farklılaşması veya makrofaj polarizasyonu (M1'e karşı M2 fenotipi) açısından bu tür bağışıklık düzenleyici etkilerin belirlenmesi önemlidir.[141]

EPO'in birkaç sinyal iletim kaskadını etkilediği bilinmesine rağmen, EPO'in makrofajlara karşı anti-inflamatuar etkisi, NF-kB p65 alt birim aktivasyonunun inhibisyonuna ve daha sonra hedef gen ekspresyonunun aktivasyonuna kadar takip edilmiştir.[118] NF-kB / Rel proteinleri, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 ve IL-23 gibi birçok pro-inflamatuar sitokinlerin ve monosit kemoatraktan proteini (Mcp)-1, makrofaj enflamatuar

protein (Mip)-1a ve iNOS gibi kemokinler için önemli transkripsiyonel aktivatörleridir.[142]

### 2.5.6. Eritropoetin'in Kemik Üzerindeki Etkisi

Kemik iyileşmesi primer / kortikal veya sekonder / endokondral olmak üzere iki ana süreçte ortaya çıkabilir.[143] Primer kortikal iyileşme kırığın stabilitesi tam olduğunda gerçekleşir. İyileşme kortikal osteonal iyileşme ile karakterize ve kırık uçlarının kortikal kemik ile doğrudan kaynaşmasına yol açar. Sekonder iyileşme rijit olmayan fiksasyon durumunda meydana gelir ve hızlı bir şekilde trabeküler kemiğe dönüşen, kalsifiye olan ve yeniden şekillenen bir kıkırdak kallusu oluşumu ile sağlanır. Sekonder iyileşme embriyolojik kemik gelişimini hatırlatır ve hem intramembranöz hem de endokondral kemik oluşum modellerini içerir. Hem primer hem de sekonder kemik iyileşmesinde erken evreler, akut inflamatuar yanıtı ve anjiyogenez aktivasyonunu içerir.[144]

İlginç bir şekilde, EPO'in kemik anabolik etkisinin hem birincil hem de ikincil iyileşme modellerinde olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, EPO etkisinin kondrositlere bağlı olmadığını varsaymak olasıdır. Bu varsayım, EPO'in osteokondral bir defekt modelinde faydalı bir etkisi olmadığını gösteren bir rapor ile desteklenmektedir.[145]

Kemik iyileşmesi ve rejenerasyon modellerinde EPO ile indüklenen osteogenezis, *in vitro* olarak gözlenen osteoblast proliferasyonunun ve farklılaşmasının doğrudan uyarılmasına atfedilmiştir. Ek olarak, EPO'in diğer hücrelere etki ettiği ve dolaylı osteoblast stimülasyonuna yol açtığı tespit edilmiştir.[12]

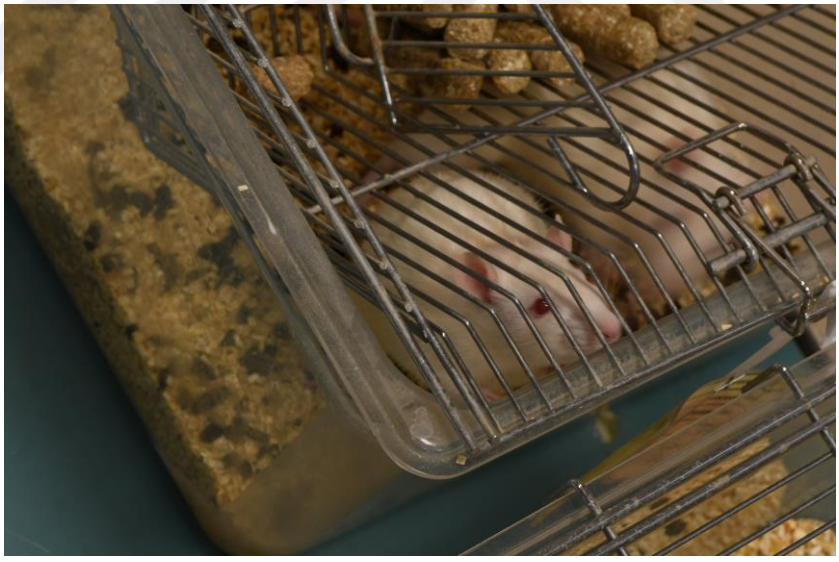
Farklı çalışmalar, bu tür dolaylı etkilere hematopoetik kök hücreler (HSC) ve / veya osteoklastların aracılık ettiğini göstermiştir. EPO'in HSC popülasyonunu arttırdığı [146] ve bu hücrelerde BMP-2 ekspresyonunu arttırdığı ve bunun da osteoblastların osteojenik farklılaşmasını uyardığı öne sürülmüştür.[147] Bu çalışmalar, EPO'in osteojenik

fonksiyonuna, en azından kısmen HSC'lerde salınan BMP-2'nin aracılık ettiğini göstermektedir. Komşu osteoklastların (ve / veya preosteoklastların), EPO'in osteojenik uyarıcı etkisine aracılık ettiği görünmektedir. Osteoklastik hücreler, osteoblast öncüleri üzerinde olan Efrin B4 reseptör (EphB4)'e bağlanarak osteoblast farklılaşmasını pozitif olarak düzenleyen bir birleştirme faktörü olan EphrinB2'yi salar. EPO'nun osteoklastlarda EphrinB2'yi ve hem kemik iliği stromal hücrelerinde (osteoblast progenitörleri) hem de ST2 osteoblastik hücre hattında EphB4 reseptörünün salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sürecin işlevsel ortaya çıkışı, yani osteoklastlarda EphrinB2'nin artan salınımıyla osteoblast farklılaşmasının uyarıldığını göstermektedir.[148]

# 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

## 3.1. Çalışma Tasarımı

Araştırmanın deneysel kısmı ESOGÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Deney başlangıcında 250-300 gr. ağırlığında, 12-14 haftalık elli erkek Sprague Dawley rat kullanılmıştır (Şekil 3.1). Deney prosedürü sırasında hayvanlar, kontrol edilen bir sıcaklık ortamına (21-22 ° C) ters çevrilmiş açık-koyu döngüsüne (12 saat / 12 saat) sahip sessiz bir odada kafes başına iki tane bekletilmiştir. Hayvanlar standart yiyecek ve suya serbestçe erişebildi. Deney protokolü, ESOGÜ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK) tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır (Etik Kurul No: 715/2019).



**Şekil 3.1.** Erkek sprague dawley rat

Ratlar beş eşit gruba ayrıldı:

-Saf kontrol grubu (10 rat) (K grubu),

-Periodontitis grubu (10 rat) (P grubu),

-Kontrol + Darbepoetin alfa 0.25 µg/kg/gün grubu (10 rat)(K+EPO 0.25 grubu),

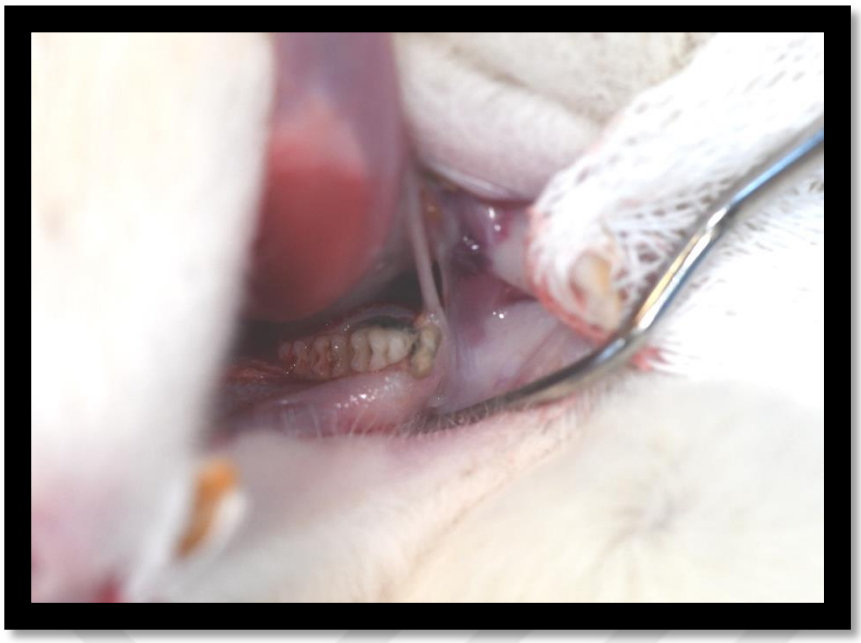
-Periodontitis + Darbepoetin alfa 0,1 µg / kg / gün (10 rat) (P+ EPO 0.1 grubu),

-Periodontitis + Darbepoetin alfa 0,25 µg / kg / gün (10rat) (P+EPO 0.25 grubu).

İlaç dozları Özkurt ve ark.'nın çalışmasından referans alınmıştır.[149]

### 3.2. Periodontitis İndüksiyonu

Gece boyunca aç bıraktıktan sonra denekler, Xylazine (Rompun, Bayer, Almanya) 3mg/kg s.c. veya i.m. ve Ketamin Hidroklorür (Ketasol, Eczacıbaşı) 90 mg/kg i.m. ilaçlar kullanılarak anestezi altına alınmıştır. Deneysel periodontitisi indüklemek için 30 ratın mandibuler 1. molarının çevresine steril 4/0 ipek ligatürler submarginal olarak yerleştirililmiştir (Şekil 3.2). Bu ligatürler oral mikroorganizmalar için bir retansiyon alanı oluşturmuştur. Birinci molar dişin ligatür yerleştirilmesinden sonra 11 günde önemli miktarda kemik kaybı olduğu bildirilmiştir.[150] 1 gün sonra hayvanlar rastgele 3 gruba ayrılmıştır. İşlem sonrası analjezi sağlamak amacı ile Rimadyl (Carprofen) 4 mg/kg/gün kullanılmıştır.



**Şekil 3.2.** Birinci moların çevresine steril 4/0 ipek ligatür submarjinal olarak yerleştirilmesi

### 3.3. Darbapoetin-alfa Uygulaması

Darbepoetin-alfa (Aranesp 100 µgr AMGEN) (Şekil 3.3): 0.1 ve 0.25 µgr/kg/ml olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde sulandırılmıştır. Ligatür yerleştirildikten bir gün sonra, ilaç, deney periyodunun 11 günü boyunca günde bir kez intraperitoneal olarak uygulanırken, kontrol ve periodontitis gruplarına sadece serum fizyolojik uygulanmıştır (Şekil 3.4).




**Şekil 3.3.** Darbepoetin alfa (Aranesp)



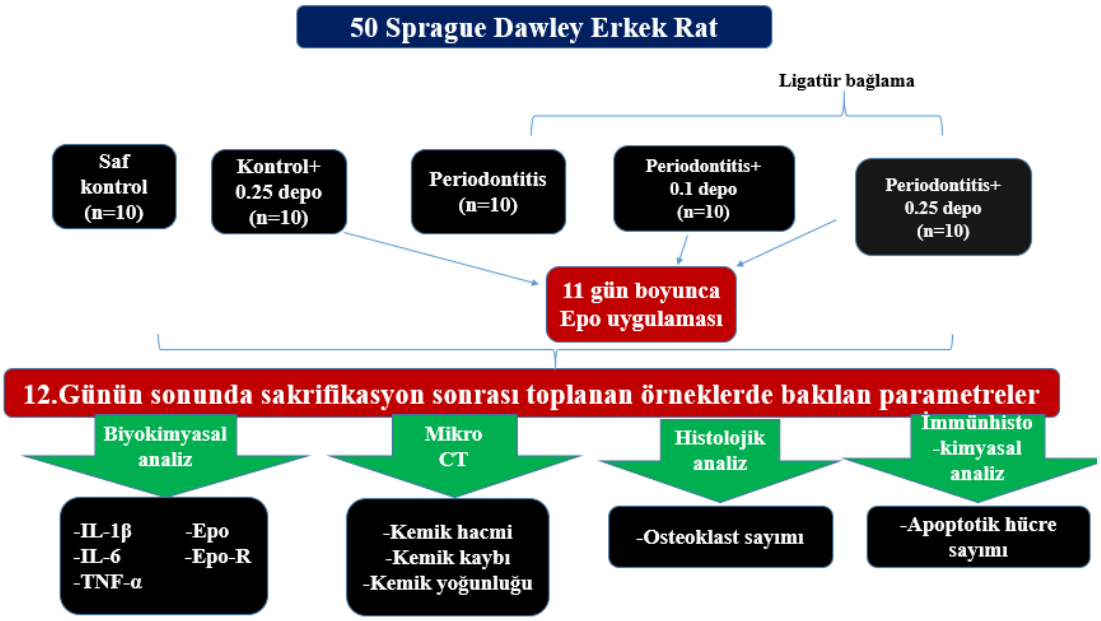
**Şekil 3.4.** İntramusküler EPO uygulaması

### 3.4. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Örneklerin Hazırlanması

Hayvanlar son EPO uygulamasından 24 saat sonra pentatol sodyum 200mg/kg i.p. uygulanarak sakrifiye edilmiştir. Mandibulalar rezeke edilerek orta hattan ikiye bölünmüştür (Şekil 3.5). Mandibula dişeti numuneleri biyokimyasal analiz için kullanılmıştır (diş eti TNF-α, IL-1-β, IL-6, EPO, EPO-R mRNA seviyeleri). Mandibula kemik numunelerine ise histolojik analiz (osteoklast sayımı), immünhistokimyasal analiz (tunnel analizi) ve mikro-BT analizi yapılmıştır (Şekil 3.6).



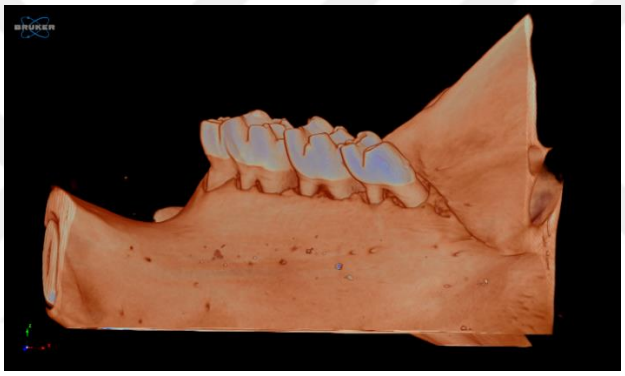
**Şekil 3.5.** Rezeke edilmiş mandibular çene



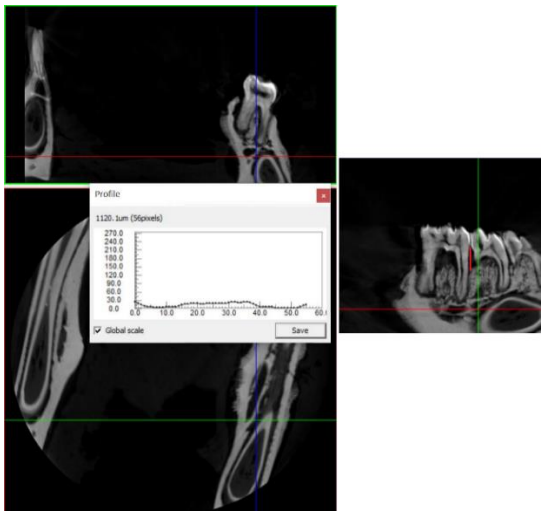

**Şekil 3.6.** Deney prosedürü

### 3.5. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Analizi

Toplanan numuneler, hayvanlar sakrifiye edildikten hemen sonra %10 formaldehit içerisinde sabitlenmiştir. Alveolar kemik kaybı, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde yerleşik bir yazılım kullanılarak 90 kV ve 112 $\mu$A'da bir mikro-BT sistemi (SkyScan 1172, Micro CT, Bruker, Brüksel, Belçika) kullanılarak taranmış ve analiz edilmiştir (Şekil 3.7). DataViewer 1.5.4.0 yazılımı (Bruker-microCT, Brüksel, Belçika) kullanılarak ilgilenilen bölge (ROI) belirlenmiştir. Birinci ve ikinci azı dişler arasındaki interproksimal kemik genişliği, derinliği ve yüksekliği ölçülmüştür (Şekil 3.8). Ölçümler, bir dental radiyoloji uzmanı tarafından maskeli bir şekilde yapılmıştır.



**Şekil 3.7.** SkyScan 1172 yazılımıyla alınan 3B görüntü




**Şekil 3.8.** DataViewer 1.5.4.0 yazılımıyla kemik kaybı ölçümü

### 3.6. qRt-PCR yöntemi ile dişeti TNF-α, IL-1β, IL-6, EPO ve EPO-R mRNA düzeyleri tayini

qRt-PCR yöntemi ile dişeti TNF-α, IL-1β, IL-6, EPO ve EPO-R mRNA düzeyleri tayini için -80 °C'de saklanan doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır (GeneJET RNA Purification Kit- Thermo). RNA'nın miktarı ve saflığı (Nanodrop 1000-Thermo Scientific) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplanmıştır. cDNA sentezinde (cDNA Sentez Kiti-Thermo) kullanılarak total reaksiyon 20 µl'den oluşacak şekilde, içerisinde 500 ng total RNA, 1 µl random hexamer primer, 1 µl anchored-oligo(dT) 18 primer, 4 µl buffer 5x, 1,1 µl reverse transkriptaz, 0,5 µl protektör RNAaz inhibitörü, 2 µl deoxinükleotit mix, 1 µl DTT ve double distile su bulundurulmuştur. cDNA sentezi için PCR koşulları, 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakikadır. qRT-PCR üretici firmanın (Thermo) tavsiyelerine göre laboratuvarda kullanılan metod doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerimiz olan TNF-α, IL-1β, IL-6, EPO, EPO-R ve Beta-aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Sybeer Green) kullanılarak Thermo Step One PCR cihazı ile ölçülmüştür. qRT-PCR çalışmaları triplike olarak yapılmıştır. Elde edilen data 2-ΔΔct relative quantifikasyon ile analiz edilmiştir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Hedef gen primerlerinin 20 bazlı sekans dizilimleri

| Hedef gen | 20 bazlı sekans dizilimi |
|---|---|
| **EPO F** | TGCCGGAACTGTAATCCACG |
| **EPO R** | GATTGGAGCCCAAAGCTTGC |
| **EPO-R F** | CCGGACCCCAAGTTTGAGAG |
| **EPO-R R** | GTGCAGGCGACATGACTTTC |
| **TNF-α F** | CATCCGTTCTCTACCCAGCC |
| **TNF-α R** | AATTCTGAGCCCGGAGTTGG |
| **IL-1β F** | AGGCTGACAGACCCCAAAAG |
| **IL-1β R** | CTCCACGGGCAAGACATAGG |
| **IL-6 F** | TCTGGTCTTCTGGAGTTCCGT |
| **IL-6 R** | GGAAGTTGGGGTAGGAAGGAC |
| **Aktin-β F** | ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC |
| **Aktin reverse R** | CTGACCCATACCCACCATCAC |

### 3.7. Histolojik Analiz

Histolojik olarak aşağıda belirtilen protokolleri takiben alveolar kemikte osteoklast hücre sayımı yapılmıştır.

#### 3.7.1. Örneklerin Parafine Gömme İşlemine Hazırlık

Eksize edilen kemik dokuları %10'luk nötral-tamponlu formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. Bu amaçla 3 kez 5'er dk. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Posphate Buffer Solution) ile 3 kez yıkandıktan sonra PBS içerisinde %10' luk hazırlanan EDTA (1.08418, Merck-Millipore) solusyonuna alındı. EDTA solusyonu iki günde bir değiştirilerek dokular 6 hafta süre ile dakalsifiye edildi.

### 3.7.2. Parafin Doku Takibi

Dekalsifiye edilen dokular EDTA'nın uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dk. % 60'dan % 100'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dk. 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk. iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60˚C'lik etüv içerisinde 15 dk. 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 60'ar dk. iki değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Parafin takip protokolü

| **İŞLEM** | **KULLANILAN MADDE** | **SÜRE** |
|---|---|---|
| **TESPİT** | % 10 FORMALİN | 48 SAAT |
| **DEKALSİFİKASYON** | %10'luk EDTA | 6 HAFTA |
| **YIKAMA** | AKAR SU | 1 GECE |
| **DEHİDRATASYON** | % 60 ALKOL | 30 dk. |
| | % 70 ALKOL | 30 dk. |
| | % 80 ALKOL | 30 dk. |
| | % 100 ABSOLÜ ALKOL-I | 30 dk. |
| | % 100 ABSOLÜ ALKOL-II | 30 dk. |
| **ŞEFFAFLAŞTIRMA** | ALKOL: KSİLEN (1:1) | 30 dk. |
| | KSİLEN | 1 saat |
| | KSİLEN | 1 saat |
| **İNFİLTRASYON (60˚C ETÜVDE)** | KSİLEN-PARAFİN (1:1) | 30 dk. |
| **İNFİLTRASYON (60˚C ETÜVDE)** | PARAFİN | 1 saat |
| **İNFİLTRASYON (60˚C ETÜVDE)** | PARAFİN | 1 saat |
| **BLOKLAMA** | PARAFİN | |

Daha sonra kasetlerdeki örnekler Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile 5 µm'lik parafin kesitler alınmıştır.

### 3.7.3. Boyamaya Hazırlık

Preparatarın boyanabilmesi için deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde bırakıldı ve sadece dokunun kalması sağlandı.

1. %96 ksilen'de 5 dk. bekletilerek
2. %70 ksilen'de 5 dk. bekletilerek

kesitler deparafinize edildi.

3. %100 alkolde 1 dk. bekletilerek
4. %80 alkolde 1 dk. bekletilerek

kesitler dehidrate edildi.

5. %70 alkolde 1 dk. bekletildi,
6. %50 alkolde 1 dk. bekletildi,
7. Akar suda 5 dk. yıkandı.

### 3.7.4. Hematoksilen-Eozin Boyaması

1. Kesitler hematoksilen boyasında 3 dk. bekletildi,
2. Musluk suyunda 5 dk. yıkandı,
3. %95 ethanol'de 15 sn bekletildi,
4. Musluk suyunda yıkandı,
5. Eozin boyasında 1.5 dk. bekletildi,
6. %95 ethanol'de 15 sn bekletildi,
7. Ksilen'de 2 dk. bekletildi,
8. 1:1 Ksilen-alkole 3-4 defa daldırıldı,
9. Lamlara entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Yukarıdaki protokolü takiben elde edilen hematoksilen eozin boyalı kesitlerde ilgili alanlardaki osteklastik hücreler ışık mikroskopu altında 2 kör histolog tarafından

incelenmiştir. Osteoklast değerlendirmesi 20X büyütmede alveolar kemik yüzeyinde bulunan osteoklastların sayımı yapılarak gerçekleştirildi.

### 3.8. İmmünhistokimyasal Analiz

İmmunhistokimyasal yöntemlerle doku hasarı ve apoptoz tayini yapılmıştır. Eksize edilen kemik dokuları %10'luk nötral-tamponlu formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. Hazırlanan parafin bloklardan polizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Apoptotik hücre ölümünün kantitesi, *in situ* hücre ölüm belirleme kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Önce seri kesitler ksilolde 3 kez deparafinize edilmiştir. Azalan dereceli alkollerden geçirilerek rehidre edilen kesitler, PBS (phosphate-buffered saline)'de yıkanmıştır. Daha sonra, kesitlere oda ısısında 15 dk. proteinaz K (20 µg/ml) sindirimi sağlandı ve 2 kez PBS'de yıkanmıştır. Daha sonra kesitler oda ısısında ekilibrasyon tamponunda inkübe edilmiştir. Dokular nem çemberinde ve karanlıkta 37°C'de, 60 dakika TUNEL reaksiyon karışımında (%70 reaksiyon tamponu, %30 TdT enzimi) inkübe edilmiştir. Kesitler oda ısısında, 10 dakika durdurma/yıkama tamponunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kesitler 3 kez PBS'de yıkanmıştır. Daha sonra kesitlere anti-digoxigenin konjugatı uygulandı ve oda ısısında 30 dk. nem çemberinde inkübe edilmiştir. 4 kez daha PBS'de yıkanan kesitlere, 10 dk. diaminobenzidin (DAB) uygulanmıştır. Daha sonra kesitler distile suda 3 kez yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır. Kahverengi boyanmış olan nükleuslar TUNEL (+) olarak kabul edilmiştir.

### 3.9. İstatistiksel Analiz

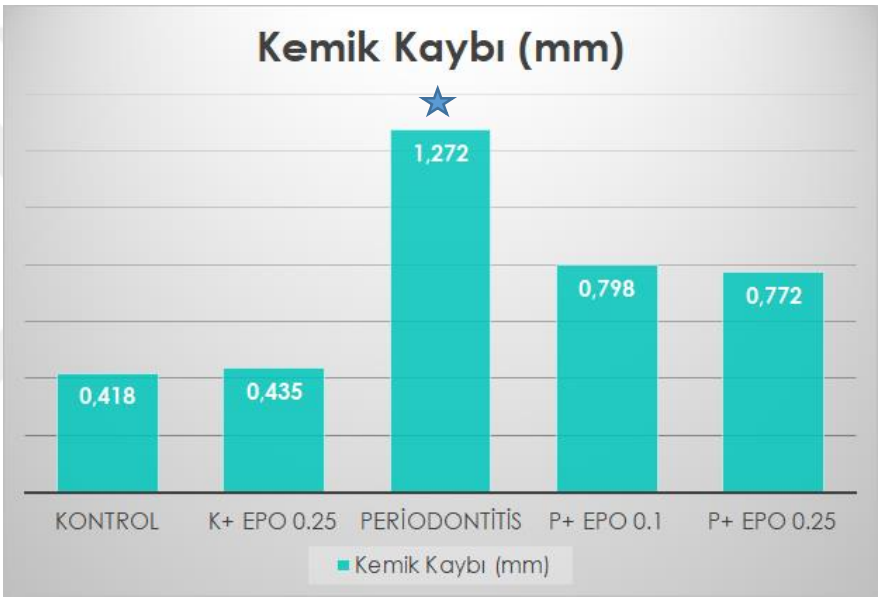
İstatistiksel analizler için SPSS 22.0 bilgisayar programı kullanılmıştır. Gruplardan elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort.±S.D.) olarak ifade edildi. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-

Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken, mikro-bt, qRt-PCR ve immünhistokimyasal analizler normal dağılım gösterdiğinden gruplar arası karşılaştırmalarında One-way Anova testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde post-hoc Tukey testi kullanıldı. Histolojik analiz normal dağılım göstermediğinden gruplar arası karşılaştırmalarında One-way Anova testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Mikro-Bilgisayarlı Tomografi Analiz Bulguları

Mikro-BT taraması sonucunda periodontitis grubundaki kemik kaybı ortalaması diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). P+ EPO 0.1 ve P+ EPO 0.25 grupları ve kontrol ve K+ EPO 0.25 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1) (Tablo 4.1).



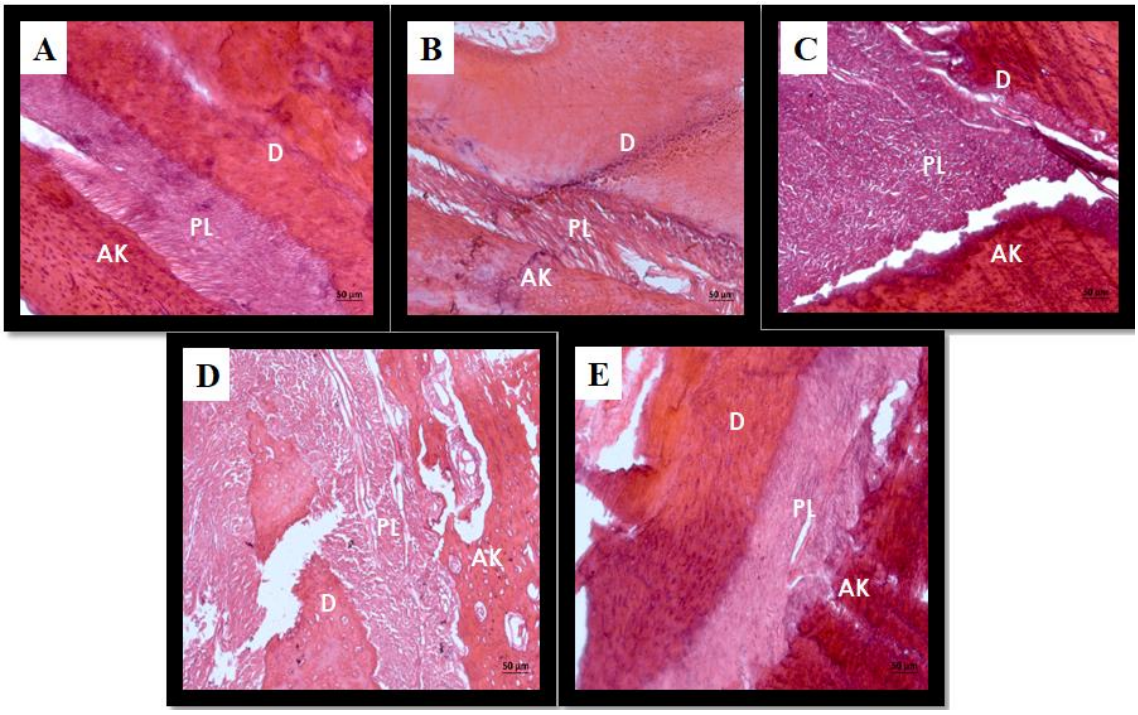

**Şekil 4.1.** Kemik kaybı ortalamaları (mm).*p<0.05 P, diğer gruplardan faklı

**Tablo 4.1.** Kemik kaybı istatistiksel analiz sonuçları

| Kemik kaybı istatistiksel analiz sonuçları | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 0,42±0,06 | 0.42 (0.35-0.55) |
| **K+EPO 0.25** | 0,44±0,07 | 0.43 (0.32-0.53) |
| **Periodontitis** | 1,27±0,077 | 1.32 (1.15-1.42) |
| **P+EPO0.25** | 0,77±0,039 | 0.75 (0.72-0.83) |
| **P+EPO0.1** | 0,79±0,059 | 0.78 (0.72-0.90) |

### 4.2. Histolojik Analiz Bulguları

Kontrol grubuna göre periodontitis grubunda osteoklast sayısında istastistiksel olarak anlamlı düzeyde artış bulunmuştur ($p<0.05$). P+ EPO 0.1 ve P+ EPO 0.25 gruplarında osteoklast sayısı periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde az bulunmuştur ($p<0.05$). P+ EPO 0.1 ve P+ EPO 0.25 grupları ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.2) (Tablo 4.2) ($p>0.05$).




**Şekil 4.2.** Hematoksilen-Eozin boyaması
A: Kontrol grubu, B: K+ EPO 0.25 grubu, C: Periodontitis grubu, D: P+ EPO 0.1, E: P+ EPO 0.25

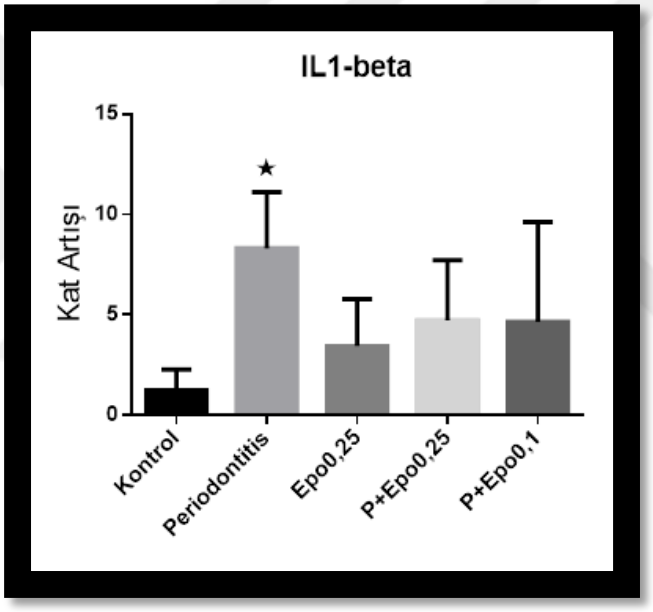
**Tablo 4.2.** Osteoklast hücre sayımı istatistiksel analiz sonuçları

| Osteoklast hücre sayımı istatistiksel analiz sonuçları | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 6.50±1,26 | 7.00 (4.00-8.00) |
| **K+EPO 0.25** | 5.10±1.52 | 5.00 (3.00-8.00) |
| **Periodontitis** | 23.60±3.63 | 23.50 (19.00-29.00) |
| **P+EPO 0.25** | 11.50±1.58 | 11.50 (9.00-14.00) |
| **P+EPO 0.1** | 13.20±2.30 | 13.00 (10.00-17.00) |

### 4.3. qRT-PCR Analizi Bulguları

Sonuçlarımıza göre; EPO, anti-inflamatuar sitokin olan IL-1β, IL-6 ve TNF-α ile ilişkili gen ekspresyonları düzeylerini azaltmıştır. Ayrıca EPO-R ekspresyonu uygulanan EPO'in etkisiyle artmıştır. Endojen EPO ifadelenememiştir.

IL-1β gen ekspresyon düzeyleri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$). P+ EPO 0.25 ve P+ EPO 0.1 gruplarında IL-1β gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna yakın bulunmuştur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.3) (Tablo 4.3).

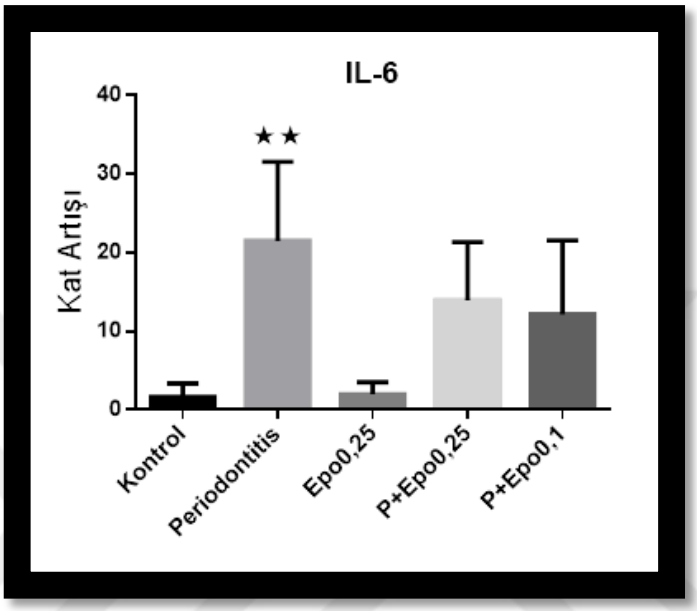



**Şekil 4.3.** IL-1β ekspresyon düzeyleri.*$p<0.05$ P, diğer gruplardan faklı

**Tablo 4.3.** IL-1β gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi

| IL-1β gen ekspresyon düzeyi | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 1,25±1,04 | 0,79 (0,52-2,43) |
| **K+EPO 0.25** | 3,45±2,34 | 2,11 (1,16-7,13) |
| **Periodontitis** | 8,31±2,80 | 8,37 (5,39-13,30) |
| **P+EPO 0.25** | 4,71±3,00 | 4,68 (1,73-7,73) |
| **P+EPO 0.1** | 4,64±4,97 | 3,90 (0,07-9,94) |

IL-6 gen ekspresyon düzeyleri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$). P + EPO 0.25 ve P + EPO 0.1 gruplarında IL-6 ekspresyon düzeyi kontrol grubuna yakın bulunmuştur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.4) (Tablo 4.4).



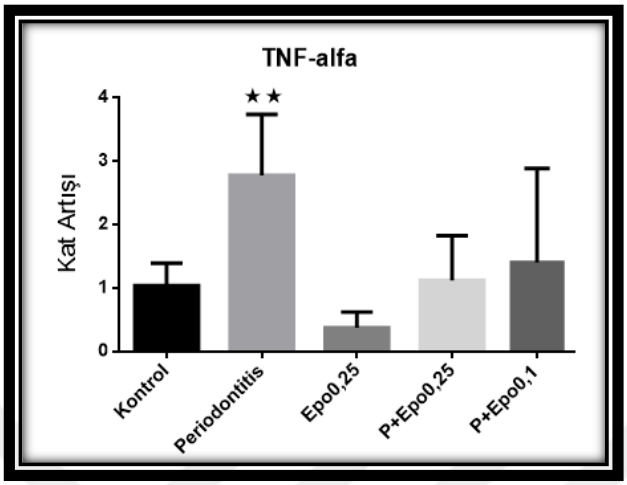

**Şekil 4.4.** IL-6 ekspresyon düzeyleri.**p<0.05 P, diğer gruplardan faklı

**Tablo 4.4.** IL-6 gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi

| IL-6 gen ekspresyon düzeyi | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 1,65±1,71 | 1,16 (0,24-3,55) |
| **K+EPO 0.25** | 1,98±1,55 | 2,03 (0,41-4,84) |
| **Periodontitis** | 21,49±10,07 | 20,61 (11,15-40,83) |
| **P+EPO 0.25** | 13,90±7,45 | 9,34 (7,91-24,77) |
| **P+EPO 0.1** | 12,15±9,39 | 11,28 (2,37-27,07) |

TNF-α ekspresyon düzeyleri periodontitis grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$). TNF-α ekspresyon düzeyi, P + EPO 0.1 grubunda anlamlı azalma göstermemiştir fakat kontrol grubu ile P + EPO 0.1 grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). P+ EPO 0.25 grubu, periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0.05$). Ayrıca P +

EPO 0.25 grubunda TNF-α ekspresyon düzeyi kontrol grubuna yakın bulunmuştur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 4.5) (Tablo 4.5).

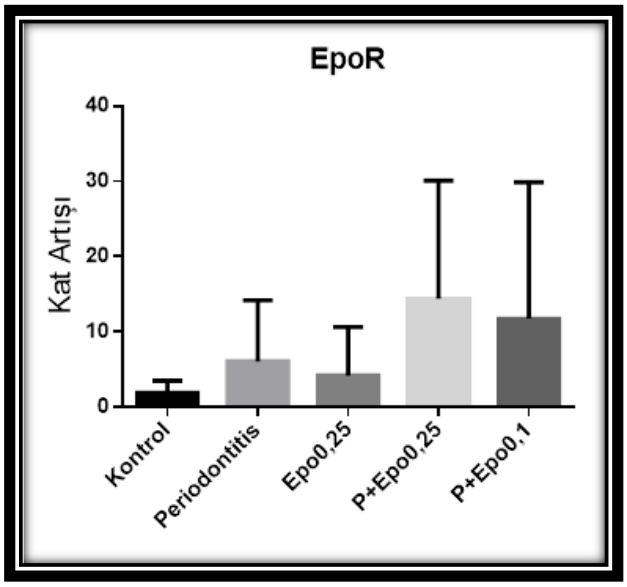



**Şekil 4.5.** TNF-α ekspresyon düzeyleri.**p<0.05 P, diğer gruplardan faklı

**Tablo 4.5.** TNF-α gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi

| TNF-α gen ekspresyon düzeyi | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 1,04±0,35 | 0,89 (0,78-1,44) |
| **K+EPO 0.25** | 0,37±0,25 | 0,33 (0,09-0,83) |
| **Periodontitis** | 2,78±0,96 | 2,19 (1,97-4,12) |
| **P+EPO 0.25** | 1,12±0,70 | 0,86 (0,49-2,36) |
| **P+EPO 0.1** | 2,81±2,96 | 1,32 (0,24-6,48) |

EPO-R ekspresyon düzeyleri P + EPO 0.25 ve P + EPO 0.1 gruplarında, periodontitis ve kontrol gurplarına göre artış göstermiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 4.6) (Tablo 4.6).



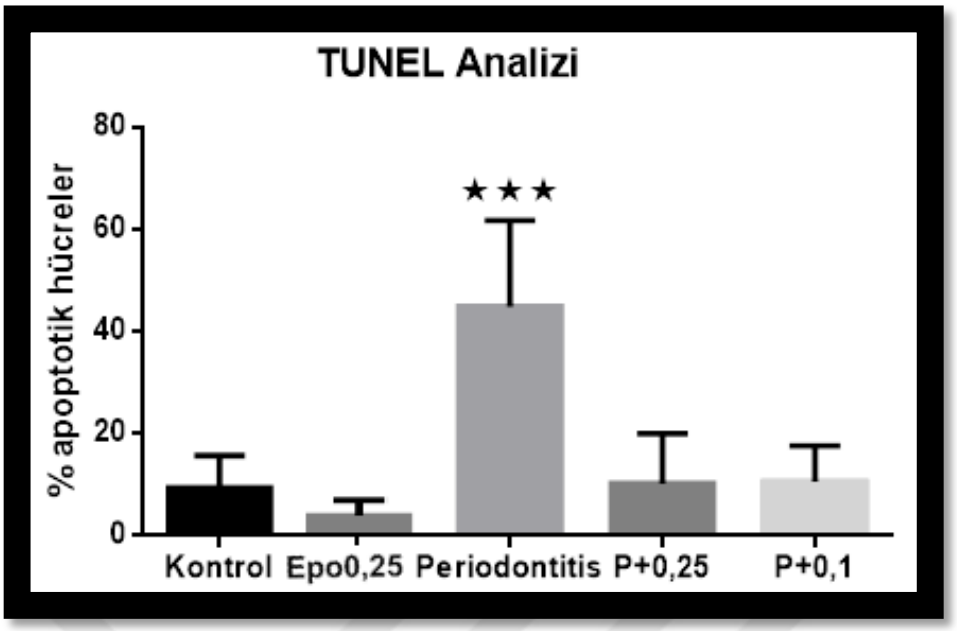

**Şekil 4.6.** EPO-R ekspresyon düzeyleri

**Tablo 4.6.** EPO-R gen ekspresyon düzeyi istatistiksel analizi

| EPO-R gen ekspresyon düzeyi | | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 1,93±1,59 | 2,52 (0,13-3,12) |
| **K+EPO 0.25** | 4,23±6,43 | 0,74 (0,28-11,65) |
| **Periodontitis** | 6,09±8,09 | 4,94 (0,10-19,85) |
| **P+EPO 0.25** | 14,42±15,66 | 7,96 (3,03-32,28) |
| **P+EPO 0.1** | 8,92±15,84 | 1,29 (0,41-32,67) |

### 4.4. İmmmünhistokimyasal Analiz Bulguları

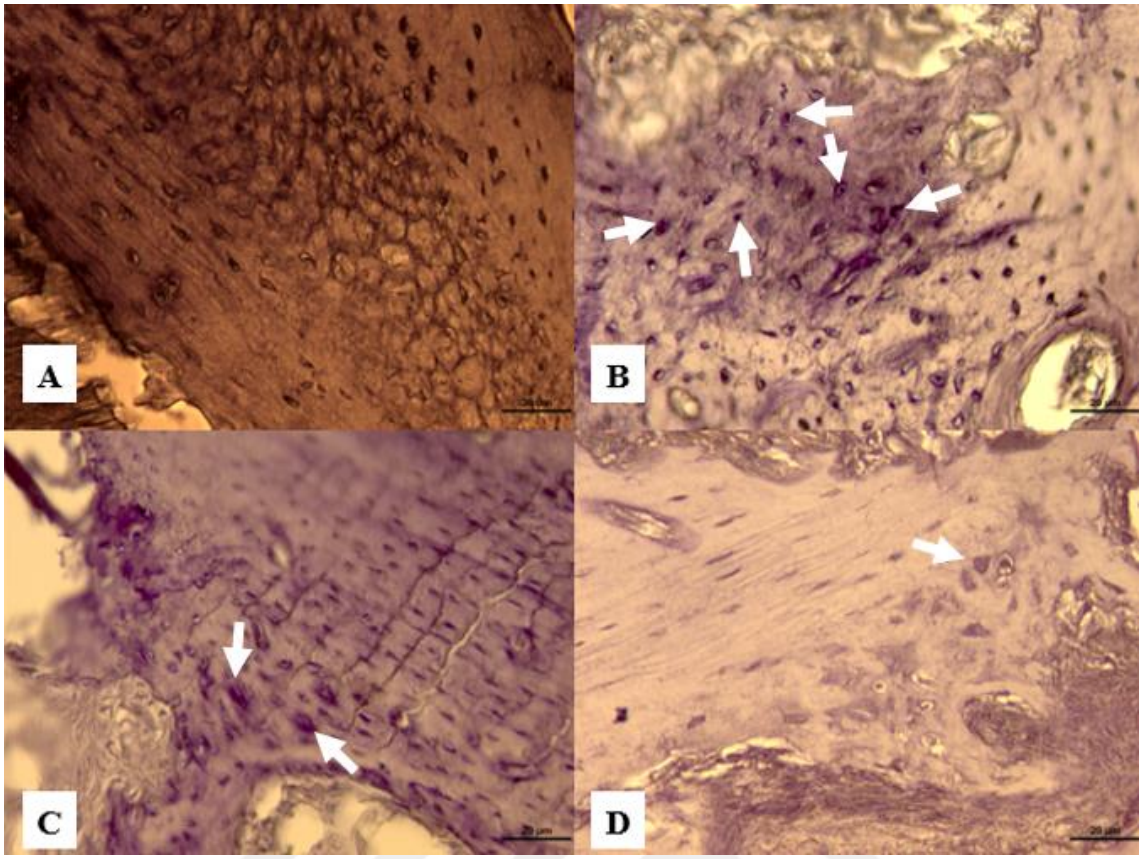
Periodontitis grubunda apoptotik hücre indeksi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselirken P+ EPO 0.25 ve P+ EPO 0.1 gruplarında EPO, apototik hücre indeksi değerini periodontitis grubuna göre anlamlı derecede düşürmüştür ve kontrol grubuna yakın değerde tutmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.7,4.8) (Tablo 4.7).




**Şekil 4.7.** Kemik kesitlerinde yapılan TUNEL boyaması sonucu elde edilen apoptotik hücre indeksi (%). *p<0.05 P, diğer gruplardan faklı

**Tablo 4.7.** TUNEL apoptotik hücre indeksi istatistiksel analizi

| | TUNEL | |
|---|---|---|
| | **Ortalama±SD** | **Ortanca(Min-Max)** |
| **Kontrol** | 9,35±6,29 | 8,01 (3,33-16,67) |
| **K+EPO 0.25** | 4,66±3,06 | 4,74 (2,12-7,46) |
| **Periodontitis** | 44,93±16,86 | 48,81 (17,86-72,00) |
| **P+EPO 0.25** | 10,19±9,75 | 6,67 (2,70-21,21) |
| **P+EPO 0.1** | 10,52±7,06 | 7,41 (5,56-18,60) |




**Şekil 4.8.** TUNEL boyaması
A) Kontrol grubunda kemik dokusunda normal görünüm. B) Periodontitis grubunda kemik dokusunda apoptotik hücreler (ok). C) P + EPO 0.1 grubunda kemik dokusunda apoptotik hücreler (ok). D) P + EPO 0.25 grubunda kemik dokusunda apoptotik hücreler.

# 5. TARTIŞMA

Yapılan yoğun araştırmalara rağmen periodontitise bağlı gelişen yaygın kemik ve ataçman kaybını önlemek periodontoloji alnının çözmeye çalıştığı önemli problemlerden biridir. Kliniklerde periodontitisin tedavisinde uygulanan protokoller doku koruyucu etkisi açısından çok başarılı değildir. DSÖ dünya çapında periodontal hastalıkların kontrolünün güçlendirilmesinin önemini vurgulamıştır.[13] Bütün dünyada diş kayıplarının en başta gelen nedenlerinden birisi periodontitisin tedavisinde bulunacak mekanizmalar ve tedavi edici ilaçların keşfi ve geliştirilmesi büyük önem arzetmektedir.

Periodontitis, bakterilere karşı inflamatuar hücreler ve onların ürettiği sitokinlerin varlığıyla ortaya çıkan ve immün yanıt sonucu oluşan alveoler kemik ve ataçman kaybıyla karakterize bir hastalıktır.[1-3] Konak hücreler, MDP tarafından uyarıldığında pro-inflamatuar sitokinler olan TNF-α, IL-1β ve IL-6, MMP ve PGE-2 salgılar ve nötrofil gibi efektör hücrelerin bölgeye göçünü sağlar. Sitokinler pro-inflamatuar veya anti-inflamatuar gruplara ayrılır ve nispi konsantrasyonları arasındaki dengesizlikler periodontitiste doku tahribatına yol açabilir.[30, 31] Özellikle TNF-α, IL-1β ve IL-6 ve osteoblast ve osteoklastlar arasındaki denge bozukluğu kemik yıkımı sürecini başlatır.[6]

Kemik, osteoblastik ve osteoklastik aktivite arasındaki denge sayesinde sürekli remodellinge uğrar. Ortaya çıkan inflamatuar hücrelerin akışı, birincil kemik rezorpsiyon hücresi olan osteoklastlar yoluyla rezorpsiyonu destekleyen bir dizi sitokin, örneğin PGE2, IL-1 ve RANK-L üretir. Bu nedenle, patolojik inflamatuar koşullarda, uyarıcı inflamatuar hücre ürünleri osteoklast aktivitesini başlatır ve koruyucu ve yıkıcı süreçler arasındaki ince dengeyi bozar.[73, 83]

Ratlarda periodontitisi indüklemenin en yaygın kullanılan yöntemi model ligatür indüksiyonudur.[151] Ligatür indüksiyonunun bağ dokusu ve kemik kaybı ratlarda ve farelerde, ligatür yerleştirilmesini takiben 3. günde şiddetlenir, 7-15 günlük bir süre zarfında üst seviyeye ulaştığı ortaya konmuştur. Bu özellik, ipek iplik çevresinde ve içinde bakteri türlerinin varlığından kaynaklanır, bu da hastalığın erken evrelerinde artmış kemik tahribatına yol açar.[96, 99] Molar dişlerin servikal bölgesine ligatürün yerleştirilmesi, bakteriyel kolonizasyona yol açar, bu da ataçman ve kemik kaybı gibi semptomlar ile sonuçlanır.[99, 152] Çalışmamızda kullandığımız ligatür alveoler kemik yıkımını arttırdı. Fakat bu modelin bazı limitasyonları vardır. Ligatür yerleştirilmesinden sonra oluşan travma ve bakteri artışına bağlı olarak pro-inflamatuar, anti–inflamatuar sitokin ve antioksidan aktiviteleri arasındaki denge kronik seyrili olan periodontitisin farklı olarak akut bir inflamasyon gösterir.[153]

EPO, glikoprotein yapısında hematopoez den sorumlu hormondur.[11] Doğumdan önce karaciğer birincil üretim yeridir ve yetişkin yaşamındaki üretimin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Yetişkinlerde ise böbrek EPO'in birincil üretim bölgesidir.[11] Hipoksi üzerine, böbrekte oksijene duyarlı PH'lar yoluyla oksijen gerilimini azalttığında uyarılır ve bu da transkripsiyon proteini olan HIF yoluyla EPO gen ekspresyonunu arttırır ve daha sonra EPO'i dolaşım içine bırakır.[106] EPO, kronik inflamatuar bozukluklar ve bulaşıcı hastalıklarda güçlü bir antiinflamatuar sitokindir.[118, 139] EPO'in kemik anabolik etkisinin hem birincil hem de ikincil iyileşme modellerinde olduğu bildirilmiştir. Kemik iyileşmesi ve rejenerasyon modellerinde EPO ile indüklenen osteogenezis, in vitro olarak gözlenen osteoblast proliferasyonunun ve farklılaşmasının doğrudan uyarılmasına atfedilmiştir.[12] EPO'in doku koruyucu, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkileri çeşitli dokularda tarif edilmiştir.[154]

Bozlar ve ark. 2006 yılında ratlarda tibia kırığı modeline sistemik EPO uygulamısını takiben artmış başlangıç kemik iyileşmesi ve anjiyogenezi tarif etmişlerdir.[155]

Holstein ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada EPO'in farelerde femur kırığından sonra erken endokondral ossifikasyon ve mekanik mukavemeti iyileştirdiğini göstermişlerdir. Kırıktan önce 2 gün ve kırıktan sonar 4 gün boyunca 5000 IU / kg EPO intraperitoneal enjeksiyonları, 2 hafta sonra burulma sertliği ve kallus yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca kallus içinde terminal olarak farklılaşan kondrositlerde EPO-R ekspresyonunda artış ve histomorfometrik incelemede mineralize kemik ve osteoid fraksiyonunda artış olduğu tespit edilmiştir.[156] Daha sonra, bu araştırmacılar günlük 500 IU / kg / gün sistemik enjeksiyonlarının daha büyük kemik hacmi ve kırılmadan sonra klinik olarak anlamlı birleşme oranına yol açtığını bildirdi.[157] Çalışmanın gözlem ve tedavi süresi 10 haftaydı. 2.haftada analizler, EPO ile tedavi edilen hayvanlarda VEGF'nün kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bir ekspresyon göstermiştir. Buna göre, EPO grubunda 2 haftada kan damarlarının sayısı önemli ölçüde artmıştır. Bunun da potansiyel olarak dolaylı bir osteojenik etkiye yol açtığını göstermişlerdir.[157]

Garcia ve ark. murin femur kırığı modelinde, günlük 500 IU / kg EPO uygulanan bütün hayvanlar kırık kaynaşması elde ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, endosteal vaskülarizasyon, EPO ile tedavi edilen hayvanlarda kontrollere kıyasla önemli ölçüde arttığını ve dolaşımdaki endotelyal progenitör hücrelerin sayısının, EPO ile tedavi edilen hayvanlarda önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Önceki çalışmaların aksine, Önceki çalışmalarının aksine, bu araştırmacılar EPO'in osteojenik etkisininin hücre çoğalmasına bağlı olması hipotezini reddetmiştir. Bununla birlikte, pro-inflamatuar regülatör olan NF-kB'nin azalmış seviyeleri ile birlikte dolaşımdaki endotelyal progenitör

hücrelerde yüksek seviyeler gözlemleyerek EPO'in osteojenik aktivitesinin anti-inflamatuar etkiye bağlı olduğu hipotezini savunmuşlardır.[158]

Mihmanli ve ark. bir tavşan mandibular osteogenez distraksiyon modelinde, EPO subkutanöz olarak 150 IU / kg 48 saat aralıklarla 4 enjeksiyon uygulamışlarıdr. Operasyondan 30 gün sonra deney grubunda osteoblast ve kan damarlarının sayısı anlamlı olarak daha yüksek iken deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Deney grubunda yeni kemik oluşumu alanı kontrol grubundan daha büyük bulunmuştur. Ayrıca, birim alandaki fibroblast ve kollajen sayılarının deney grubunda daha yüksek çıktığı bildirilmiştir.[159]

Sun ve ark. bir kraniyal defekt modeli kullanarak BMP-2'nin kemik rejeneratif etkisine EPO'in ek katkısının olup olmadığını araştırmışlardır. EPO'in 1000 IU / kg günlük tekrarlayan lokal uygulaması, BMP-2 ile indüklenen kemiğin kalitesinin arttığını ve sadece BMP-2 tedavisine kıyasla daha yüksek kemik hacmi fraksiyonu görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca EPO'in periferik kandaki RBC'leri arttırdığını ve kemik iliğindeki hematopoietik ve mezenkimal kök hücre popülasyonlarını arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, kemik oluşumunun yanı sıra artmış kalsifikasyon ve damar büyümesi gözlenmiştir. İlginçtir ki kraniyal kemik iyileşmesinin intramembranöz ossifikasyondan ziyade endokondral ossifikasyon ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu tedavi rejimi, araştırmacıların eritropoezis uyarıcı etkisini sınırlandırma çabasına ve EPO dozunu önceki çalışmalarına göre azaltarak potansiyel yan etkilere rağmen, eritropoezi anlamlı şekilde arttırmıştır.[146]

Nair ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada, ekzojen EPO ve stromal türevli faktör-1 alfa (SDF-la)'nın MSC'ler üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar hem EPO'in hem de SDF-1α'nın MSC üzerinde indükleyici etkisi olduğunu göstermiştir.

Fakat EPO'in MSC'leri osteoblastlara dönüşmek üzere BMP-2'yi indüklediği bildirilmiştir.[160]

Çalışmamızın sonuçları, bahsedilen diğer çalışmaların sonucuna benzer şekilde bulgular göstermiştir. Sistemik EPO uygulaması, mikro-bt analiz sonuçlarına göre periodontitisin beklenen semptomlarından olan alveolar kemik yıkımını anti-inflamatuar ve sitoprotektif etkisini göstererek istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır.

Aynı zamanda, bahsedilen diğer çalışmaların sonucuna benzer şekilde çalışmamızda histolojik bulgulara göre EPO uygulaması yapılan hayvanlarda osteoklastik aktivite düzeyinde periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görülmüştür.

Özkurt ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada, ratlarda EPO uygulamasının hipertansiyona karşı olan etkisini araştırmışlardır. EPO'in, makrofaj birikimini engelleyerek, TNF-α seviyelerini düşürerek ve TNF-α reseptörlerini apoptotik reseptör TNFR1'den prooperatif reseptör TNFR2'ye değiştirerek TNF-α'nın apoptotik etkilerini önleyerek böbrek dokusunu hipertansiyona karşı koruduğu sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada, EPO'in yüksek hematopoetik etkisini optimize etmek için bir doz ayarlaması çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaya göre 0.1 µg / kg ve 0.5 µg / kg dozlarda Darbepoetin-alfa uygulaması hafif hematopoietik etkiler göstermiştir, ancak bu artış anlamlı değildi; bununla birlikte, 0.5 µg/kg'lık bir Darbepoetin-alfa dozu eritrosit, hematokrit ve hemoglobin değerlerini önemli ölçüde arttırmıştır. 0.25 µg/kg Darbepoetin alfa dozunun, hematopoezi etkilemeyen en yüksek doz olduğu bulunmuştur.[149]

Çalışmamızda uygulanan dozlar, Özkurt ve ark.'nın yapıkları çalışmanın sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Pavese ve ark. yaptıkları çalışmada, anemik kanserli 35 hastada rhEPO uygulamasının serum TNF-α ve IL-6 seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre başlangıçtaki yüksek TNF-α ve IL-6 serum seviyeleri, rhEPO uygulamasıyla birlikte azaldığı gösterilmiştir.[161]

Zhou ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada, travmatik beyin yaralanması olan farelerde EPO uygulamasının etkilerini incelemişlerdir. Bu incelemelerin sonucunda, ELISA analizi, EPO tedavisinin, anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 ekspresyonunu arttırdığı, ancak yaralı beyin dokusunda pro-inflamatuar sitokin olan IL-1β ve TNF-α ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.[162]

Mateus ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada, farelerde Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile indüklenen kolit modelinde EPO'in etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, TNBS'in neden olduğu kolitte EPO'in etkisiyle TNF-α ve IL-1β'nın baskılandığı ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'nun arttığı gösterilmiştir.[163]

Çalışmamızda, bahsedilen çalışmalara benzer bir şekilde dişeti örneklerinde uygulanan qRt-PCR yöntemi sonuçlarına göre EPO, anti-inflamatuar etkisini göstererek IL-1β, IL-6 ve TNF-α gen ekspresyon düzeyleri periodontitis grubuna göre azalmış ve kontrol grubu seviyesine yakın tutmuştur. Bu sonuçların da kemik yıkımının azalmasında etkisi olduğuna inanmaktayız.

French'in 2019 yılında yaptığı çalışmada, EPO'in pleiotropik etkileri araştırılmıştır. Bu sonuçlara göre, EPO'in apoptoz inhibisyonu yoluyla yaralanma, inflamasyon ve doku hipoksisine yanıtın modülasyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.[164]

Osikov ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada, ratlarda deneysel olarak indüklenen kronik böbrek yetmezliği üzerine rhEPO uygulamısının lenfosit apoptozu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada, EPO uygulanan ratlarda apoptoz ve nekroz belirtileri ile kan lenfositlerinin sayısının azaldığını ve böylece sağlam lenfositlerin sayısını arttığını göstermişlerdir.[165]

Xu ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada, EPO'nun femur başı osteonekrozunda kemik kaybının önlenmesi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre, EPO, Runx2 aracılı osteogenezi, VEGF aracılı anjiyogenezi ve hücre apoptozunun inhibisyonunu arttırarak farelerde kemik kaybını önlemiştir.[166]

Çalışmamızda, bahsedilen çalışmaların sonucuna benzer şekilde, alveolar kemik dokusunda yapılan TUNEL analizi sonucunda EPO uygulanan ratlarda apoptotik hücre indeksi periodontitis grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu da EPO'in anti-apoptotik etkisinin kemik kaybı üzerindeki önleyici etkisini arttırdığını göstermektedir.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu uzmanlık tezi çalışmasında, EPO'in alveolar kemik kaybı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

2. Çalışmamızın bulguları, EPO'in hematopoetik yan etkileri olmayan dozlarda uygulanması ile alveolar kemik kaybını anlamlı düzeyde azalttığını, bunu da osteoklastik aktiviteyi azaltarak, apoptoz oranını düşürerek ve inflamasyonu baskılayarak sağladığını göstermiştir.

3. Sunulan çalışmanın sonuçları ve son yıllarda yayınlanan çalışmaların ışığında, EPO'in hematopoetik etkileri yanı sıra anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve sitoprotektif özelliklere sahip olması hematoloji dışında birçok alanda uygulanabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda, periodontal hastalıkların tedavisi ve periodontal doku kayıplarının önlenmesi hususunda başarılı sonuçlar göstermiştir.

4. EPO, diş hekimliği alanında çok az çalışmada değerlendirilmiştir. Periodontoloji alanında farklı dozajlarla farklı etkilerinin değerlendirilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

# KAYNAKLAR


1. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Turkoglu O, Baskesen A, Atilla G. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. J Periodontol 2004;75(11):1516-23.
2. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2003;30(12):1046-52.
3. de Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Vidal FD, da Rocha FA, de Castro Brito GA, de Albuquerque Ribeiro R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. Eur J Oral Sci 2000;108(2):123-9.
4. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? J Clin Periodontol 2011;38 Suppl 1160-84.
5. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. Periodontol 2000 2004;359-13.
6. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000 1997;14112-43.
7. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. J Immunol Res 2015;2015615486.
8. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontol 2000 2004;349-21.

9. Sanz M, Giovannoli JL. Focus on furcation defects: guided tissue regeneration. Periodontol 2000 2000;22169-89.

10. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. Injury 2011;42(6):556-61.

11. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. Intern Med 2004;43(8):649-59.

12. Shiozawa Y, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J, Wang Z, Song J, Wang J, Lee CH, Sud S, Pienta KJ, Krebsbach PH, Taichman RS. Erythropoietin couples hematopoiesis with bone formation. PLoS One 2010;5(5):108-53.

13. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. Periodontol 2000 2012;60(1):15-39.

14. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. J Periodontol 2018;89(1):1-8.

15. Williams RC. Periodontal disease. N Engl J Med 1990;322(6):373-82.

16. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. J Periodontol 2005;76(12):2187-93.

17. Beck JD, Offenbacher S. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol 2005;76(11):2089-100.

18. The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol 1999;70(4):457-70.

19. Mittrucker HW, Raupach B, Kohler A, Kaufmann SH. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection. J Immunol 2000;164(4):1648-52.

20. Pihlstrom BL, Ammons WF. Treatment of gingivitis and periodontitis. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. J Periodontol 1997;68(12):1246-53.

21. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000 2001;258-20.

22. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. 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. J Clin Periodontol 2018;45(20):68-S77.

23. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J Periodontol 2018;89(1):159-72.

24. Monti D, Ostan R, Borelli V, Castellani G, Franceschi C. Inflammaging and human longevity in the omics era. Mech Ageing Dev 2017;165(2):129-38.

25. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. Expert Rev Mol Med 2013;15(5):1-7.

26. Tezal M, Scannapieco FA, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Genco RJ. Supragingival plaque may modify the effects of subgingival bacteria on attachment loss. J Periodontol 2006;77(5):808-13.

27. Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. J Periodontol 1992;63(4):322-31.

28. Rolla G, Ogaard B, Cruz Rde A. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. J Clin Periodontol 1993;20(2):105-8.

29. Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. Adv Dent Res 1994;8(2):246-53.

30. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. J Dent Res 2010;89(12):1349-63.

31. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000 2010;52(1):163-206.

32. Bosma-den Boer MM, van Wetten ML, Pruimboom L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. Nutr Metab (Lond) 2012;9(1):32.

33. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. J Clin Periodontol 2013;84(4):1-7.

34. Sculley DV. Periodontal disease: modulation of the inflammatory cascade by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. J Periodontal Res 2014;49(3):277-81.

35. Kirichenko TV, Sobenin IA, Nikolic D, Rizzo M, Orekhov AN. Anti-cytokine therapy for prevention of atherosclerosis. Phytomedicine 2016;23(11):1198-210.

36. Hughes FJ. Cytokines and cell signalling in the periodontium. Oral Dis 1995;1(4):259-65.

37. Carter LL, Dutton RW. Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. Curr Opin Immunol 1996;8(3):336-42.

38. Schreurs J. Cytokines in infectious disease: the battle between host and pathogen. Curr Opin Biotechnol 1993;4(6):727-33.

39. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. Immunol Today 1989;10(9):299-304.

40. Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. DNA Cell Biol 2009;28(8):389-95.

41. Mosmann TR. Cytokines: is there biological meaning? Curr Opin Immunol 1991;3(3):311-4.

42. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat Rev Immunol 2010;10(2):89-102.

43. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. J Immunol 1985;135(4):2562-8.

44. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature 1985;315(6021):641-7.

45. Chou HH, Takashiba S, Maeda H, Naruishi K, Nishimura F, Arai H, Lu H, Murayama Y. Induction of intracellular interleukin-1 beta signals via type II interleukin-1 receptor in human gingival fibroblasts. J Dent Res 2000;79(9):1683-8.

46. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 1996;87(6):2095-147.

47. Bahia MS, Kaur M, Silakari P, Silakari O. Interleukin-1 receptor associated kinase inhibitors: potential therapeutic agents for inflammatory- and immune-related disorders. Cell Signal 2015;27(6):1039-55.

48. Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. Oral Dis 1995;1(4):266-70.

49. Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to Porphyromonas gingivalis. Periodontol 2000 2010;54(1):160-94.

50. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64(5):474-84.

51. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014;6(10):16-25.

52. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. Biochem J 1990;265(3):621-36.

53. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. Lancet 2001;358(9275):24-9.

54. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. J Bone Miner Res 1996;11(1):88-95.

55. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annu Rev Immunol 1997;15(1):797-819.

56. Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. Biol Chem 2013;394(9):1145-61.

57. Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, Giraud AS. Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. Biochim Biophys Acta 2009;1793(11):1623-33.

58. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. Cytokine 2014;70(1):11-20.

59. Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hanstrom L, Lerner UH. IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts. J Dent Res 2008;87(6):558-63.

60. Liu J, Wang Y, Ouyang X. Beyond toll-like receptors: Porphyromonas gingivalis induces IL-6, IL-8, and VCAM-1 expression through NOD-mediated NF-kappaB and ERK signaling pathways in periodontal fibroblasts. Inflammation 2014;37(2):522-33.

61. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Jr., Shepard HM. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 1985;230(4728):943-5.

62. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech 2000;50(3):184-95.

63. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. Clin Exp Immunol 2006;144(1):35-40.

64. Oates TW, Graves DT, Cochran DL. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. J Clin Periodontol 2002;29(2):137-43.

65. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000 2006;40(1):11-28.

66. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol 2000 2004;36(1):14-26.

67. Teng YT. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1--innate and humoral immunity and the periodontium. J Dent Res 2006;85(3):198-208.

68. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 2003;74(3):391-401.

69. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol 1996;1(1):821-78.

70. Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. Cytokine 2005;29(4):159-68.

71. Emingil G, Han B, Gurkan A, Berdeli A, Tervahartiala T, Salo T, Pussinen PJ, Kose T, Atilla G, Sorsa T. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis: gingival crevicular fluid MMP-8 and TIMP-1 levels and outcome of periodontal therapy. J Periodontol 2014;85(8):1070-80.

72. Handfield M, Baker HV, Lamont RJ. Beyond good and evil in the oral cavity: insights into host-microbe relationships derived from transcriptional profiling of gingival cells. J Dent Res 2008;87(3):203-23.

73. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am J Pathol 2007;170(2):427-35.

74. Leshem O, Kashino SS, Goncalves RB, Suzuki N, Onodera M, Fujimura A, Sasaki H, Stashenko P, Campos-Neto A. Th1 biased response to a novel Porphyromonas gingivalis protein aggravates bone resorption caused by this oral pathogen. Microbes Infect 2008;10(6):664-72.

75. Pope RM. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and early recognition. Am J Med 1996;100(2):3-9.

76. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Annu Rev Immunol 2002;20(1):795-823.

77. Zaidi M, Alam AS, Shankar VS, Bax BE, Bax CM, Moonga BS, Bevis PJ, Stevens C, Blake DR, Pazianas M, et al. Cellular biology of bone resorption. Biol Rev Camb Philos Soc 1993;68(2):197-264.

78. Gehron Robey P. The biochemistry of bone. Endocrinol Metab Clin North Am 1989;18(4):858-902.

79. Giannobile WV, Al-Shammari KF, Sarment DP. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. Periodontol 2000 2003;31(1):125-34.

80. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000;289(5484):1504-8.

81. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. J Cell Biochem 2007;102(5):1130-9.

82. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. Rev Endocr Metab Disord 2006;7(2):123-39.

83. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. J Periodontol 2002;73(11):1377-91.

84. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. Aust Dent J 2009;54(1):2-10.

85. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14158-72.

86. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med 2003;11(1):17-21.

87. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. Bone 1999;25(5):517-23.

88. Udagawa N, Sato N, Yang S, Nakamura M, Yamashita T, Nakamura H, Noguchi T. Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. Periodontol 2000 2007;43(1):56-64.

89. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. J Bone Miner Res 2002;17(7):1211-8.

90. Ebersole JL, Dawson DR, 3rd, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, Gonzalez OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. Periodontol 2000 2013;62(1):163-202.

91. Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. J Med Life 2013;6(1):7-13.

92. Kaur S, White S, Bartold M. Periodontal Disease as a Risk Factor for Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. JBI Libr Syst Rev 2012;10(42):1-12.

93. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, Giannobile WV. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. J Periodontol 2007;78(7):1300-8.

94. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. Am J Pathol 2006;169(3):987-98.

95. Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. Periodontol 2000 2007;45(1):76-94.

96. Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli JA, Hoefel AL, Kucharski LC, Torres IL, Rosing CK. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. J Periodontol 2016;87(2):9-17.

97. de Souza JA, Nogueira AV, de Souza PP, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C, Jr. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. Arch Oral Biol 2011;56(10):1120-8.

98. de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. J Investig Clin Dent 2013;4(4):211-8.

99. de Molon RS, Hsu C, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih FQ, Soundia A, Cunha FQ, Cirelli JA, Aghaloo TL, Tetradis S. Rheumatoid Arthritis Exacerbates the Severity of Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. A Randomized, Prospective, Controlled Animal Study. J Bone Miner Res 2016;31(8):1596-607.

100. Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. J Periodontal Res 2016;51(5):639-46.

101. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. J Immunol Methods 2013;394(2):49-54.

102. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. Nature 1999;401(6752):489-93.

103. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. Nature 1991;349(6306):257-60.

104. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. Blood 2006;108(1):123-33.

105. Sturiale A, Campo S, Crasci E, Aloisi C, Buemi M. Experimental models of acute renal failure and erythropoietin: what evidence of a direct effect? Ren Fail 2007;29(3):379-86.

106. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, Mesropian L, Gradin K, Jamora C, Wiesener M, Eckardt KU, Koch CJ, Ellies LG, Haddad G, Haase VH, Simon MC, Poellinger L, Powell FL, Johnson RS. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. Cell 2008;133(2):223-34.

107. Juul SE. Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate. Clin Perinatol 2000;27(3):527-41.

108. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. Eur J Haematol 2007;78(3):183-205.

109. Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, Liu E, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Mole D, Maxwell PH, Stockton DW, Semenza GL, Prchal JT. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. Nat Genet 2002;32(4):614-21.

110. Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman TR, Cerami A, Brines M, Samaja M. Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced in vivo by severe chronic hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(46):17531-6.

111. Yang YY, Lin HC, Lee WC, Huang YT, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Plasma erythropoietin level in patients with cirrhosis and its relationship to the severity of cirrhosis and renal function. J Gastroenterol Hepatol 2003;18(10):1156-61.

112. Bagnis C, Beaufils H, Jacquiaud C, Adabra Y, Jouanneau C, Le Nahour G, Jaudon MC, Bourbouze R, Jacobs C, Deray G. Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. Nephrol Dial Transplant 2001;16(5):932-8.

113. Sharples EJ, Patel N, Brown P, Stewart K, Mota-Philipe H, Sheaff M, Kieswich J, Allen D, Harwood S, Raftery M, Thiemermann C, Yaqoob MM. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. J Am Soc Nephrol 2004;15(8):2115-24.

114. Krzyzanski W, Wyska E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of erythropoietin receptor in healthy volunteers. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2008;377(6):637-45.

115. Wen D, Boissel JP, Tracy TE, Gruninger RH, Mulcahy LS, Czelusniak J, Goodman M, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. Blood 1993;82(5):1507-16.

116. Tauchi T, Damen JE, Toyama K, Feng GS, Broxmeyer HE, Krystal G. Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. Blood 1996;87(11):4495-501.

117. Haq R, Halupa A, Beattie BK, Mason JM, Zanke BW, Barber DL. Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 2002;277(19):17359-66.

118. Nairz M, Schroll A, Moschen AR, Sonnweber T, Theurl M, Theurl I, Taub N, Jamnig C, Neurauter D, Huber LA, Tilg H, Moser PL, Weiss G. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. Immunity 2011;34(1):61-74.

119. Sulahian R, Cleaver O, Huang LJ. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. Blood 2009;113(21):5287-97.

120. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1985;313(6005):806-10.

121. Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. Eur J Biochem 1992;210(3):649-63.

122. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). Nephrol Dial Transplant 2001;16(3):3-13.

123. Ebie AZ, Fleming KG. Dimerization of the erythropoietin receptor transmembrane domain in micelles. J Mol Biol 2007;366(2):517-24.

124. Wu YW, Bauer LA, Ballard RA, Ferriero DM, Glidden DV, Mayock DE, Chang T, Durand DJ, Song D, Bonifacio SL, Gonzalez FF, Glass HC, Juul SE. Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. Pediatrics 2012;130(4):683-91.

125. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. Microvasc Res 2002;64(2):326-33.

126. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood 2003;102(4):1340-6.

127. Rolfing JH, Jensen J, Jensen JN, Greve AS, Lysdahl H, Chen M, Rejnmark L, Bunger C. A single topical dose of erythropoietin applied on a collagen carrier enhances calvarial bone healing in pigs. Acta Orthop 2014;85(2):201-9.

128. Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. J Intern Med 2008;264(5):405-32.

129. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. Erythropoietin: new directions for the nervous system. Int J Mol Sci 2012;13(9):11102-29.

130. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(41):14907-12.

131. Kim J, Jung Y, Sun H, Joseph J, Mishra A, Shiozawa Y, Wang J, Krebsbach PH, Taichman RS. Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling. J Cell Biochem 2012;113(1):220-8.

132. Zhang YL, Radhakrishnan ML, Lu X, Gross AW, Tidor B, Lodish HF. Symmetric signaling by an asymmetric 1 erythropoietin: 2 erythropoietin receptor complex. Mol Cell 2009;33(2):266-74.

133. Mitra A, Bansal S, Wang W, Falk S, Zolty E, Schrier RW. Erythropoietin ameliorates renal dysfunction during endotoxaemia. Nephrol Dial Transplant 2007;22(8):2349-53.

134. Pesce M, Felaco P, Franceschelli S, Speranza L, Grilli A, De Lutiis MA, Ferrone A, Sirolli V, Bonomini M, Felaco M, Patruno A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. Open Biol 2014;4(6):140026.

135. Allen DA, Breen C, Yaqoob MM, Macdougall IC. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN-gamma and TNF-alpha. J Investig Med 1999;47(5):204-11.

136. Cooper AC, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM, Macdougall IC. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10,

and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. J Am Soc Nephrol 2003;14(7):1776-84.

137. Kaneko Y, Miyazaki S, Hirasawa Y, Gejyo F, Suzuki M. Transferrin saturation versus reticulocyte hemoglobin content for iron deficiency in Japanese hemodialysis patients. Kidney Int 2003;63(3):1086-93.

138. Lankhorst CE, Wish JB. Anemia in renal disease: diagnosis and management. Blood Rev 2010;24(1):39-47.

139. Choi D, Schroer SA, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, Zhang Y, Gaisano HY, Wagner KU, Wu H, Retnakaran R, Woo M. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells. J Exp Med 2010;207(13):2831-42.

140. Yuan R, Maeda Y, Li W, Lu W, Cook S, Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. PLoS One 2008;3(4):19-24.

141. Broxmeyer HE. Erythropoietin surprises: an immune saga. Immunity 2011;34(1):6-7.

142. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol 2005;5(10):749-59.

143. Perren SM. Fracture healing. The evolution of our understanding. Acta Chir Orthop Traumatol Cech 2008;75(4):241-6.

144. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? Injury 2007;38(1):11-25.

145. Betsch M, Thelen S, Santak L, Herten M, Jungbluth P, Miersch D, Hakimi M, Wild M. The role of erythropoietin and bone marrow concentrate in the treatment of osteochondral defects in mini-pigs. PLoS One 2014;9(3):92-76.

146. Sun H, Jung Y, Shiozawa Y, Taichman RS, Krebsbach PH. Erythropoietin modulates the structure of bone morphogenetic protein 2-engineered cranial bone. Tissue Eng Part A 2012;18(20):2095-105.

147. Patel JJ, Modes JE, Flanagan CL, Krebsbach PH, Edwards SP, Hollister SJ. Dual Delivery of EPO and BMP2 from a Novel Modular Poly-varepsilon-Caprolactone Construct to Increase the Bone Formation in Prefabricated Bone Flaps. Tissue Eng Part C Methods 2015;21(9):889-97.

148. Li C, Shi C, Kim J, Chen Y, Ni S, Jiang L, Zheng C, Li D, Hou J, Taichman RS, Sun H. Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling. J Dent Res 2015;94(3):455-63.

149. Ozkurt M, Uzuner K, Erkasap N, Kus G, Ozyurt R, Uysal O, Akyazi I, Kutlay O. Erythropoietin Protects the Kidney by Regulating the Effect of TNF-alpha in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. Kidney Blood Press Res 2018;43(3):807-19.

150. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol 2009;80(4):672-8.

151. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol 2014;85(3):465-77.

152. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. J Periodontol 1991;62(1):59-73.

153. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, Cuzzocrea S. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. J Clin Periodontol 2005;32(10):1062-8.

154. Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. Biochem Pharmacol 2011;82(10):1291-303.

155. Bozlar M, Kalaci A, Aslan B, Baktiroglu L, Yanat AN, Tasci A. Effects of erythropoietin on fracture healing in rats. Saudi Med J 2006;27(8):1267-9.

156. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P, Pohlemann T. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. Life Sci 2007;80(10):893-900.

157. Holstein JH, Orth M, Scheuer C, Tami A, Becker SC, Garcia P, Histing T, Morsdorf P, Klein M, Pohlemann T, Menger MD. Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice. Bone 2011;49(5):1037-45.

158. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, Pohlemann T, Menger MD. Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. J Orthop Res 2011;29(2):165-72.

159. Mihmanli A, Dolanmaz D, Avunduk MC, Erdemli E. Effects of recombinant human erythropoietin on mandibular distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg 2009;67(11):2337-43.

160. Nair AM, Tsai YT, Shah KM, Shen J, Weng H, Zhou J, Sun X, Saxena R, Borrelli J, Jr., Tang L. The effect of erythropoietin on autologous stem cell-mediated bone regeneration. Biomaterials 2013;34(30):7364-71.

161. Pavese I, Satta F, Todi F, Di Palma M, Piergrossi P, Migliore A, Piselli P, Borghesi R, Mancino G, Brunetti E, Alimonti A. High serum levels of TNF-alpha and IL-6 predict the clinical outcome of treatment with human recombinant erythropoietin in anaemic cancer patients. Ann Oncol 2010;21(7):1523-8.

162. Zhou ZW, Li F, Zheng ZT, Li YD, Chen TH, Gao WW, Chen JL, Zhang JN. Erythropoietin regulates immune/inflammatory reaction and improves neurological function outcomes in traumatic brain injury. Brain Behav 2017;7(11):8-27.

163. Mateus V, Rocha J, Alves P, Mota-Filipe H, Sepodes B, Pinto RM. Anti-Inflammatory Effect of Erythropoietin in the TNBS-induced Colitis. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2017;120(2):138-45.

164. French C. Erythropoietin in Critical Illness and Trauma. Crit Care Clin 2019;35(2):277-87.

165. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Effect of Erythropoietin on Lymphocytes Apoptosis in Experimental Chronic Renal Failure. Bull Exp Biol Med 2015;159(3):348-50.

166. Xu T, Jin H, Lao Y, Wang P, Zhang S, Ruan H, Mao Q, Zhou L, Xiao L, Tong P, Wu C. Administration of erythropoietin prevents bone loss in osteonecrosis of the femoral head in mice. Mol Med Rep 2017;16(6):8755-62.

# EKLER

## EK-1. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Amin ADİL

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İSTANBUL-13 HAZİRAN 1993

**E-posta adresi:** amintunis@hotmail.com

**Telefon:** 05315424870

**Yazışma adresi:** ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**Öğrenim Durumu:**

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---|---|---|---|
| Lisans | Diş hekimliği | Hacettepe Üniversitesi | 2016 |

**Görevler:**

| Görev Ünvanı | Görev Yeri | Yıl |
|---|---|---|
| Araş. Gör. | Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi | 2017-Halen |

**Uzmanlık Tezi Danışmanı:**

Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR

**Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :**

1) H. Özdemir, B. Kuşakçı Şeker, **A. Adil**, D. Ş. İnan. "Effect of Capparis Spinosa on Wound Healing: A Clinical and Histomorphometric Study in Rats" (Sözlü sunum), 1. International Congress of Dental and Oral Infections, European Federation of Periodontology, 114, Sakarya, Turkey, 7-9 september, 2018

2) **A. Adil**, H. Özdemir. "Therapy with a Coronally Positioned Flap in a Mandibular Canine with Lingual Gingival Recession: A Case Report" (Poster sunumu), TDA 24TH INTERNATIONAL DENTAL CONGRESS, P-068, Ankara, Turkey, 27-30 September 2018.

# EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

**T.C.**
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ**
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
**( HADYEK)**

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI**

| | |
|---|---|
| **TOPLANTI TARİHİ** | **: 28. 02. 2020** |
| **TOPLANTI SAYISI** | **: 146** |
| **DOSYA KAYIT NUMARASI** | **: 715-1** |
| **KARAR NUMARASI** | **: 715-1** |
| **ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ** | **: Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR** |
| **YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR** | **: Araş. Gör. Dt. Amin ADİL** |
| | **Dr. Mete ÖZKURT** |
| **HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI** | **: Spraque Dawley ( 50 adet Erkek)** |

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR'**in araştırma yürütücüsü olduğu 715-1/2020 kayıt numaralı ve **"Ratlarda deneysel olarak indüklenen periodontitis modelinde alveoler kemik kaybı üzerine sistemik eritropoetin uygulamasının etkisi"** konulu çalışma; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Başkan)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)

Prof. Dr. Hakan ŞENTÜRK (Üye)

Prof. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Doç. Dr. Nurdan KARIMLIOĞLU (Üye)

Dr. Öğr. Üyesi Canan KOP BOZBAY (Üye)

Dr. Öğr. Üyesi Vet. Hek. Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Adres: Meşelik Kampüsü PK.26480 Odunpazarı/ Eskişehir
Telefon: 0 222 239 29 79 / (45 63)
E-posta: http://hadyek.ogu.edu.tr