

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**DİYABETİN PERİODONTAL HASTALIKLA İLİŞKİSİNDE
YARDIMCI T HÜCRELERİNİN ROLÜ VE RESOLVİNİN
İLTİHAPSAL PATOGENEZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

FATMA ÖNER

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL ERHAN FIRATLI**

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora öğrencisi Fatma ÖNER tarafından H. Erhan FIRATLI'nın danışmanlığında hazırlanan "Diyabetin Periodontal Hastalıkla İlişkisinde Yardımcı T Hücrelerinin Rolü ve Resolvinin İltihapsal Patogenez Üzerindeki Etkisi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05 / 04 / 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Funda YALÇIN
İstanbul Üniversitesi Diş Hek.Fak.
Periodontoloji Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

Prof.Dr. H. Erhan FIRATLI
İstanbul Üniversitesi Diş Hek.Fak.
Periodontoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof.Dr. Alpdoğan KANTARCI
Harvard Üniversitesi
Applied Oral Sciences

**Jüri**

Doç.Dr.Mustafa TUNALI
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hek.Fak.
Periodontoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Duygu YAMAN
İstanbul Üniversitesi Diş Hek.Fak.
Periodontoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatma ÖNER

İTHAF

Anneme ve babama ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Öncelikle öğrenci olduğum zamandan itibaren periodontolojiye her zaman ilgi duymamı sağlayan vebirlikte çalıştığımız süre boyunca sağladığı huzurlu ortam sayesinde fakülteyekeyifle gelmeme neden olan, asistanı olmaktan her zaman gurur duyduğum Prof. Dr. Erhan Fıratlı'ya, kattığı tüm sosyal ve akademik tecrübeler için, hayatımın çok büyük bir fırsatı olarak gördüğüm yurt dışına gitmemi sağladığı için ve özellikle son tez döneminde gösterdiği sabır ve gayret için,

Hayatta belki de en keyif aldığım ve bana her anlamda çok şey katan bir yılı geçirmeme imkan sağlayan, binlerce kilometre uzakta hem hoca hem ağabey olup hiç yalnızlık hissettirmeyen, onunla çalışmış olmaktan dolayı kendimi çok şanslı hissettiğim en umutsuz zamanlarda motivasyon kaynağı, beni başarabileceğime inandırıp yeni bir dünya ile tanıştıran Prof. Dr. Alpdoğan Kantarcı'ya,

Amerika'da bulunduğum süre boyunca varlığı bana her zaman güven veren, disiplinini, bilgisini ve zerafetini hep takdir ettiğim Prof. Dr. Hatice Hastürk'e

Aktardıkları bilgi ve tecrübeleri için Prof. Dr. Serdar Çintan'a, Prof. Dr. Gülден Işık'a, Prof. Dr. Funda Yalçın'a, Doç Dr. Ülkü Başer'e, Doç. Dr. Emine Çiftçi'na, Doç. Dr. Duygu Yaman'a ve ihtiyaç duyduğum her zaman yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Ali Çekici'ye

Tüm bilgi ve deneyimini sabırla defalarca bizimle paylaşan, edinmiş olduğum mesleki tecrübemin büyük çoğunluğunu borçlu olduğumDr. Gökhan Kasnak'a,

Sadece meslektaş değil aynı zamanda yeni bir aile de kazanmamı sağlayan, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve fakültenin tüm olumsuz koşullarını bile katlanabilir ve eğlenceli kılan Sema Özgen, Melis Soytürk, Yiğit Biren ve Burak İskefli başta olmak üzere tüm EF ailesi üyelerine,

Amerika'da bulunduğum süre boyunca yardıma ihtiyaç duyduğum her zaman büyük bir sabır göstererek yardımlarını esirgemeyen Wael Yaghmoor'a, Daniel Nguyen'e, Dani Stephens'e, Nadine Almpani'ye ve Carla Alvarez'e,

Her zaman arkamda dağ gibi duran, verdikleri koşulsuz destek ile bana güç veren yürüdüğüm yolda emin adımlar atmamamı sağlayan canım aileme tüm eğitim hayatım boyunca yanımda oldukları için, beni hep daha iyisine yönlendirdikleri için,

Her zaman benim için en iyisini isteyip beni benden daha fazla düşünen, arkamdaki gizli güç kaynağım aynı zamanda meslektaşım olan Dr. Şaziye Öner Ahçı'ya, verdiği tüm destekler için Dr. Serdar Ahçı'ya ve hayatıma kattığı tüm güzellikler için Aral Kartal Ahçı'ya

Büyük bir sabır ile her zaman bana destek olmaya çalışan, olaylara daha olumlu bakış açısı ile bakmamı sağlayan ve stresli zamanlarda tüm huysuzluklarımı hoş gören Bahadır Kırallı'ya

2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Burs Programı kapsamında bir yıl maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmektedir. Proje no: 1059B141600394

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET.....	XVİİ
ABSTRACT.....	XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Periodontal Hastalık.....	4
2.2. Periodontal Hastalığın Etiyolojisi.....	5
2.3. Periodontitisin patogenezinde rol alan hücreler	7
2.3.1. Nötrofiller ve vücut savunmasındaki rolleri.....	7
2.3.2. Yardımcı T Hücreleri (Th)	9
2.3.2.1. Th1 ve Th2 Hücreleri	9
2.3.2.2. Th17 Hücreleri	11
2.3.2.3. Düzenleyici T Hücreleri (Regulatory T cells, Treg)	19
2.3.2.4. Diğer Yardımcı T Hücreleri.....	22
2.3.3. Dendritik Hücreler ve Konak Savunmasındaki Roller.....	23
2.3.3.1. Toll-benzeri Reseptörler (Toll-like receptors, TLR).....	24
2.3.3.2. Dendritik Hücre Alt Grupları.....	26
2.4. Bağışık Sistemdeki Hücrelerin Periodontal Hastalıkla İlişkisi	30
2.4.1. T Hücreleri ve Periodontitis Arasındaki İlişki.....	30
2.4.1.1. Th1/Th2 Hücreleri.....	30
2.4.1.2. Th17 Hücreleri	31
2.4.1.3. Treg Hücreleri	32
2.4.2. Dendritik Hücrelerin Periodontitisle İlişkisi	33

2.5. Enflamasyonun Çözünmesi ve Endojen Lipid Mediyatörleri.....	33
2.5.1. Resolvin.....	35
2.6. Diyabet.....	36
2.6.1. Diyabetin Periodontal Hastalık Üzerine Etkisi.....	37
2.6.1.1. Diyabetin Periodontal Dokuları Etkileme Mekanizmaları	38
2.6.2. Periodontal Hastalığın Diyabet Üzerindeki Etkisi.....	39
2.6.2.1. Periodontal Hastalığın Diyabet Üzerindeki Etki Mekanizması	40
2.6.3. Diyabet ve Yardımcı T Hücreleri Arasındaki İlişki.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Kullanılan Materyaller ve Alındıkları Firmalar	43
3.2. <i>İn Vitro</i> Deneyler	43
3.2.1. Manyetik Olarak Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırma Sistemi (Magnetic activated cell sorting, MACS).....	45
3.2.2. T Hücre Farklılaşması	46
3.2.3. Dendritik Hücrelerin Uyarması ile Th17 Farklılaşması.....	48
3.2.4. Dendritik Hücre Olgunlaşması	49
3.3. <i>İn Vivo</i> Çalışma	49
3.3.1. Ligatür Kaynaklı Alveol Kemik Kaybı ve Oluşturulan Fare Grupları	49
3.3.2. Transjenik Farelerin Hazırlanması (ERV1).....	51
3.3.3. Diyabetik Farelerin Hazırlanması.....	51
3.4. Analiz Yöntemleri	52
3.4.1. FACS Analizi.....	52
3.4.2. Sitokin Seviyesi Ölçülmesi.....	53
Histolojik Analiz:	55
Kesitleri boyamak için izlenilen kullanılan materyaller, uygulanan adımlar ve gerekçeleri aşağıda anlatılmıştır.	55
3.5. İstatistik.....	56
4. BULGULAR.....	58
4.1. <i>İn Vitro</i> Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar.....	58
4.1.1. RvE1'in T Hücre Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi	58
4.1.2. RvE1'in Th17 Farklılaşması Üzerindeki Etkisi.....	61

4.1.3. RvE1`in Dendritik Hücreler Tarafından Uyarılan Th17 Hücreleri Üzerine Etkisi	69
4.1.3.1. RvE1`in T Hücre Aktivasyonu Üzerine Etkisi	69
4.1.3.2. RvE1`nin Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi	71
4.1.4. RvE1`in Dendritik Hücre Olgunlaşması ve Aktivasyonuna Etkisi	75
4.1.5. Dendritik Hücre ve T Hücreleri Üzerinde ChemR23 Sentezi	79
4.1.6. RvE1`in FoxP3 Sentezine Etkisi.....	80
4.2. <i>İn Vivo</i> Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar.....	82
4.2.1. Farelerden Elde Edilen Serum Örneklerinin Analizi	82
4.2.1.1. RvE1`in Th17 Farklılaşmasını Uyarıcı Mediyatörler Üzerine Etkisi.....	82
4.2.1.2. RvE1`in Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi	85
4.2.2. Farelerden Elde Edilen Üst Çene Kesitlerinin Histolojik Analizi	89
4.2.2.1. IL-17 Hücrelerinin Sayımı.....	89
4.2.2.2. IL-2 Hücrelerinin Sayımı.....	91
5. TARTIŞMA	94
5.1. Amacın Tartışılması.....	94
5.2. Yöntemin Tartışılması	99
5.3. Bulguların Tartışılması	103
5.3.1. <i>İn Vitro</i> Bulguların Tartışılması.....	103
5.3.2. <i>İn Vivo</i> Bulguların Tartışılması.....	112
5.3.3. Hücreler Üzerinde RvE1 Reseptörü ChemR23 Sentezi.....	115
SONUÇLAR	116
KAYNAKLAR	118
ETİK KURUL KARARI	155
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	156
ÖZGEÇMİŞ	157

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Yardımcı T Hücreleri ve salgıladıkları en önemli sitokinler.....	22
Tablo 2: Farelerde dendritik hücre alt grupları.....	28
Tablo 3: İnsanlarda dendritik hücre alt grupları.....	28



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nötrofiller hareketleri, endotel hücreler aracılığı ile doku içerisine geçişi ve bu sırada salgılanan adezyon molekülleri.....	8
Şekil 2-2: Antijen Sunan Hücreler Tarafından Uyarılan Farklılaşmamış T Hücreleri, Salgıladıkları Sitokinler ve Farklılaştıkları Yardımcı T Hücreleri	21
Şekil 2-3: Olgunlaşmamış dendritik hücrelerin antijenle karşılaşp olgunlaşması ve bu sırada geçirdiği fenotipik değişiklikler ile T hücrelerine antijen sunması	27
Şekil 3-1: Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı steril hood.....	44
Şekil 3-2: Fareden elde edilen dalak ve karın boşluğundaki yeri	45
Şekil 3-3: Hücre izolasyonunda kullanılan MACS sistemi	47
Şekil 3-4: U-bottom şeklinde 96 kuyucuktan oluşan plaka.....	48
Şekil 3-5: LUMINEX kiti ve analiz cihazı	54
Şekil 4-1: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi sırasında ilave edilen RvE1`in a) CD4 ve b) CD25 sentezine etkisi.	59
Şekil 4-2: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1`in a) CD4 b) CD25 sentezine etkisi	60
Şekil 4-3:Farklılaşmamış T hücrelerinin aktifleştirilmesi ve Th17`ye farklılaştırılması sırasında ilave edilen RvE1`in CD4 ⁺ CD25 ⁺ T hücrelerine etkisi a) birbirinden bağımsız 6 deneyin ortalama sonucu b) temsili olarak seçilen bir tane deneyin şematik görüntüsü	63
Şekil 4-4:Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1`in a) ROR γ t b) IL-17)üzerine etkisi	64
Şekil 4-5:CD4 ⁺ CD25 ⁺ hücreler tarafındn sentezlenen ROR γ t ve IL-17 miktarı a) ROR γ t b) IL-17..	65
Şekil 4-6:Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17`ye farklılaşması sırasında ilave edilen RvEin sitokin salınımına etkisi a) IL-17A b) IL-1F c) IL-10 d) IL-21 e) IL-2 seviyeleri	67
Şekil 4-7: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1`in a) CCR6 b) CCL20 sentezine etkisi.	68

Şekil 4-8:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen CD4 ve CD25 reseptörleri. Birbirinden bağımsız 6 deney ortalamasına göre a) CD4 miktarı b) CD25 miktarı.....	70
Şekil 4-9:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen CD4 ⁺ CD25 ⁺ T hücreleri a) birbirinden bağımsız 6 deneyin ortalama sonucunu b) temsili olarak seçilen bir tane deneyin şematik görüntüsü	72
Şekil 4-10:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen a) ROR γ t b) IL-17 reseptörleri. CD4 ⁺ CD25 ⁺ T hücrelerinin sentezlediği c) IL-17 d) ROR γ t reseptörleri.....	74
Şekil 4-11: Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu salgılanan a) IL-17A b)IL-2 c) CCL20 sitokinleri ve sentezlenen d) CCR6 reseptörü	75
Şekil 4-12:PAM3CSK4 ile uyarılan dendritik hücrelerin salgıladığı a) IL-6 b) IL-2 ve c) TGF β	77
Şekil 4-13:PAM3CSK4 ile uyarılan dendritik hücrelerin sentezlediği a) CD86, b)CD80 c) MHC II ve d) CD40 reseptörleri.	78
Şekil 4-14: Hücreler tarafından sentezlenen chemR23 seviyesi a) TGF β ve IL6 ile uyarılan T hücreleri tarafından sentezlenen b) PAM3CSK4 varlığında dendritik hücreler tarafından uyarılıp farklılaşan T hücreleri ve dendritik hücreler tarafından sentezlenen c) PAM3CSK4 ile uyarılıp aktiveleştirilen dendritik hücreler tarafından sentezlenen	80
Şekil 4-15:Hücreler tarafından sentezlenen FoxP3 reseptörü a)TGF β ve IL6 ile uyarılan T hücreleri tarafından b) dendritik hücrelerin varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılıp farklılaşan T hücreleri tarafından sentezlenen	81
Şekil 4-16: RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde a) IL-6, b) TGF β ve c) IL-1 β salınımına etkisi	84
Şekil 4-17: RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde IL-23 salınımına etkisi	85

Şekil 4-18: RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde a)IL-17A b)IL-17F ve c) CCL20 salgılanmasına.	87
Şekil 4-19: RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde IL-10 salgılanmasına etkisi.	88
Şekil 4-20:RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler tarafından sentezlenen IL-17 sitokinin seviyesi a) üç farklı fare grubunun ortalama değeri b) temsili olarak seçilen boyama örnekleri	91
Şekil 4-21:RvE1`in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik farelerin salgıladığı IL-2 sitokin miktarına etkisi a) birbirinden farklı üç fare grubundan elde edilen ortalama değeri b) IL-2 antikoru ile boyanan ve rastgele seçilen hücre kesitlerini göstermektedir.....	93

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Rv:	Resolvin
Th:	Yardımcı T hücresi
Treg:	Düzenleyici T hücresi
DC:	Dendritik hücre
pDC:	Plasmacytoid dendritik hücre
mDC:	Myeloid dendritik hücre
cDC:	Konvansiyonel dendritik hücre
T1D:	Tip 1 diyabet
T2D:	Tip 2 diyabet
KP:	Kronik periodontitis
LAP:	Lokalize agresif periodontitis
IL:	Interlökin
IFN:	Interferon
TNF:	Tümör nekrotizan Faktör
TGF:	Transforming büyüme faktörü
CCR:	Kemokin benzeri reseptör
CCL:	Kemokin benzeri ligand
MMP:	Matrix metalloproteinaz
PG:	Prostaglandin
MHC:	Dokuların uyumundan esas sorumlu olan yapı
CD:	Yardımcı uyarıcı moleküller
TLR:	Toll-like reseptörler

PRR:	Molekül tanıma reseptörü
TCR:	T hücre reseptörü
BCR:	B hücre reseptörü
LPS:	Lipopolisakkarit
T-bet:	T-box transkripsiyon faktörü
GM-CSF:	Granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör
G-CSF:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
JAK:	Januse kinase
STAT:	Transkripsiyon dönüştürücü ve aktive edici sinyal
NF- κ B:	Nükleer faktör kappa B
RANK:	NF- κ B'nin reseptör aktivatörü
RANKL:	NF- κ B'nin reseptör aktivatör ligandı
OPG:	Osteoprotegerin
RA:	Romatoid artrit
MS:	Multiple skleroz
EAE:	Deneyisel otoimmün ensefalomyelit
CIA:	Kollajen artrit
KOAH:	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
EPA:	Eicosapentaenoic asit
AGE:	İleri glikasyon son ürünleri
RAGE:	İleri gliasyon son ürünleri reseptörü
PBS:	Steril fosfat içeren solüsyon
MACS:	Manyetik olarak aktifleştirilmiş hücre ayırıştırma sistemi
db/db:	Tip 2 diyabeti taklit eden fareler

ERV1: chemR23 reseptörü fazla sentezlenen fareler
db/ERV1: chemR23 reseptörü fazla sentezlenen diyabetik fareler



ÖZET

Öner F. Diyabetin periodontal hastalıkla ilişkisinde yardımcı T hücrelerinin rolü ve resolvinin iltihapsal patogeneze üzerindeki etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul 2019.

Periodontitis ve diyabet konak savunması tarafından yönetilen kronik enflamatuvar hastalıklardır. Her iki hastalık da çift yönlü olarak birbirlerinin etkilerini artırmaktadırlar. Th17 hücreleri salgıladıkları IL-17 sitokini ile kronik enflamatuvar hastalıklarda yıkıcı karakterde görev yapmaktadırlar. T hücrelerinin etki gösterebilmesi için dendritik hücre gibi antijen sunan hücreler tarafından uyarılmaları gerekmektedir. Akut enflamatuvar yanıtta rol alan resolvinler enflamasyonun çözünmesini sağlayarak vücudun enfekte olmadan önceki durumuna dönmesini kolaylaştırmaktadırlar. Çalışmamızda *in vitro* olarak aykozapentaenoik asit türevi olan resolvin E1(RvE1)'in Th17 hücre farklılaşmasını önlediği hipotezini test ettik. Bu hipotezden yola çıkarak RvE1'in dendritik hücrelerin aktivasyonu, farklılaşmamış T hücrelerini uyarıp Th17 hücrelerine dönüştürmesi ve spesifik sitokinlerin farklılaşmamış T hücrelerini Th17 hücrelerine dönüştürmesi sırasında olan etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla sadece dendritik hücrelerden, spesifik sitokinler varlığında T hücrelerinden ve her iki hücre grubundan oluşan üç farklı deney modeli tasarladık. *In vivo* olarak RvE1'in diyabet ve periodontitiste sentezlenen Th17 hücre sayılarını azaltarak anti-enflamatuvar etki gösterdiği hipotezini test ettik. Bu nedenle RvE1'in periodontitis oluşturulmuş diyabetik farelerde Th17 farklılaşmasına etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmada periodontitis oluşturulan diyabetik farelere RvE1 tedavisi uygulanmıştır. Alınan serum örneklerinde sitokin analizi ve üst çene kesitlerinde hücre boyaması yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarımızın sonucunda RvE1'in dendritik hücrelerin aktivasyonunu, T hücre aktivitesini, Th17 farklılaşmasını ve kemoatraktivitesini baskıladığı azalan reseptör sentezi ve sitokin miktarları ile gösterilmiştir. *In vivo* olarak ise diyabette Th17 farklılaşmasını sağlayan belirteçlerin seviyelerini düşürdüğü fakat Th17 hücreleri üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Bu bulgular ışığında *in vitro* olarak

Th17 farklılaşmasını baskılayan RvE1`in etkisi, *in vivo* olarak diyabet ve periodontitiste Th17 farklılaşmasını tetikleyen belirteçler miktarlarını azaltması ile sınırlı kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Th17, IL-17, resolvin, diyabet, periodontitis

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmektedir. Proje no: 1059B141600394



ABSTRACT

Öner F. Role of T helper cells in the relation of diabetes with periodontal disease and the effect of resolvin on inflammatory pathogenesis. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Periodontology. Istanbul. 2019.

Periodontitis and diabetes are chronic inflammatory diseases. Both are mediated by the host response and affect each other reciprocally. Th17 cells have destructive roles in chronic inflammatory disease via the secretion of IL-17. As a member of antigen presenting cells, dendritic cells interact with antigens and induce T cell activation. Resolvins have critical roles in the resolution of inflammation and restore homeostasis. In this study, we tested the hypothesis that RvE1 inhibits Th17 cell differentiation. We designed three different *in vitro* experiments. First, activated dendritic cells were treated by RvE1 to check the impact of RvE1 on dendritic cell activation. Second, T cells and dendritic cells were cultured together to check the impact of RvE1 on dendritic cell-stimulated Th17 differentiation. Third, T cells were induced by IL-6/TGF β to measure the impact of RvE1 on Th17 differentiation. In parallel, we evaluated the impact of RvE1 on periodontitis and diabetes in a murine model and assessed the role of Th17 cells. Experimental periodontitis was induced in the diabetic mice and then they were treated by RvE1. *In vitro* results showed that RvE1 decreased T cell activation, inhibited Th17 differentiation and chemoattraction, prevented activation of dendritic cells. *In vivo* results showed that RvE1 decreased pro-inflammatory markers responsible for Th17 differentiation in the diabetic mice but had no effect over the cell population. These results collectively demonstrated that RvE1 decreases markers responsible for Th17 differentiation *in vitro* and *in vivo* but its impact to inhibit Th17 differentiation was limited only by *in vitro* studies.

Key words: Th17, IL-17, resolvin, periodontitis, diabetes

This study was supported by The Scientific and Technological Research Council Of Turkey (TUBITAK). Project no: 1059B141600394



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontitis, dişi çevreleyen periodontal dokularda görülen yıkıcı karakterde ve bakteri kaynaklı enfeksiyona karşı gelişen kronik bir iltihaptır, ilerlemesi sonucunda destek kemik dokular rezorbe olarak diş kaybı gerçekleşir(59). Sadece patojenik biyofilm periodontitis oluşumu için yeterli değildir. Mikroorganizmalar ile vücudun savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu diş etinde lokalize olan enflamasyon ilerleyerek doku yıkımını başlatmaktadır (121). Vücut savunması fibroblastlar, lenfositler ile birlikte polimorfonükleer lökositlerin (nötrofiller) ve makrofajların da yer aldığı pek çok hücreden oluşan organize bir sistem aracılığıyla sağlamaktadır; bu hücrelerden herhangi birisinde görülen rakamsal veya fonksiyonel bir problem kişinin periodontitise daha yatkın olmasına neden olmaktadır (80). Doğal ve kazanılmış bağışık yanıt elemanları vücudun oluşturduğu konak savunmasını belirlenmesinde esas rolü üstlenmektedir; kazanılmış bağışık yanıt da ürettikleri spesifik antikolar ile T ve B lenfositlerinin kontrolünde fonksiyon göstermektedir (13). Yapılan çalışmalarda periodontitisli bireylerden elde edilen örneklerde artmış T hücre popülasyonu olduğu gözlemlenmiştir (77), yardımcı T hücresi (Th) ailesine ait olan Th17 hücreleri IL-17 sitokini aracılığı ile kronik enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda doku yıkımını tetikleyecek şekilde görev yapmaktadırlar (164). Periodontitisli bireylerde artmış Th17 hücre popülasyonu ve IL-17 sitokini pek çok klinik ve hayvan çalışması ile gösterilmiştir (173,183, 230, 247, 297).

Doğrudan antijenle temas etmeyen T hücreleri, fonksiyon göstermeleri için antijen sunan hücreler tarafından aktiveleştirilmeleri gerekmektedir. Yüksek antijen tutma kapasiteleri ile dendritik hücreler en önemli antijen sunan hücreler grubunda yer almaktadır. Antijeni yakalayan bu hücre grubu olgunlaşıp aktifleşerek lenfoid dokulara göç ederler ve orada yoğun olarak bulunan T hücreleri ile temasa geçerler. Yakaladıkları antijeni T hücrelerine sunarak kazanılmış bağışık cevabı başlatmaktadırlar (64).

Enflamatuvar yanıt başladığı zaman konak savunması pro-enflamatuvar hücreleri ve onların salgıladığı mediyatörleri ortamdan temizlemek için birtakım durdurucu sinyaller salgılar. Salgılanan bu sinyaller enflamasyonun çözünmesini

sağlayarak oluşan hasarı sınırlamayı ve dokuların mümkünse rejenere olarak iyileşmesini hedeflemektedir. Programlanmış aktif bir olay olarak kabul edilen çözünme vücutta üretilen endojen lipid mediatörleri tarafından yönetilmektedir (114).Endojen lipid mediatörleri protectin, maresin, lipoxin ve resolvin olmak üzere dört alt grupta incelenmektedir. Resolvinler, diyetle alınan omega 3 doymamış yağ asitlerinin vücuttaki enzimler aracılığı ile metabolize olması sonucu üretilmektedirler. Aykozapentaenoik asit kökenli olan E grubu resolvinlerhasar bölgesine daha fazla nötrofil gelmesini önleyerek, ölü hücreler ile doku artıklarının da ortamdan uzaklaştırılmalarını sağlayarak mevcut enflamasyonu çözünmesini kolaylaştırmaktadırlar (225).

Diyabet, pankreasta bulunan β hücrelerindeki otoimmün yıkım sonucu gelişen insülin üretimindeki bozukluk sonucu (Tip 1 diyabet,T1D) veya yeterli insulinin salgılanamaması veya insüline karşı direnç gelişmesi sonucu (Tip 2 diyabet,T2D) oluşan metabolik bir hastalıktır (158). Diyabetin patogenezinde insülin ile alakalı görülen bu problemlerin yanı sıra sürekli devam eden fakat çok şiddetli olmayan enflamasyon da yer almaktadır; buna bağlı olarak diyabetik bireylerde yüksek oranda seyreden enflamatuvar mediatörler çeşitli komplikasyonlara yol açmaktadırlar. Artmış pro-enflamatuvar sitokinler olması ortamda bulunan yardımcı T hücre popülasyonunun da arttığını göstermektedir. T2D olan hasta popülasyonunda artan Th17 hücre sayısı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (91, 107, 186). Diyabetin komplikasyonlardan biri olan periodontitis ile diyabet arasında birbirinin şiddetini artıran, kontrolünü zorlaştıran çift yönlü bir ilişki bulunmaktadır (68). Her iki hastalık arasındaki pozitif ilişki yapılan pek çok hayvan çalışması ve epidemiyolojik çalışma ile ispatlanmıştır (42).

Biz çalışmamızın *in vitro* ve *in vivo* olarak iki aşamada tamamladık.*In vitro* ayağında RvE1'in farklılaşmamış T hücrelerinin Th17 hücrelerine proliferasyonunu önlediği hipotezini test ettik. Çalışmamızın amacını antijenin vücuda ilk girdiği ve dendritik hücreler tarafından yakalanıp farklılaşmamış T hücrelerinesunulduğu aşamadan Th17 hücrelerinin oluştuğu aşamaya kadar RvE1'in etkisini araştırmak oluşturmaktadır. Bu nedenle de antijenle karşılaşan dendritik hücrelerin geçirdiği aktifleşme ve olgunlaşma aşamasında, yakaladıkları antijeni farklılaşmamış T

hücrelerine sunması ve salgılanan spesifik sitokinlerin farklılaşmamış T hücrelerini uyarması aşamalarında ortama RvE1 ilave ederek Th17 farklılaşmasını değerlendirdik.

Çalışmamızın *in vivo* bölümünde ise RvE1`in hem periodontitiste hem diyabette sentezlenen Th17 hücre sayısını azaltarak anti-enflamatuvar etki gösterdiği hipotezini test ettik. Buradan yola çıkarak RvE1`in periodontitis oluşturulmuş diyabetik farelerde Th17 sentezlenmesine olan etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmanın bu bölümünde RvE1 reseptörü fazla sentezlenen/sentezlenmeyen, diyabetik fare modellerinde ligatürle yapay periodontitis oluşturulmuştur. RvE1 ile tedavi edilen bu farelerin serum örneklerinde Th17 ile ilişkili sitokinlerin analizi yapılmış, üst çene kesitleri alınarak spesifik antikorlar ile boyama ve hücre sayımı yapılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalık

Dünya sağlık örgütü (WHO), ‘sağlık’ terimini hastalık veya fiziksel yetersizlik olmaması durumunun yanı sıra fiziksel, mental ve sosyal olarak iyi olma durumu olarak belirtmiştir (WHO) (280). Bu tanımdan yola çıkarak periodontal sağlık; klinik olarak kanama, şişlik, kızarıklık ve ağrı gibi inflamasyon belirtilerinin olmadığı, vücudun doğal dengesi (homeostaz) ile uyumlu biyolojik ve enflamatuvar belirteçlerin olduğu aynı zamanda dokuların normal fonksiyonlarını yerine getirdiği durum olarak tanımlanmaktadır (41). Periodontal hastalık; diş çevreleyen ve periodonsiyum olarak isimlendirilen diş eti, sement, periodontal ligaman ve alveol kemiği dokularında görülen kronik enflamatuvar durumları kapsamakta ve çeşitli evrelerden oluşmaktadır; diş etinde sınırlı enflamasyon ile başlayan gingivitis tedavi edilmediği durumda periodontal membran ve alveol kemiği etkileyecek şekilde ilerleyip sonunda diş kaybına neden olabilmektedir; bu durum da periodontitis olarak isimlendirilmektedir (121).

Hızlı yıkım atakları dışında genellikle kronik bir itihap şeklinde ilerleyen periodontitis sistemik faktörler (diyabet, HIV enfeksiyonu) ve çevresel faktörler (sigara, stres) tarafından da modifiye edilmektedir(9). Eski sınıflamada (18) kullanılan kronik, agresif ve nekrotizan periodontitis gibi ayırımlar yeni sınıflama ile birlikte ortadan kaldırılarak periodontitis tek bir başlık altında toplanmıştır. Yeni sınıflamada periodontitis; şiddetine (radyografide görülen kemik kaybının miktarı, interdental bölgede bulunan klinik ataşman kaybı ile kayıp diş sayısı), karmaşıklığı (kemik kaybının şekli, sondalanan maksimum derinlik ve furkasyon katılımının varlığına) ve etkilediği alanın genişliğine göre; başlangıç periodontitisten tüm dentisyonu kapsayacak şekilde yaygın, diş kaybetme potansiyeli olan ilerlemiş periodontitise kadar 4 aşamaya ayrılmıştır. Bu aşamalar da hastalığın ilerleme hızını saptamak için kendi içerisinde A, B ve C gibi sınıflara ayrılmıştır. Bu alt gruplarda ise son 5 yıl içerisinde radyografide gözlemlenen değişim, kemik kaybının hastanın yaşına olan oranı, mevcut biyofilm

miktarı ve hastalığın prognozunu etkileme potansiyeli olan sigara, diyabet gibi faktörler değerlendirmeye alınacaktır (259).

2.2. Periodontal Hastalığın Etiyolojisi

Sağlıklı olan ve olmayan periodontal dokuların çevresinden alınan diş eti oluğu sıvısı ile diş eti biyopsi örneklerinin incelenmesi sonucu periodontitisin temel etyolojik faktörünün mikroorganizmalar olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı dokuda Gram (+) bakteri egemenliğindeki oral mikrobiyal kompleks konak ile simbiyotik ilişki gösterirken enfekte dokuya geçildikçe floranın Gram (-) bakteri egemenliğine doğru kaydığı gözlemlenmiştir. Periodontal hastalık yararlı bakterilerin azalıp, patojenik özellik gösterenlerin arttığı hastalıklar arasında yer almaktadır. Vücuttaki mikroorganizmalar arasındaki dengenin bozulması sonucu görülen medikal durumlar disbiyozis olarak isimlendirilmektedir ve periodontitis de bu grupta yer almaktadır(59).Supragingival ve subgingival alanlarda mikrobiyal dental plak farklı bileşenlerden oluşmaktadır. Periodontitisi olan bireylerin subgingival bölgesinden alınan plak mikroskopik olarak incelendiği zaman periodontitisi olmayan bireylerden elde edilen dokulara göre daha yüksek düzeyde anaerobik (%90) gram negatif (%75) bakteri türlerine rastlanılmıştır (61, 236). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Campylobacter rectus* (Cn), *Eikenella corrodens* (Ec)ve spiroketler periodontitis ile doğrudan ilişkili bulunarak temel periodontopatojenler olarak tanımlanmışlardır (62, 169). Sağlıklı periodonsiyumu olan ve periodontal hastalığa sahip bireylerden alınan örneklerle yapılan mikrobiyolojik çalışmada, periodontitis ve sağlıklı grupların mikrobiyal profillerinin tamamen farklı olduğu, gingivitisli bireylerin ise bu iki grubun ortalaması bir profile sahip olduğu bulunmuştur. Bulunan bakterilerin tamamının tür açısından incelendiği zaman gingivitis ile sağlıklı dokular arasında ve kronik ile agresif periodontitis grupları arasında belirgin bir farklılık bulunamamıştır; sadece agresif periodontitis grubunda kronikten farklı olarak *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Neisseria elongate* (Ne),

Pseudoramibacter alactolyticus (Pa), *Prevotella intermedia(Pi)*türleri daha yoğun olarak görülmektedir (79).

Periodontopatojen mikroorganizmaların varlığı periodontitisin oluşması için ön koşul olarak gerekli olsa da tek başlarınyeterli değildir. Periodontal hastalık, biyofilm ile vücut bağışık yanıtın birbirleri ile olan etkileşimleri sonucunda gelişmektedir(161). Hastalığın ilerlemesi ile şiddeti isenötrofil ile birlikte makrofajların, lenfositlerin ve en sonunda fibroblastların rol aldığı konak yanıt tarafından şekillenmektedir(189). Mevcut bakteri plağına karşı oluşan bağışık yanıt hücresel düzeyde 4 aşamada incelenmiştir;

1. nötrofil egemenliğinde yönetilen başlangıç lezyon
2. makrofajlar ile birlikte T hücrelerinin egemenliğindeki erken lezyon
3. plazma hücrelerinin sayıca arttığı yerleşmiş lezyon
4. diğer hücrelerin yanı sıra fibroblastların da devreye girdiği ilerlemiş

lezyondur.

Buna göre başlangıç lezyonundan ilerlemiş lezyona doğru gidildikçe;egemen hücreler daha kompleks olmaya başlar, bazal hücreler prolifer olmaya başlar ve bağlantı epitelinin apikale doğru göçü gerçekleşir, fibroblastlarda sitopatolojik değişiklikler meydana gelirken diş eti bağ dokusunda kollajen kaybı meydana gelir ve ilerlemiş lezyonda gelindiği zaman ise kemik kaybı görülür. Orta ve şiddetli gingivitisin dahil olduğu yerleşmiş lezyon her zaman ilerleyip kemik kaybına neden olacak şekilde periodontitise halini almaz; bu aşamada konak yanıtı devreye girerek hastalığın ilerleyişi ve şiddetini belirlemektedir (190). Daha sonra yayınlanan bir araştırma periodontal sağlıklı dokulardan periodontitise doğru hastalığın oluşması ve ilerlemesini aşamalı olarak 4 gruba ayırmıştır;

- 1) Akut bakteriyel yanıt (pelikıla yerleşip diş eti dokusunu ilk olarak istila eden bakterilere karşı oluşan yanıt)
- 2) Akut enflamatuvar yanıt (bakterilere karşı oluşan orta şiddetteki enflamatuvar yanıt)

3)Bağışık yanıt (lokal ve sistemik olarak bağışık yanıtı yönlendiren mononükleer hücrelerin aktivasyonu)

4)Düzenleme ve çözülme (akut karakterde olan koruyucu konak yanıtından yıkıcı kronik enflamatuvar yanıtı geçiş aşaması).

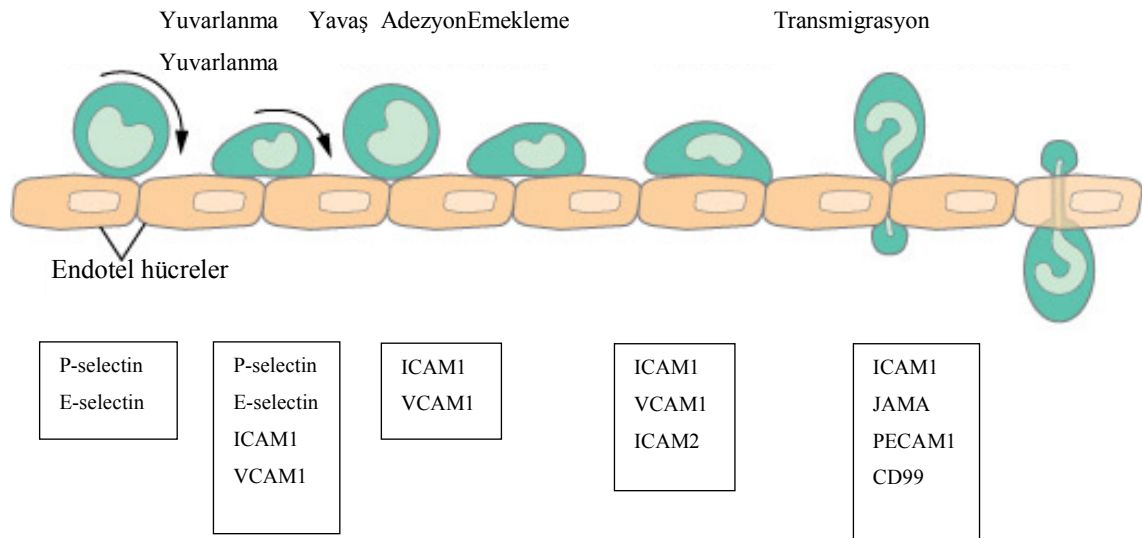
Konak yanıtının bakteri ve bakteri ürünleri ile onlara karşı oluşan konak savunması tarafından şekillendirildiği aynı zamanda içsel ve dışsal faktörler tarafından modifiye edildiği belirtilmiştir (125).

2.3. Periodontitisin patogenezinde rol alan hücreler

2.3.1. Nötrofiller ve vücut savunmasındaki rolleri

Sağlıklı periodontal dokularda devamlı olarak herhangi bir yıkıma neden olacak kadar şiddetli olmayan mikrobiyal atak bulunmaktadır. Vücutta bu mikrobiyal atığa yanıt olarak her zaman düşük seviyede gerçekleşen lökosit infiltrasyonu mevcuttur ve bu durum kontrollü enflamasyon olarak isimlendirilmektedir. Bağlantı epiteli ile diş eti dokusu arasında devamlı olarak gerçekleşen lökosit akışının sınırlı düzeyde kalmasını sağlayan kontrollü enflamasyon meydana gelebilecek doku yıkımını önlemektedir (162). Herhangi bir mikroorganizma veya dokunun fiziksel olarak yaralanması sonucu meydana gelen ilk enflamatuvar yanıtın tetiklemesi ile mikroorganizma tarafından patojenle ilişkili moleküler yapılar (PAMP) veya doku tarafından hasarla ilişkili moleküler yapılar (DAMP) salgılanır. Salgılanan bu sinyaller mast hücresi, makrofaj ve dendritik hücrelerden oluşan doğal bağışık yanıtı hücrelerini harekete geçirerek çeşitli pro-enflamatuvar mediatörleri salgılamalarını sağlarlar. Bu mediatörlerin salgılanmasını takiben öncelikle enfeksiyon bölgesinde bulunan endotel hücreler aktifleşerek nötrofillerin kan dolaşımından enfekte alana doğru göç hareketinin başlamasını sağlarlar (274). Bu göç endotel hücreler ve nötrofiller arasındaki farklı afiniteli adeziv reaksiyonlar sonucu gerçekleşmektedir, sırası ile endotel hücre yüzeyinde bulunan moleküllerin (P veya E-selektin) nötrofiller üzerinde bulunan glikoprotein ligandlarına

bağlanması ile geçici olarak başlayan bu süreç daha sonra transendotelyal göçün gerçekleşmesine imkan sağlayacak şekilde sıkı adezyona dönüşmektedir. Nötrofillerin ilk hareketi yuvarlanma (rolling) daha sonrakiler ise emekleme (crawling) şeklinde isimlendirilmektedir. β 2-integrinleri tarafından yönetilen adezyon ve yuvarlanma hareketleri ICAM-1 ve ICAM-2 reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir (197, 274). Aktive olan nötrofiller fagositoz ile mikroorganizmaların hücre içinde öldürülmesini sağlarken salgıladıkları enzimler de lokal doku yıkımını gerçekleştirmektedir(162). 2-1 numaralı şekilde nötrofillerin endotel doku içerisine geçişi ve bu sırada salgılanan adezyon molekülleri gösterilmiştir. Akut enflamatuvar lezyon olgunlaştıkça, nötrofillerde programlanmış hücre ölümü (apoptosis) görülür. Nötrofillerden sonra enflamatuvar bölgeye gelip makrofaja dönüşen monositler; nonfilogistik fagositoz ile ölü hücre ve doku atıklarını temizlerler sonrasında da lenfatik sistem tarafından ortamdan temizlenmektedirler. Tüm bu aşamalar akut enflamatuvar yanıtın sonuçlarıdır, fakat yeterli olmadığı veya etkenin ortadan kalkmadığı durumlarda enflamasyonun çözünmesi gerçekleşmeyip vücudun homeostaza geri dönmesi mümkün olmamaktadır, böyle bir durumda enfeksiyon kalıcı hale gelip kronikleşmektedir(114).



Şekil 2-1: Nötrofiller hareketleri, endotel hücreler aracılığı ile doku içerisine geçişi ve bu sırada salgılanan adezyon molekülleri

2.3.2. Yardımcı T Hücreleri (Th)

Kazanılmış bağışık yanıtın esas elemanları T ve B lenfositleridir ve bu hücreler taşıdıkları reseptörleri aracılığı ile (T hücre reseptörü, TCR ve B hücre reseptörü, BCR) fonksiyon göstermektedirler. Birbirlerine benzer yapılara sahip TCR ve BCR fonksiyonları farklıdır; hücre dışında yaşayan patojenlere karşı savunma B hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Sıvısal bağışıklık olarak da isimlendirilen bu durum vücudun her yerindeki enflamatuvar durumlara karşı üretilen çözülebilir antikorlar ile etki göstermektedirler. B hücreleri antijenleri doğrudan tanıma kapasitesine sahip olmalarına rağmen kendilerine makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından antijen sunulmaktadır, bunun yanı sıra fonksiyon göstermek için de genellikle aktif T hücrelerinin yardımına gereksinim duymaktadırlar. B hücreleri üzerinde aynı dendritik hücrelerde olduğu gibi TLR mevcuttur, ancak BCR ile TLR birlikte uyarıldığı durumlarda T hücre yardımına ihtiyacı olmadan B hücreleri fonksiyonlarını gösterebilirler (58). T hücreleri ise üretmiş olduğu sitokinler sayesinde hücre ile birlikte yaşayan enfeksiyon ajanlarına karşı savunma yapmaktadırlar. Bu da hücresel bağışıklık adını almaktadır. Kendisine antijen sunan hücrelerin (APC) ile yüzey reseptörleri ile etkileşimi sonucu farklılaşmamış T hücreleri (Th0) yardımcı T hücrelerine (Th) dönüşmektedirler. Hangi T hücresine dönüşeceği ise Th0'i etkileyen sitokin tarafından belirlenmektedir (80).

2.3.2.1. Th1 ve Th2 Hücreleri

Yakın zamana kadar yardımcı T hücreleri konusundaki çalışmalar Th1 ve Th2 ile sınırlanmıştı, tüm bağışık yanıt Th1/Th2 modeli ile açıklanmaktaydı (172). Bu modele göre; IFN γ , IL-2, TNF α üreten Th1 hücreleri makrofajların aktive olmasını, antikora bağlı hücre toksisitesini ve gecikmiş hücre hassasiyetini sağlamaya yardımcı olmaktadır (201). Fagositöz sonucu oluşan konak yanıtını yöneten Th1 (116) , virüs ve

bakterilerin dahil olduğu hücre içi patojenlerden ve otoimmün hastalıklardan sorumludurlar(47, 263). IL-4, IL-13 ve IL-5 salgılayanTh2 hücreleri (3) ise helmintler ve diğ er hücre dışı mikroorganizmalardan ve astım gibi alerjik reaksiyonlardan sorumludurlar (298). Th1 hücreleri mast hücrelerini üreterek, eozinofillerin büyümesine ve farklılaşmasına neden olurken, IgA sentezleyerek sıvısal bağışıklığa da katkı sağlamaktadır (182).

Farklılaşmamış T hücrelerinin özelleşmiş T hücrelerine proliferasyonu, hücreyi uyaran mediyatöre bağlı olarak Januse Kinase(JAK) ile Signal transducer and activator of transcription(STAT) yolu ile başlatılmaktadır. JAK, reseptör olmayan tyrosin kinaz ailesinin on üyesinden birtanesidir. (Kinaz; fosforilasyon adı ile de bilinen yüksek enerjili fosfat moleküllerinin daha küçük özelleşmiş yapılara dönüşmesini sağlayan bir enzimdir.) Bağışık yanıtı başlatmak amacı ile salgılanan sitokinlerin JAK reseptörüne bağlanmaları ile birlikte aktive olan JAK molekülleri reseptörlerin fosforilasyonu sonucu sinyal ileten moleküllere (STAT) kenetlenme imkanı sağlayacak alanlar oluşturmaktadırlar (285). Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b and Stat6 olmak üzere 7 farklı tip STAT vardır, hareketsiz durumda olan STAT proteinleri açığa çıkan metabolik enerji yardımı ile hücre çekirdeğine doğru göç ederek oradaki hücre DNA'sına bağlanırlar, burada nükleer fosfotaz ile açığa çıkan defosforilasyon sonucu DNA tarafından aktif STAT proteini salgılanır (166).

IL-12; STAT4, STAT1 ve T-box transkripsiyon faktörü (T-bet) aracılığıyla farklılaşmamış T hücrelerinin Th1'e (246) IL-4 ise STAT6 ve transkripsiyon faktörü GATA3 aracılığı ile Th2'ye dönüşmesini sağlamaktadırlar (297). IL-4 ve IL-13 gibi Th2 üretimini uyaran sitokinler makrofaj fonksiyonlarını (53), STAT6-GATA3 yolu da IL-12 reseptörünün beta-2 alt ünitiin salgılanmasını baskılayarak (188) Th0'dan Th2'ye farklılaşma esnasında Th1 hücrelerinin salgılanmasının inhibe edilmesine neden olmaktadır(80).

2.3.2.2. Th17 Hücreleri

IL-17 proteini ve IL-17'yi kodlayan gen (il17) ilk olarak sitotoksik T lenfositleri ile ilişkili antijen(CTLA8) olarak kemirgenlerde keşfedilmiştir (209). İnsanlarda ise romatoid artritli bireylerin sinoviyal dokularında rastladıkları IL-17'nin, fibroblastları etkileyerek IL-6 ve IL-8 üretimini sağladığı bulunmuştur ve IL-6 sentezledikleri için kronik enflamasyon ile ilişkilendirmişlerdir(70). Daha sonra *Borrelia burgdorferi* (Laym hastalığına neden olan spiroket) tarafından uyarılan T hücrelerinin IL-17 salgıladığını fakat salgılanan bu sitokinin Th1 veya Th2 hücreleri ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (103). Hayvan modeli çalışmalarında deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) ve tip 2 kollajen artrit (CIA) oluşturulmuş farelerde hastalığın ilerlemesinden ve şiddetinden sorumlu olarak IL-17 sitokini ve onu üreten özelleşmiş CD4⁺ T hücreleri olduğu fakat bu hücrelerin IFN γ üretmediği tespit edilmiştir; böylelikle Th17 hücreleri IL-17 üretiminden sorumlu olarak Th1/Th2 modeline dahil olmuşlardır(52,84, 175). Daha sonra Th17 hücrelerinin fenotipine, farklılaşmasına ve özelliklerine yönelik pek çok araştırma yapılmıştır.

Th17 ailesi ve IL-17'nin yapısal ve fonksiyonel özellikleri

Th17 ailesi; IL-17, IL-21, IL-23, IL-22, IL-26, IL-6, IL-1 β , TGF β , TNF ve GM-CSF gibi geniş bir sitokin profilinin salgılanmasından sorumludur. Salgılanan bu mediatörler arasında IL-17, Th17 hücrelerinin sembolik sitokini olarak ön plana çıkmaktadır. IL-17; IL-17A'dan IL-17F'ye kadar 6 farklı üyeden oluşsa da esas üyelerini IL-17A ile IL-17F oluşturmaktadır ve aslında IL-17 ile belirtilmek istenen IL-17A sitokindir. Moleküler olarak homodimer yapıda olan IL-17, intramoleküler disülfid bağlarla bağlanmış iki farklı monomerden oluşmaktadır. IL-17A ile IL-17F'nin yapısal olarak aynı olduğu fakat fonksiyonlarında bazı farklılıklar olduğu söylene de bu konuda yeterince çalışma yapılmamıştır. IL-17C'nin Th17 salgılanmasını artırdığı, IL-

17E'nin (IL-25 olarak da bilinmektedir) ise azalttığı söylenmektedir fakat yine aynı şekilde bu konuların da daha derinlemesine araştırılması gerekmektedir (164).

İn vitro çalışmalarla farklılaşmamış T hücrelerinden Th17 farklılaşması için en az üç gün geçmesi gerektiği belirlenirken hücre kültürlerinde birkaç saat içerisinde IL-17 üretimi olduğu gözlemlenmiştir. Bunun üzerine IL-17 üretiminden sorumlu başka hücrelerin varlığı araştırılmıştır ve $\gamma\delta$ T hücrelerinde IL-23 ile IL-1 β 'ya yanıt vererek IL-17'nin erken dönem üretiminden sorumlu olduğu belirlenmiştir (245). Bunların dışında mast hücrelerinin, polimorfnükleer lökositlerin ve Natural Killer(NK) hücrelerinin de IL-17 salgıladığı belirlenmiştir. IL-17E salgılayan mast hücrelerinin Th2 yanıtını etkilediği (102) aynı zamanda TLR aracılığı ile de IL-17A ürettiği bilinmektedir (174). Aynı zamanda psoriasis, romatoid artrit, ankilozan spondilit ve amitrofik lateral sklerozis hastalıklarında mast hücrelerinin ve nötrofillerin IL-17 sentezledikleri bulunmuştur (171). Havayolunda bulunan enflamasyonlardan sorumlu IL-17'nin akciğerde bulunan NK hücreleri tarafından salgılandığı belirtilmiştir (162). Son olarak da IL-17A'nın, lenfositlerle morfolojik benzerliği bulunduğu için doğal lenfoid hücreler olarak da isimlendirilen fakat TCR veya CD45 gibi yüzey yapıları salgılama özelliği bulunmayan hücrelerde var olan RORC tarafından da salgılandığı saptanmıştır (53).

IL-17 reseptör ailesi IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD ve IL17RE olmak üzere 5 üyeden oluşsa da IL-17RA ile temsil edilmektedir. IL-17'nin etki göstermesi için ilgili dokuda IL-17RA ile birlikte IL-17RC'nin de bulunması gerekmektedir. IL-17RA; epitel hücreler, endotel hücreler, fibroblastlar ve myeloid hücrelerde bulunurken IL-17C epitel hücrelerde, fibroblastlarda ve sınırlı sayıda myeloid hücrelerde görülmektedir. IL-17RA'nın sinyal oluşturma yolu diğer sitokinler ile farklılık göstermektedir; IL-17A molekülü hedef dokudaki IL-17RA'ya bağlandığı zaman nuclear factor- κ B (NF- κ B) aktifleşmektedir, bunun için de öncesinde ortamda adaptör protein olan ACT1'nin (diğer ismi ile TRAF3IP2) ve TNF reseptörü ile ilişkilendirilmiş faktör 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6)'nın bulunması gerekmektedir. Epitel hücrelerin veya fibroblastların IL-17A ile uyarılması sonucu protein ve mRNA düzeyinde, granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) ve CXCR2 için gerekli kemokin ligandlarının sentezi artmaktadır (90, 164).

Th17 hücrelerinin sentezlenmesi ve salgılanması

Romatoid artrit (RA), multipl skleroz (MS) vedeneysel otoimmün ensefalomiyelit (EAE) gibi otoimmün hastalıkların oluşması ve ilerlemesi ile ortamda bulunan IL-12 ve IFN γ miktarlarının artış göstermesi, anti-IL-12p40 tedavisinin de hastalıkların baskılanmasında etkili olması otoimmün hastalıkların sorumlusu olarak Th1 hücrelerinin gösterilmesine neden oluyordu (76); fakat daha sonra yapılan çalışmalarda IL-12'nin p40 ve p35'ten oluşan alt ünitelerinin olduğu ve IL-12 ailesine ait olan IL-23'ün ise p40 ve p19 alt gruplarından oluştuğu yani bu iki sitokinin ortak bir alt yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda IL-23 ve IL-12'ün hücre resptörü olarak ortak IL-12R β -1 paylaştığı belirlenmiştir Bunların saptanması ile otoimmün hastalıkların biyolojisinde o zamana kadar bilinen bilgiler güncellenmiştir. Yapılan çalışmalar ile; IL-23p19 oluşumu önlenen farelerde IL-17 üretiminin sınırlandırıldığı ve deneysel otoimmün ensefalomiyelit(EAE) ile kollajen artrit (CIA) hastalıklarına karşı direnç geliştiği tespit edilmiştir. Yine anti-IL-23p19 tedavisinin IL-17 üretimini azalttığı bulunmuştur (53, 175). Buna karşılık IL-12p35, IFN γ veya STAT1 üretimi baskılanmış farelerde EAE ve CIA hastalıklarının şiddetinin azalması beklenirken aksine artış gösterdiği tespit edilmiştir (101). IL-10 eksikliği sonucu T hücrelerine bağlı EAE oluşturulan farelerde ek olarak IL-23p35 üretiminin engellenmesi ile değil IL-23p19 engellenmesi ile hastalığın baskılandığını aynı zamanda dışarıdan IL-23 enjekte edildiği durumlarda hastalık oluşumunun hızlandığı tespit edilmiştir (289). Birbirlerini destekleyen bu bulgular neticesinde IL-23/IL-17 yolu netlik kazanarak enflamatuvar yanıtın ana yolları IFN γ -Th1 ile birlikte bulunan IL-4-Th2'nin yanında IL-23-Th17 olarak yerini almıştır (105).

Daha sonra yapılan *in vitro* çalışmalar IL-23'ün IL-17 üretimi için tek başına yeterli olmadığını, farklılaşmamış T hücrelerinden Th17 hücrelerine dönüşüm esnasında farklı moleküllerin de görev aldıklarını belirlemişlerdir (273). Hayvan çalışmaları ile bu durum açıklığa kavuşturulmuştur; transjenik farelerden elde edilen hücre kültürlerine IL-23 ilave edildiği durumlarda farklılaşmamış T hücrelerinin Th17'ye farklılaşmasının 6.5%ile sınırlandığı gözlemlenmiştir. TGF β ve IL-6'nin birbirinden bağımsız ilave edildiği hücre kültürlerinde Th17 oluşumu gerçekleşmezken, her ikisinin birlikte kullanıldığı durumlarda 80.9% oranında farklılaşmamış T hücrelerinin Th17'ye dönüştüğü gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada IL-23'ün IL-12p40 alt grubunun inhibe edilmesi ile IL-23 üretimi baskılanan ortamda bulunan TGF β ve IL-6 ile yüksek oranda IL-17 elde edilmistir (29). Bunu destekleyen başka bir çalışmada TGF β 'nin Th1 ve Th2 üretimini baskılayarak IL-6'nin bulunduğu ortamda Th17 farklılaşmasını sağladığı gözlemlenmiştir (273). İnsan hücreleri ile yapılan bir çalışma neticesinde hayvan modelinden farklı olarak IL-6 ile birlikte IL-1 β 'nin Th17 proliferasyonunu sağladığı hayvan çalışmalarında elde edilen sonuçlardan farklı olarak ise TGF β ve IL-12'nin ise bu farklılaşmayı engellediği bulunmuştur (4). Hayvan çalışmaları ile de IL-1 β 'nin Th17 hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır; RA, MS ve EAE gibi Th17 ve IL-17'nin yönetiminde olan otoimmün hastalıklarda IL-1 β ve TNF α 'nın enflamatuvar patolojiyi yönettiği ve bu sitokinlerin veya onları üreten reseptörlerin bloke edildiği durumlarda hastalığın oluşmadığı bulunmuştur. Bu ilişkiden yola çıkılarak yapılan çalışmalar neticesinde IL-17'nin IL-1 β üretimini artırdığı, IL-23'ün Th17 farklılaşmasındaki görevinde tek başına yeterli olmadığı ancak IL-1 β ile birlikte çalıştığı durumlarda etki gösterdiği bulunmuştur(123, 244).

TGF β ve IL-6 kombinasyonuna alternatif bir yol olarak TGF β ile birlikte IL-21'in (IL-6+TGF β kadar etkili olmasa da) de Th17 farklılaşmasına yol açtığı belirlenmiştir. IL-21 aktif bağışık yanıt hücrelerinden özellikle Th17 tarafından salgılanan bir sitokindir, IL-21'in feedback mekanizması kullanarak Th17 hücrelerinin farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir. Genetik olarak IL-21 üretimi engellenen fare modellerinden elde edilen hücrelerde normal farelere göre daha az oranda Th17 proliferasyonu görülmüştür bu da IL-21'in rolünü ortaya koymaktadır (261). Bu

bulguları destekleyen başka bir çalışmada IL-21'in kendi üretildiği organı veya dokuyu etkileme özelliği ile otokrin olarak isimlendirilen bir sitokin olduğu, Th17 hücreleri tarafından üretildikten sonra yine dönüp aynı hücreleri etkileyerek farklılaşmasını sağladığı belirlenmiştir (181). Bu bilgilere ek olarak IL-21 ve IL-23 reseptörünün salgılanmasının IL-6 tarafından uyarıldığı belirlenmiştir. IL-23 ile IL-21'i birbirinden ayıran özellik ise IL-23'ün dendritik hücreler IL-21'in ise T hücreleri tarafından salgılanmasıdır (301).

Otoimmün bir hastalık olan psoriasisli bireylerden elde edilen deri örneklerinde, IL-17 ile birlikte ROR γ t (Related Orphan Receptor) mRNA'larının da arttığı tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmada *in vitro* Th17 farklılaşmasında ve *in vivo* olarak Th17'ye bağlı hastalıkların gelişiminde transkripsiyon faktörü olarak ROR γ t'nin görev aldığı üretiminin ise IL-6 ve TGF β tarafından uyarıldığı belirlenmiştir. Yine aynı grubun yaptığı başka bir çalışmada IL-17 üreten lamina propria lenfositlerinin aynı zamanda ROR γ t ürettikleri bulunmuştur (104). Diğer çalışmalar da farklılaşmamış T hücrelerinin Th17'ye proliferasyonunun ROR γ t tarafından yönetildiğini desteklemiştir (48, 282). ROR α 'nın da ROR γ t'ye ek olarak Th17 farklılaşmasını ve IL-17 üretimini yönlendirdiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir. ROR α 'nın fazla üretildiği durumlarda ortamda TGF β ve IL-6 olmasa bile Th17 farklılaşması sağlanmıştır. Her iki faktörün (ROR γ t ve ROR α) birlikte çalışıp sinerjik etki göstererek daha fazla proliferasyon sağladığı bulunmuştur (283).

Yapılan bir çalışmada CD4⁺ T hücrelerinde STAT3 eksikliğinin Th17 üretimini ve ROR γ t oluşumunu inhibe ettiği gözlemlenmiş bundan yola çıkarak da STAT3 sinyalinin Th17 proliferasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir (280). Bu sonucu destekleyen başka *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmış, STAT3'ün ROR γ t üretimini ve dolayısı ile Th17 oluşumunu proliferate ettiğini, eksikliğinde ise Th17 farklılaşmasının gerçekleşmediği belirtilmiştir (130, 301).

Th17 hücreleri salgıladıkları kemokin benzeri reseptör (CCR) 6 ve onun şimdiye kadar bilinen tek ligandı olan kemokin ligandı (CCL) 20 aracılığı ile Th17 hücrelerinin enflamasyon bölgesinde toplanmasını sağlamaktadır. Üretilen CCL20 proteini Th17

hücrelerini ortama çekerken CCR6 reseptöründen yararlanmaktadır (285). Kemokin reseptörü olan CCR6, kemotaksis görevinin yanı sıra T hücre dengesinin sağlanmasında kalsiyum akışınının başlatılmasında ve inaktif durumda olan T hücrelerinin integrin ile yönetilen adezyonunun sağlanmasında rol oynamaktadır (137).Yapılan çalışmalarda herhangi birinin eksikliğinde ortamdaki Th17 hücre sayısının azaldığı ve daha az enflamatuvar yanıt oluştuğu gözlemlenmiştir. Her ikisi de Th17 hücreleri tarafından sentezlense de üretilme yolları arasında farklılıklar vardır; STAT3, ROR α /ROR γ t, IL-21 eksikliği CCL20 sentezini baskımlarken CCR6 üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur (285). Yapılan bir çalışmada CCR6⁺ hücrelerin bulunduğu ortamda ilgili hücrelerin bulunmadığı ortama göre 100 kat daha fazla IL-17 mRNA'sı ve IL-17 proteini bulunduğu gösterilmiştir. CCR6'nın kemotaktik fonksiyonu sadece T hücreleri ile sınırlı değildir, B ve dendritik hücrelerinin de epitel dokuya göç etmesinden sorumlu olduğu gözlemlenmiştir(235).

Th17 hücreleri patojen olan ve patojen olmayan olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. TGF β ve IL-6 ile uyarılan Th17 hücreleri patojenik olmayan grubu oluşturmaktadır ve IL-17 ile IL-10 üretimini sağlayarak spesifik patojenlere karşı savunma görevi üstlenmektedir. Anti-enflamatuvar bir sitokin olan IL-10, Th17 hücrelerinin patojenik fonksiyonlarını sınırlandırmaktadır. IL-6 ve TGF β 'ya ek olarak IL-23'ün de uyardığı Th17 hücreleri ise patojenik grubu oluşturmaktadırlar. IL-23 ortamda bulunduğu zaman IL-10 üretimini ve dolayısı ile enflamasyonu baskılayan fonksiyonunu engellemektedir. Aynı zamanda IL-23, Th17 hücrelerinin fenotipini sabitleyerek sentezini artırmaktadırlar ve daha fazla IL-23 reseptörü sentezlenmesini sağlamaktadırlar. Patojenik Th17 hücreleri ise otoimmün hastalıkların gelişiminden sorumludurlar (253).

IL-17 fonksiyonları ve diğer sitokinlerle ilişkisi

Osteoblast, kondrosit, fibroblast, epitel, endotel hücreleri ile sinoviyal hücreler üzerinde etki gösteren IL-17 (95, 146,147, 231), enflamatuvar yanıtı başlatma kapasitesi ile bilinmektedir. Akut faz enflamatuvar yanıtta mezenkimal hücrelerden IL-6 salgılanmasını sağlayarak enflamasyonu tetiklerken, IL-8 salgılayarak da nötrofillerin ilgili bölgede toplanmasını sağlamaktadırlar (70). IL-17A'nın erken dönem fonksiyonlarından biri de granülosit koloni uyarıcı faktör (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) sentezlenmesini sağlayarak (223) kemik iliği öncü hücrelerinde nötrofil farklılaşmasını (granulopoiesis) ve salınımını sağlamaktır. IL-17'nin nötrofiller üzerinde gösterdiği başka bir etki de CXC-kemokinlerinin (CXCL 1, 2, 5 ve 8) sentezlemektir. Bu kemokinler, dış eti dokusuna nötrofil geçişini sağlayan CXC- kemokin reseptörü 2 (CXCR2) için ligand olarak işlev görmektedir (294). Bu özellikleri de IL-17A'nın mantarlar ve bakterilerin etkili rol aldığı mukozal bağışıklıkta rol almasını sağlamaktadır (156). Yapılan çalışmalarda IL-17A'nin fazla sentezlendiği farelerin dalaklarında nötrofil progenitor hücrelerinin, kan dolaşımında ise nötrofillerin sayı olarak artış gösterdiği görülmüştür (223). Lökosit adezyon yetmezliği bulunan hastalarda ve nötrofillerin hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin bozuk olduğu durumlarda devam eden granulopoiesis'in de yine IL-17A ile sağlandığı görülmektedir (69). Sistemik ve orofarengeal candida, *Staphylococcus aureus* (Sa), *Pneumocystis murina* (farelerde) enfeksiyonlarında etkili olan IL-17, Th1 tarafından yönlendirilen hücre içerisinde yaşayan mikroorganizmaların rolü olan enfeksiyonlarda pek bir işlev sağlamamaktadır (164). IL-17 tarafından sağlanan bu mukozal bağışıklık sadece nötrofilleri dokuya toplaması ile ilgili değil aynı zamanda epitel ve diğer hücre türlerinde mikrobiyal olmayan peptidlerin türlerinin de üretilmesini sağlayarak gerçekleşmektedir (136). Nötrofiller de CCL2 ve CCL20 gibi kemokinleri üreterek ortamdaki Th17 miktarını artmasına katkı sağlamaktadır (196). Nötrofiller ile IL-17 arasındaki bu denge nötrofillerin egemen olduğu tarafa doğru kayarsa periodontal bakterilerin kontrolü sağlanarak sağlıklı doku elde etmek mümkün olacaktır, IL-17 lehine sonuçlanması durumunda ise yıkıcı enflamatuvar yanıt periodontitise dönüşecektir (293).

Kronik enflamatuvar yanıt safhasında IL-17 etkileri kondrosit ve osteoblastlarda matrix üretimini önlemek buna bağlı olarak görülen eklem hasarları ile birlikte dokuların tamir olmasında bozukluklara neden olmaktadır. Bunlara ek olarak bağ doku yıkımını yöneten matriks metalloproteinazların (MMP) üretilmesini ve fonksiyon göstermesini sağlamaktadır (269). Periodontal hastalıkla ilişkilendirebileceğimiz başka bir fonksiyonunu da osteoblastlar üzerinde gösteren IL-17, kemik yıkımının gerçekleşmesinden sorumlu NF- κ B reseptörü (RANKL) sentezlenmesini sağlamaktadır. Bu da ligandı olan RANK`in osteoklastlar üzerinde sentezlenmesine ve her ikisinin birleşmesi durumundaki kemik yıkımının gerçekleşmesine neden olmaktadır (147). Kemik yıkımına etkisini bunun haricinde B hücrelerinin sentezini artırarak da gösterebilmektedir. Kronik periodontitisli hastalarda RANKL`in ana kaynağı olarak plazma hücreleri ile B hücreleri gösterilmektedir (117). Aynı zamanda otoimmün hastalıklarda B hücreleri enflamasyon alanında birikerek germinal merkezlerde lokalize olan organize lenfoid dokular oluşturmaktadır. IL-17 de bu germinal merkezlerin oluşumuna katkı sağlayarak patojenik otoantikor üretimine neden olmaktadır (97).

Bu kadar güçlü bir sitokin olan IL-17 yine de tek başına sınırlı etki göstermektedir, gücünü artırmak için de sinerjik etki gösterebileceği IL-1 β ve tümör nekrozis faktör (TNF) üretimini sağlamaktadır. Karşılıklı olarak bu iki sitokin de IL-17 salgılanmasına pozitif katkıları vardır (164, 293).

Th17 farklılaşmasını sağlayan antijenler kadar inhibe edenler de bulunmaktadır; IL-27 ve IL-2 antijenleri de farklılaşmamış T hücrelerinin Th17`ye proliferasyonunu inhibe etmektedir. IL-23, IL-12 ve IL-6 ile benzer kökenleri bulunan IL-27`nin bağışık yanıtta yıkıcı mı yapıcı olarak mı rol aldığı hakkında farklı görüşler mevcuttur. IL-27 gen eksikliği yaratılmış farelerde yardımcı T hücrelerine (Th1, Th2 ve Th17) proliferasyon konusunda herhangi bir kısıtlanma yaşanmamıştır. IL-27`nin T-bet sentezlenmesini uyararak Th1 hücrelerini indüklediği bilinmektedir fakat aynı zamanda IL-27`nin Th1 ve Th2 üretimini engellediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bununla birlikte IL-27`nin Th17 üzerine etkisi konusunda daha kesin sonuçlar mevcuttur, yapılan iki farklı çalışmada da IL-27 gen eksikliği yaratılan farelerde normal farelere göre daha fazla Th17 sentezlenmiştir (26,240).

IL-2, esas olarak ikincil lenf organlarında bulunan $CD4^+$ T hücreleri tarafından az miktarda ve $CD8^+$ T hücreleri, Natural Killer(NK) ile NK -T tarafından antijenle temas sonucu sentezlenmektedir (151). Yapılan çalışmalarda IL-2'nin STAT5 sinyali aracılığı ile Th17 farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (130). IL-2 ile aktiveleşen STAT5'in STAT3 ile yarışarak il17 gen odağına bağlandığı böylelikle STAT3'ün etkisini gösteremediği ve Th17 sentezlenemediği bulunmuştur (284). Başka bir yol olarak da IL-2'nin IL-6 tarafından yönetilen STAT3 aktivasyonunu azalttığı böylelikle ROR γ t üretiminin zarara uğradığı ve Th17 sentezlenemediği görülmüştür (127, 138).

2.3.2.3. Düzenleyici T Hücreleri (Regulatory T cells, Treg)

Dördüncü yardımcı T hücre grubu olan, timusta sentezlenen $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri transkripsiyonlarından sorumlu FoxP3'ü sentezledikten sonra gerçek, efektif fenotipleri $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ şekline dönüşüp fonksiyon göstermeye başlıyorlar. FoxP3 eksikliği immün düzensizliği, poliendokrinopati, enteropati ve X-bağılantılı (IPEX) sendromu olarak adlandırılan ölümcül çoklu organ otoimmün hastalığına neden olmaktadır. FoxP3 ilk kez bu hastalığın etyolojisinde tesbit edilmiştir(251). Treg hücreleri bağışık sistemi baskılayıcı özellikleri ile diğer yardımcı T hücrelerinden farklı olarak pro-enflamatuvar değil anti-enflamatuvar rol oynamaktadırlar, fonksiyonlarının etkisi ise ortamda bulunan sitokin popülasyonuna ve bu hücrelerin hedef hücrelere olan mesafesine göre değişiklik göstermektedir(33,254).

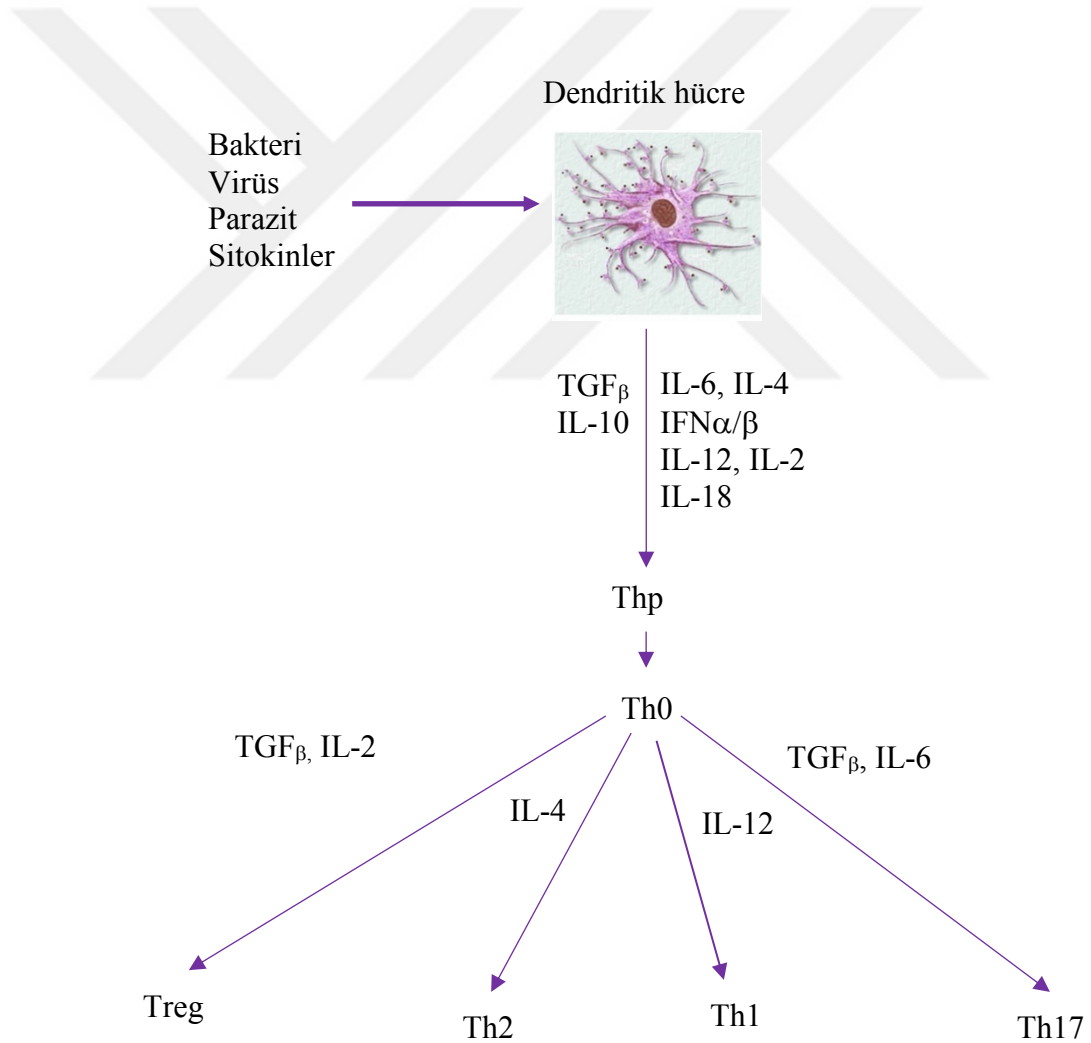
TGF β , ortamda IL-6 varken ROR γ t ve Th17 proliferasyonunu, IL-6 eksikliğinde ise FoxP3 sentezlenmesini dolayısı ile Treg farklılaşmasını uyarmaktadır(135,154,273). Treg hücreleri için hayati önem taşıyan bir diğer sitokin de IL-2'dir; timusta sentezlenmeleri (kısmi olarak), hayatlarını devam ettirmeleri, fenotiplerini sabitlemeleri ve fonksiyon göstermeleri IL-2 ve IL-2R'ne bağlı olarak gerçekleştirmektedir. IL-2 etkisini STAT5 aracılığı ile CD25 ve ona bağlı FoxP3 sentezlenmesini sağlayarak göstermektedir (2). IL-2 eksikliğinde azalmış Treg hücre sayısı ve buna bağlı olarak ortaya çıkan sistemik otoimmün hastalıklar bu duruma örnek olarak gösterilebilir (1,

150). FoxP3 proteininin sentezleme konusundaki baskıcı yapısı Treg hücrelerinin IL-2 gibi kendisi için çok büyük önem taşıyan bir sitokini üretemeyip çevresinden hazır IL-2 kullanmasına neden olmaktadır (192). Bu hücreler kendilerine gerekli olan sitokini üretemeyip dışarıdan kullanan tek hücre grubudur, bu yüzden Treg hücreleri ortamda bulunan IL-2 konsantrasyonunu azaltmakta (31) ve diğer T hücreleri ile yarışarak onların kullanımının kısıtlanmasına neden olmaktadır (193). 2-2 numaralı şekilde farklılaşmamış T hücrelerinin antijen sunan hücreler tarafından uyarılmaları sonucunda salgıladıkları pro-enflamatuvar mediyatörler ve dönüştükleri yardımcı T hücreleri gösterilmektedir.

Treg hücreleri sentezlendikleri dokuya göre farklı gruplara ayrılmaktadırlar; timusta sentezlenenler tTreg ve periferel dokularda sentezlenenler pTreg olarak isimlendirilmektedir. tTreg hücreleri TCR reseptörünün MHC sınıf II kompleksini uyarması sonucu oluşmaktadırlar; üretildikleri dokuyu terk etmeyen bu hücreler doğrudan temas ederek etkilerini göstermektedirler. pTreg ise TGF β 'nin ve IL-2'nin yardımı ile sentezlenmektedirler ve yüksek miktarda IL-10 üretme kapasitesine sahiptirler. Kan dolaşımına katılan bu hücreler salgıladıkları sitokinler aracılığı ile etkilerini göstermektedirler (28,208). Bunlardan farklı sınıflandırma seçenekleri de mevcuttur; yüksek oranda IL-10 salgılanmasından sorumlu Treg hücreleri Tr1, TGF β 'den sorumlu olanlar ise Th3 olarak gruplandırılmaktadır. Tr1, Th1 ve Th2 hücrelerinin fonksiyonlarını baskılamaktadır (77).

Akut enflamasyon durumlarında Treg hücreleri etkisini kaybetmektedir (185). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antijen sunan hücrelerin yoğun olduğu buna bağlı fazladan TCR sinyallerinin olduğu yoğun enflamasyon durumlarında Treg hücrelerinin anti-enflamatuvar özelliklerini koruyamadıklarını ve Th17 hücrelerine dönüşerek IL-17 salgıladığını savunmaktadır. Bu durumda fenotipi FoxP3⁺IL-17⁺ olan yeni bir hücre grubu ortaya çıkmaktadır. Treg hücrelerinin Th17 hücrelerine nasıl dönüştüğü konusunda değişik görüşler mevcuttur; Treg hücrelerinin IL-1 β ve IL-6 tarafından uyarılması sonucu IL-17 salgıladığını ve bu durumun TGF β tarafından negatif yönde etkilendiği bulunmuştur (28). Bir çalışmada ortamda IL-2, antijen sunan hücreler, monosit veya IL-15 varlığında IL-1 β /IL-1Ra sistemi tarafından Th17'ye dönüşen Treg

hücrelerinin IL-21 ile IL-23 tarafından da desteklendiği bulunmuştur (124). Bunu destekleyen başka bir çalışma ise bu esasen IL-2'ye bağlı bu dönüşümün IL-1 β tarafından yönetildiğini göstermiştir (60).



Şekil 2-2: Antijen Sunan Hücreler Tarafından Uyarılan Farklılaşmamış T Hücreleri, Salgıladıkları Sitokinler ve Farklılaştıkları Yardımcı T Hücreleri

2.3.2.4. Diğer Yardımcı T Hücreleri

T hücreleri, araştırmacıların uzun zamandır ilgisini çeken bir konudur ve iki üye ile başlayan alt grupları gün geçtikçe genişlemektedir; Th9 da yeni eklenen üyelerden biridir. Salgıladığı IL-9 sitokini ile parazit enfeksiyonlarında, kanser immünoterapisinde, astım gibi alerjik reaksiyonlarda ve otoimmün enfeksiyonlarda rol oynamaktadır. IL-9'un Th2 hücreleri tarafından da salgılanması Th9 hücrelerinin önceleri Th2 ailesine ait bir hücre grubu olarak kabul edilmesine neden olmaktadır fakat Th2 hücrelerinden ayıran belirgin farklılıklarının farkedilmesi bu hücrelerin ayrı bir başlık altında incelenmesini sağlamıştır (134).

Th22 hücreleri de salgıladıkları IL-22, TNF_{α} ve IL-13 ile yardımcı T hücreleri arasında ayrı bir grup olarak yerlerini almışlardır. IL-22, Th17 hücreleri tarafından salgılanıyor olsa da ana kaynakları Th22 hücreleridir ve bu hücrelerin farklılaşması esnasında T-bet, GATA-3 ve ROR γ t'nin çok düşük oranlarda sentezlenmesi bu hücrelerin sırası ile Th1 ile Th2 ve Th17 hücrelerinden ayrışmasını sağlamıştır. IL-10 ailesine ait bir sitokin olan IL-22'nin bağışık yanıtındaki fonksiyonu henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır; enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda enflamasyonu tetikleyen rollerine karşın epitel hücrelerde koruyucu fonksiyonları da bulunmaktadır (165).

B hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu yerde konumlanan foliküler T hücreleri (TFH) vücudun savunması esnasında B hücrelerinin antikor üretmesine yardımcı olmaktadır. TFH hücrelerinin hassas bir dengesi vardır; fazla sentezlenmeleri otoimmüneye az sentezlenmeleri ise yetersiz enflamatuvar yanıtı yol açmaktadır (112). Tablo 1'de yardımcı T hücre grupları ve salgıladıkları en önemli sitokinler özet şeklinde verilmiştir

Tablo 1: Yardımcı T Hücreleri ve Salgıladıkları En Önemli Sitokinler

Yardımcı T hücresi	Salgıladıkları en önemli sitokinler
Th1	TNF_{α} , $IFN\gamma$, IL-2, IL-12
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13
Th9	IL-9
Th17	IL-17, IL-21, IL-22, TNF_{α} , $IFN\gamma$, GM-CSF
Th22	IL-13, IL-22, TNF_{α}
Treg	IL-10, TGF_{β}
Tr1	IL-10, az miktarda TGF_{β}
Th3	TGF_{β} , az miktarda IL-10
TFH	IL-21, IL-4

2.3.3. Dendritik Hücreler ve Konak Savunmasındaki Roller

Bağışık sistem hücrelerinin en önemli fonksiyonu vücuda patojenik özellik gösteren, kendisine ait olmayan yabancı bir mikroorganizma girdiği zaman onu vücutta her zaman bulunan diğer mikroorganizmalardan ayırmaktır. Bu hücreler aynı zamanda vücutta her zaman bulunan mikroorganizmalar arasında hasar görmüş olanlar varsa onları da teşhis etmektedir. Hücre yüzeyinde bulunan reseptör çeşidine göre doğal ve kazanılmış bağışık yanıt elemanları belirlenmektedir (58). Bağışık yanıt için pusula görevi gören, dendritik hücreler yanıtı başlatan sonrasında da düzenlenmesinden sorumlu hücre grubudur (131). Kazanılmış bağışıklığı yöneten T hücrelerine antijen sunan bu hücreler aynı zamanda salgıladıkları mediyatörler ile farklılaşmamış T hücrelerinin dönüşeceği özelleşmiş T hücre grubunun belirlenmesini de sağlamaktadır. Buna ek olarak T hücre aktivitesini baskılayan düzenleyici T hücrelerinin (Regulatory T cells, Treg) farklılaşmasını da kontrol ederek organ transplantasyonlarında hayati önem taşıyan otoimmüniteye katkı sağlamaktadır. Kazanılmış bağışıklıktaki bu fonksiyonlarının yanı sıra salgıladıkları interferon (IFN) I, IFN II ve IL-12 gibi sitokinler sayesinde mikroorganizmalar ile direkt mücadele etmektedirler (160).

Dendritik hücrelerin fonksiyonel özellikleri bulundukları dokuya göre şekillenmektedir; akciğer veya boğazın mukozal dokuları gibi devamlı antijen akışına maruz kalan hücreler cevap oluşturmaktan ziyade tolerans sağlamaktadırlar, lenf nodülleri ve kanda bulunanlar ise normal zamanda çok fazla antijen ile temas etmeyen grubu oluşturmaktadır ve olgunlaşmamış halde tolerans sağlarken antijenle karşılaştıktan sonra kazanılmış bağışıklığın başlatılmasından sağlarlar(106,277)

Normalde vücutta olgunlaşmamış formda bulunan dendritik hücreler, yüksek antijen tanıma ve sunma kapasitesine sahiptirler fakat mikroorganizma ile karşılaştıktan sonra olgunlaşarak bu özelliklerini kaybederler ve T hücrelerini uyarma özelliği kazanırlar (21). Olgunlaşma; hücrelerin dokulardan ikincil lenf organlarına göç etmesi ve T hücrelerini uyarması için gerekli olan dokuların uyumundan esas olarak sorumlu olan yapı (major histocompatibility complex, MHC) ve yardımcı uyarıcı moleküllerinin (costimulatory molecules) düzenlenmesini kapsamaktadır (21, 178).

2.3.3.1. Toll-benzeri Reseptörler (Toll-like receptors, TLR)

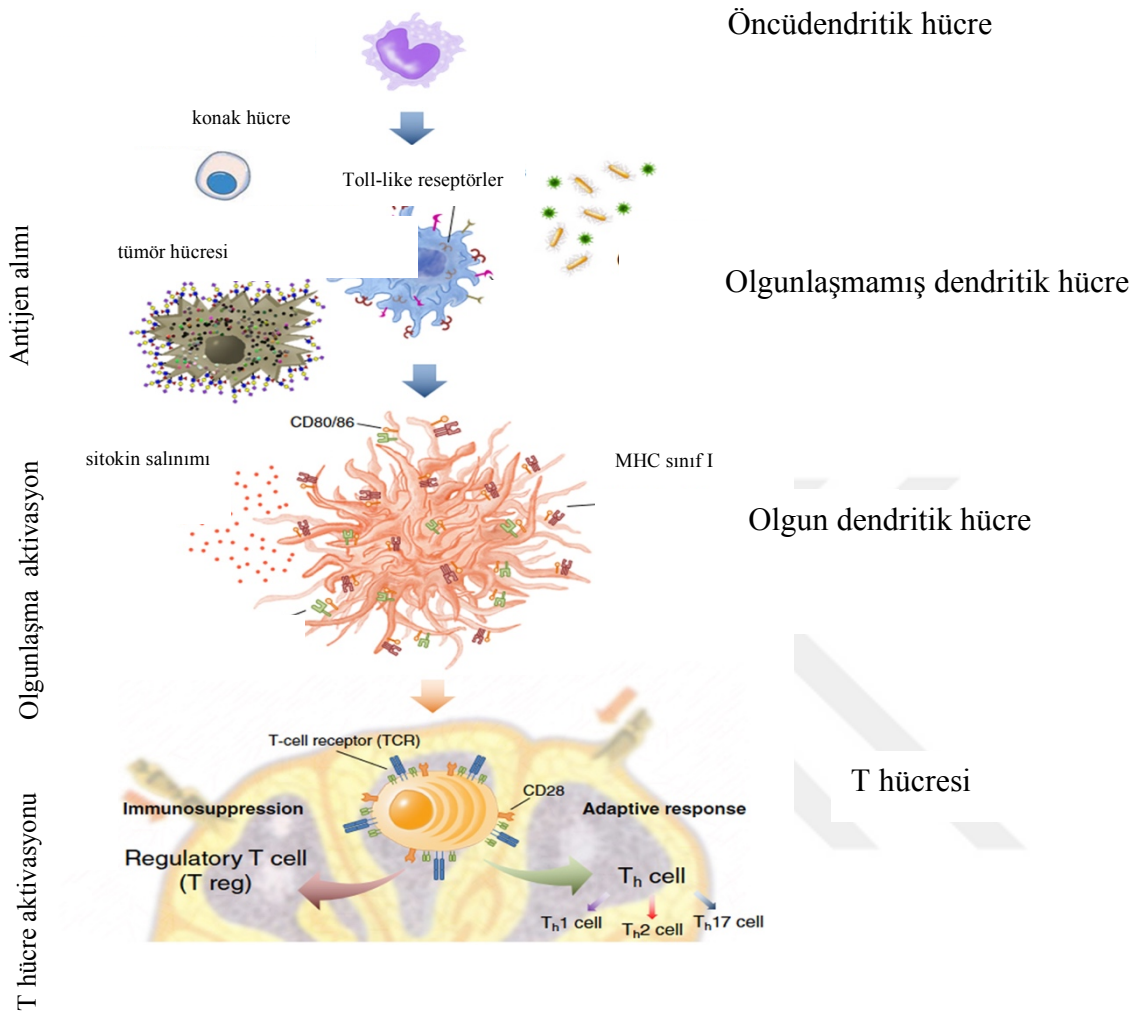
Dendritik hücrelerin üzerindeki molekül tanıma reseptörü (Pattern Recognition Receptor, PRR) ailesinin önemli bir üyesi olan Toll-like receptor (TLR), mikroorganizma ile ilk karşılaşan ve birtakım sinyaller salgılayarak aktivatör protein 1 (AP-1, özellikle IL-2 üretimi için gerekli olan transkripsiyon faktörü ile nükleer faktör kappa B ve IFN aktivasyonunu ve bunlara bağlı olarak dendritik hücre olgunlaşmasını başlatan reseptör grubudur. Bu fonksiyonları sayesinde TLR'in, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki köprü görevini gördüğü düşünülmektedir(248). Bu görevlerinin yanı sıra sentezleyip salgıladıkları enflamasyonu şiddetlendiren sitokin ve kemokinler, reaktif oksijen türlerinin artış gösteren üretimi ve fagositoz yapan hücelere yardımları sayesinde doğal bağışıklığın sağlanmasında da önemli bir yer tutmaktadırlar(98). Rakamlarla ifade edilen TLR, insanlarda 10 (TLR1-TLR9) ve farelerde 12 (TLR1-TLR9 ve TLR11-TLR13) alt gruba ayrılmaktadır (250). Uyarıldıkları antijene, uyardıkları T hücresine veya sinyal oluşturdıkları yollara bağlı olarak farklılık göstermektedirler. Periodontitis patogeneğinde çok önemli rol oynayan *P. gingivalis*'in

virulans faktörü Lipopolisakkarit (LPS) TLR4'ü, viral antijenler TLR7 veya TLR9'u, (CpG) metillenmiş olmayan (unmethylated) oligonucleotides TLR9'u ve (poly(I:C)) çift sarmallı RNA TLR3'ü aktive etmektedir. Endosomal bölgede bulunan TLR7, TLR8 ve TLR9 ile hücre içinde bulunan TLR3 haricinde geri kalan reseptörler hücre yüzeyinde konumlanmıştır. TLR3 haricindeki reseptörler MyD88 aracılığı ile sinyal salgılamak TLR3 ve TLR4, IFN_{β} salgılamasından sorumlu TRIF adaptörünü kullanmaktadır. Dendritik hücreler olgunlaşması esnasında TLR'in yanı sıra CD40, CD80, CD86 ve MHC sınıf II antijen sunan hücre moleküllerinin aktivasyonu da söz konusudur (73).

Antijenle karşılaşan dendritik hücre reseptör tarafından yönlendirilen endositoz, fagositoz veya makropinositoz aracılığı ile antijeni ele geçirip peptid haline dönüştürürler, ilk olarak MHC moleküllerinde tutulan bu peptidler daha sonra hücre yüzeyinde taşınırlar. T hücrelerine sunulan bu antijenler enflamasyon olduğu durumda bağışık yanıtı başlatırken ortamda enflamasyon yoksa tolerans gelişmesine neden olurlar (21, 100). Oluşan peptidlerin MHC II'de konumlandırılması yardımcı T hücrelerinin farklılaşması için gerekli olan üç sinyalin birincisini oluşturmaktadır. T hücrelerin tam olarak aktif olmaları içinse yardımcı uyarıcı molekül aktivasyonu (sinyal II) gerekmektedir aksi takdirde T hücreleri anejik (yanıtsız) kalacaktır. T hücrelerinin tam olarak fonksiyon göstermesi için gerekli olan üçüncü sinyal ise IL-12, IL-15, IL-6 veya TNF_{α} gibi mediyatörlerin salgılanmasıdır (55). Yardımcı uyarıcı moleküller; CD86, CD40 ve CD80'i kapsamaktadır. T hücre yüzeyinde bulunan CD40L'in (CD40 ligandı) aktif dendritik hücreler tarafından sentezlenen CD40 ile birleşmesi, CD80-CD86, adezyon ve MHC molekülleri ile IL-12 sentezi ve salgısını artırmaktadır. CD40L/CD40 yolu sıvısal ve hücreler arası bağışıklığın düzenlenmesine ek olarak T hücre grubunun belirlenmesinden ve farklılaşmasından sorumludur (148). T hücreleri ile dendritik hücre arasında hücreler arası kontakt sırasında immunolojik sinaps adı verilen özelleşmiş yapılar oluşmaktadır. CD80 ve CD86 ise hücreler arası reaksiyonların güçlenmesinden ve T hücrelerinin fonksiyonel aktivitelerinin başlamasından sorumludurlar (139). 2-3 numaralı şekilde dendritik hücrelerin olgunlaşma aşamaları gösterilmiştir.

2.3.3.2. Dendritik Hücre Alt Grupları

Dendritik hücreler; kan dolaşımında, lenfoid dokularda ve lenfoid olmayan dokularda lokalize olmuşlardır. Bulundukları konuma, fenotiplerine, fonksiyonlarına veya farklılaşma yollarına göre farklı sınıflama seçenekleri bulunmaktadır. Konumlarına göre yapılan sınıflama baz alınırsa farelerde ve insanlarda kan dolaşımında bulunan dendritik hücreler; bir plasmacytoid dendritik hücre (pDC) ve iki myeloid dendritik hücre (mDC) olmak üzere toplam üç alt gruptan oluşmaktadır. Herhangi başka bir hücrenin öncüsü olmayan pDC olgunlaşmamış halde kan dolaşımında bulunurken bir uyararla karşılaştığı zaman mevcut yapısal özellikleri ile lenfoid dokulara geçerek T hücrelerini uyarmaktadır. mDC ise CD11c⁺ ve CD141⁺reseptörlerine sahiptir ve patojenle karşılaşır karşılaşmaz bir takım reaksiyonlar geçirerek olgunlaşırlar ve T hücrelerine antijen sunarlar. Salgıladığı düşük miktardaki MHC II ve CD11c, yüksek miktardaki IFN α ile karakterize pDC, TLR7 ve TLR9 ile aktive olup viral enfeksiyonlarda, mDC ise bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda rol almaktadırlar (161).



Şekil 2-3: Olgunlaşmamış dendritik hücrelerin antijenle karşılaşp olgunlaşması ve bu sırada geçirdiği fenotipik değişiklikler ile T hücrelerine antijen sunması

Farelerde bulunan lenfoid dokulardaki dendritik hücrelerin, $CD8^+$ ve $CD11b^+$ olmak üzere iki tipi vardır. $CD8^+$ timusta bulunan dendritik hücrelerin tamamını, dalak ve diğer lenfoid dokularda bulunanların ise 20-40%'ını, $CD11b^+$ ise daimi olarak lenfoid dokularda bulunan dendritik hücreleri oluşturmaktadır. $CD8^+$ hücreler yüksek IL-12 üretme kapasiteleri ile Th1 hücrelerinin farklılaşmasında, $CD11b^+$ hücreleri ise farklılaşmamış T hücrelerinin Th2 hücrelerine dönüşmesinde rol almaktadırlar. (142).

Farelerde lenfoid olmayan dokularda bulunan dendritik hücreler 4 alt grup altında incelenmektedirler. Tüm vücuttaki bağ dokularında yer alan $CD103^+CD11b^-$, diğer dendritik hücrelerle birlikte makrofajları da içine alan $CD11b^+$, derinin epidermal tabakasında bulunan Langerhans hücreleri ve son olarak lenfoid olmayan dokuların ile lenfoid dokular arasındaki geçiş noktasında bulunan ve dokudan göç eden dendritik hücre (Tissue-Migratory DC) (161).

İnsanlarda ise lenfoid dokularda bulunan dendritik hücreler dalak veya timusta lokalizedirler; $CD1c^+$ ve $CD141c^+$ reseptörlerine sahip olan bu hücreler iki farklı grup altında incelenmektedirler fakat her ikisi de benzer özellik göstererek yardımcı T1 ve T2 hücrelerinin sentezlenmesini sağlamaktadırlar. Lenfoid olmayan dokularda bulunanlar ise, $CD14^+$, $CD1a^+$ ve deride bulunan Langerhans hücreleri olmak üzere 3 alt gruptan oluşmaktadır. Deride bulunan $CD14^+$ hücreler foliküler, mukozada bulunan $CD14^+$ hücreler ise yardımcı T2 hücrelerinin farklılaşmasının sağlanmasından sorumludurlar. (224). Diğer dendritik hücrelerden daha farklı fonksiyon gösteren $CD1a^+$ dendritik hücreleri peptid olmayan tümör antiijenlerinin bağışık sisteme sunulmasından sorumludurlar (50) ve ağız boşluğunda görülen kötü huylu lezyonlarda, göğüs, yumurtalık kanserlerinde ve metastatik melanomda sayıları artış göstermektedir (94). Fare ve insanlarda görülen dendritik hücre alt grupları Tablo 2 ve Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 2: Farelerde dendritik hücre alt grupları

Kan	Lenfoid doku	Lenfoid olmayan doku
Plasmacytoid dendritik hücre (pDC)	$CD8^+$ DC	$CD103+CD11b^-$ DC
$CD1c^+$ myeloid dendritik hücre (mDC)	$CD11b^+$ DC	$CD103+CD11b^+$ DC
$CD141^+$ myeloid dendritik hücre (mDC)		Langerhans
		Tissue migratory DC

Tablo 3: İnsanlarda dendritik hücre alt grupları

Kan	Lenfoid doku	Lenfoid olmayan doku
plasmacytoid dendritik hücre (pDC)	CD1c+ DC	CD1a+ DC
CD1c+ myeloid dendritik hücre (mDC)	CD141c+ DC	CD14+ DC
CD141+ myeloid dendritik hücre (mDC)		Langerhans

Dendritik hücrelerin farklı sınıflamaları da bulunmaktadır; pDC dışında kalanlar konvansiyonel dendritik hücreler (cDC) olarak isimlendirilmektedir (161).Tüm bunlara ek olarak kanda dolaşan monositlerden farklılaşan dendritik hücreler de bulunmaktadır. Monositler enflamasyon olduğu zaman fenotip değiştirerek dendritik hücrelere veya makrofajlara dönüşmektedirler. Myeloid dendritik hücrelere ve Langerhans hücrelerine dönüşen bu hücreler mo-DC şeklinde gösterilmektedirler ve yapıları ile fonksiyonları dendritik hücreler ile benzerlik göstermektedir. IL-1, IL-12, IL-23 ve $TNF\alpha$ sentezleyen bu hücreler $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerini uyarma kapasitesine de sahiptirler(64). Farelerde bulunan monositler MHC II ve CD11c salgılamazken dendritik hücreler salgılamaktadırlar bu yüzden birbirlerinden ayırmak kolaydır fakat insanda bulunan her iki hücre grubu da bu molekülleri salgıladığı için ayırım yapmak daha zordur. *In vitro* olarak da elde edilen monositleringranülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, GM-CSF ve IL-4 ile uyarılarak dendritik hücrelere dönüşmesi kanonikal farklılaşma (canonical differentiation) olarak isimlendirilmektedir. TLR'in neden olduğu farklılaşma ise kanonikal olmayan (non-canonical differentiation)'dir. (19, 49).

2.4. Bağışık Sistemdeki Hücrelerin Periodontal Hastalıkla İlişkisi

2.4.1. T Hücreleri ve Periodontitis Arasındaki İlişki

2.4.1.1. Th1/Th2 Hücreleri

Periodontal hastalıkta T hücrelerini inceleyen araştırmalar; kandaki, diş eti oluğu sıvısındaki ve diş etindeki sitokin düzeylerinin, PCR ile mRNA seviyesinde ve ELISA kitleri aracılığı ile salgılanan protein düzeyinde ölçülmesine dayanmaktadır. Periodontal lezyonda makrofajlara, yerleşik halde bulunan lenfositlere ve plazma hücrelerine rastlanılmıştır; T lenfositleri ve makrofajlar yerleşmiş lezyonda yoğun olarak görülürken ilerlemiş lezyonda B lenfositlerinin ve plazma hücrelerinin sayısı artış göstermektedir (203). Erken ve yerleşmiş lezyonu yöneten Th1 hücreleri ürettikleri IFN_{γ} ile fagositoza katkı sağlayarak nötrofililer ile makrofajlara yardım etmektedirler. Etkenin ortadan kalkmaması ve çeşitli nedenlerle enflamatuvar yanıtın yeterli gelmediği durumlarda çözilemeyip devam eden enfeksiyon B lenfositlerinin ve plazma hücrelerinin egemenliğine doğru giderek ilerlemiş lezyona dönüşür. Bu aşamada ortamda bulunan mast hücreleri, IL-4 üretimini sağlarlar ve IL-4 de Th2 hücrelerinin farklılaşmasına neden olmaktadır. Ortamdaki enfeksiyon bu aşamadan sonra da devam ederse artan B hücreleri RANKL üreterek osteoklastların devreye girerek kemik kaybının başlamasına neden olmaktadır. Bu hipotezi benimseyen araştırmacılar erken/yerleşmiş lezyon ile Th1 hücrelerini , hastalığın ilerlemesi ile Th2 hücreleri ilişkilendirilmiştir (77). İleri agresif periodontitisli bireylerden elde edilen örneklerde Th1 (IL-2, IFN_{γ}) ve Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-5,IL-13) hücre profilleri incelenmiş ve çıkan sonuçlarda IL6, IL-13, IFN_{γ} 'ın incelenen dokuların tamamında,IL-10'un da bir kısmında yoğun olarak bulunduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak da Th2'nin yoğunlukta olduğu kabul edilmiştir (72). Gingivitis ve periodontitisli hasta gruplarından elde edilen örneklerin incelendiği başka bir çalışmada gingivitiste makrofajların, periodontitiste ise IL-1 α , IL-5 ve IL-4'ün yani Th2'nin çoğunlukta olduğunu belirtmişlerdir (258).

Bu görüşü destekleyen araştırmalar olduğu kadar (129, 152) periodontitis lezyonlarında artan Th1 hücrelerine karşı azalan Th2 hücrelerinin varlığını savunan çalışmalar da vardır (63, 217). Yine bunu destekleyen bir çalışmada agresif periodontitis hastalarında fazla miktarda IFN γ bulunurken, IL-5 ve IL-6'ya rastlanılmamıştır (251).

Her iki görüşten farklı olarak periodontitisi bulunan hastaların diş eti doku örnekleri sağlıklılar ile karşılaştırıldığı zaman daha fazla IFN γ , IL-6 ve IL-13 mRNA'sına rastlanılmıştır yani periodontitiste hem Th1 hem de Th2 hücrelerinin olduğu ve birbirlerine üstünlük sağlamadıkları savunulmaktadır (281). Daha farklı çalışmalar yapılarak da benzer sonuçlar elde edilmiştir (72, 200).

2.4.1.2. Th17 Hücreleri

Diş eti dokularındaki epitel ve bağ dokusu örneklerinin incelendiği bir çalışmada periodontitisli bireylerde sağlıklı bireylere göre ortalama beş kat daha fazla IL-17 mRNA'sına ve ortalama üç kat daha fazla RORC2 genine rastlanılmıştır (5). Kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerden elde edilen diş eti ve alveol kemik örneklerinde KP'li bireyler sağlıklı olanlar ile karşılaştırıldığı zaman diş etindeki IL-6, TGF β , IL-1 β , IL-17 ve IL-23 mRNA seviyeleri, kemikteki RANKL ve IL-17 oranları anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur (37). Bunlara ek olarak pek çok çalışma periodontitisli bireylerde IL-17 oranının periodontitisi olmayan bireylere göre arttığını klinik olarak göstermiştir (173, 183, 230, 247, 297).

Genetik olarak IL-17RA eksikliği yaratılan farelerde *P. gingivalis* ile deneysel periodontitis oluşturulmuş, kemik seviyeleri değerlendirilmiştir. Çıkan sonuçlara göre IL-17 üretimi normal şekilde devam eden grupta sürpriz şekilde daha az kemik yıkımı görülmüştür, nedeni olarak da IL-17'nin nötrofil üretimini artırması ve kemotaksisini sağlayarak enfekte alana gelmesini sağlaması tüm bunların da kemik yıkımını azaltması olarak gösterilmiştir (290).

IL-17 veya Th17 hücreleri üzerinde periodontopatojen mikroorganizmaların etkileri konusunda çok az bilgi bulunmaktadır, yapılan çalışmalar periodontitisle

arasında çok güçlü ilişki bulunan *P. gingivalis*'in periodontitisli bireylerin diş eti oluğu sıvısındaki IL-17 miktarını(230) virölans faktörü olan LPS'in ise periodontal ligaman hücrelerinde IL-17 ve IL-23 üretiminin artmasına (195) neden olduğu bulunmuştur. *P. gingivalis* Th17 hücreleri ile Th1 hücrelerine kıyasla daha kolay mücadele etmektedir bu nedenle Th1 hücre fenotipini Th17 hücrelerine dönüştürdüğü bunun yanında IL-17'nin aktivitesi sonucu ortaya çıkan doku artıklarını ve heme Oksijenin bağlanmasından sorumlu Hb'in bölümü (heme) içeren ürünleri besin olarak kullandığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (83,173, 195).

2.4.1.3. Treg Hücreleri

Yapılan çalışmalarda kronik periodontitis ile Treg hücreleri arasında pozitif bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir; kronik periodontitisi veya gingivitisi olan ve sağlıklı periodonsiyuma sahip bireylerden elde edilen diş eti biyopsilerinin incelendiği bir çalışma, periodontitisi olan hastaların dokularında CD4⁺CD25⁺ hücre sayısının arttığı aynı zamanda FoxP3 sentezinin yanında TGF β ile IL-10 salgılanmasının arttığı belirtilmiştir (37). *In vitro* yapılan bir çalışmada, periodontitisi olan ve periodontal açıdan sağlıklı olan bireylerin kan örnekleri alınmış ve T hücreleri ayrıştırılmıştır. Elde edilen hücreler *P. gingivalis* antiijenleri ile stimule edildikten sonra çıkan sonuçlar periodontitisli bireylerde sağlıklılara kıyasla daha fazla CTLA-4 ve CD25 reseptörü sentezlendiğini göstermiştir. Treg hücrelerine özel bir yüzey molekülü olan CTLA-4; T hücrelerinin aktivasyonunun tamamlanabilmesi için gerekli yardımcı bir uyarıcı moleküldür. T hücre aktivasyonunu artırmak yerine azaltıcı etki göstermektedir bu da T hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi yaratmaktadır. Periodontitisi olan bireylerden elde edilen dokularda daha fazla IL-10 ve TGF β salgılandığı (14). CD4⁺CD25⁺ ve CD4⁺CTLA4⁺ hücrelerinin sayısında gingivitisi olanlardan elde edilenlere oranla daha fazla sentezlendiği bulunmuştur (176).

2.4.2. Dendritik Hücrelerin Periodontitisle İlişkisi

In vitro ve *in vivo* yapılan bir çalışmada periodontal sağlıklı diş etinin epitelinde olgunlaşmamış CD1a⁺ DC yoğunluğu bulunurken, kronik periodontitisli bireyin diş eti dokusundan alınan örneklerde T hücre açısından zengin olan lamina propria içerisinde dendritik hücre profili değişmiş ve olgun CD83⁺ DC egemenliği görülmüştür. *In vitro* olarak ise *P. gingivalis* ve virülans faktörü LPS'in etkili hücre yanıtı oluşturmada da dendritik hücre olgunlaşmasını sağladığı gözlemlenmiştir (110). Dendritik hücrelerin antijen sunma özelliklerinin yanı sıra kronik periodontitisin de dahil olduğu düşük şiddetli kronik inflamasyonlarda mikroorganizmaya karşı aktif savunmada rol aldığı biliniyor; yine bunu destekleyecek şekilde yapılan bir çalışmada mDC'nin kronik periodontitis vakalarında oral mukozadaki *P. gingivalis* DNA'larına zarar verdiği bulunmuştur (38). Farklı şiddetteki kronik periodontitis vakalarında dendritik hücre birikiminin değerlendirildiği bir çalışmada olgun olmayan dendritik hücrelerin ağız epiteli, diş eti oluğu epiteli ve lamina propria'da, olgun dendritik hücrelerin ise oral epitel ve lamina propria'da konumlandıkları, ilerlemiş KP hastalarında orta şiddetli KP hastalara göre daha az olgun dendritik hücre birikimi olduğu görülmüştür (206). Farelerde yapılan çalışmalarda *P. Gingivalis*'in neden olduğu deneysel periodontitis dokularında cDC birikiminin ve bununla bağlantılı Th17 hücre sayısının arttığı gözlemlenmiştir (237).

2.5. Enflamasyonun Çözünmesi ve Endojen Lipid Mediyatörleri

Eskiden araştırmalar sadece enflamasyonu başlatan unsurlar üzerine yapılmaktaydı fakat sağlıklı durumu tekrar geri kazanmak için enflamasyonun başlangıcı kadar çözünmesinin de etkili olması gerekmektedir. Enflamasyonun çözünmesi; ortamdaki granülositlerin ortadan kaldırılmasını ve makrofajlar ile lenfositlerin enfekte olmadan önceki hücre sayılarına ve fenotiplerine dönüşmesini kapsamaktadır (229). Doku bütünlüğünün bozacak herhangi bir fiziksel yaralanma veya mikrobiyal saldırı karşısında gelişen akut enflamatuvar yanıt esnasında konak;

kendinden olmayan yabancı molekülü ortamdan kaldırma, ortamı temizleyip dokuları eski haline geri döndürme yani rejenere etme ihtiyacı duymaktadır. Aslında koruyucu karakterde olan bu yanıtta sitokin ve kemokinlerin rolü yukarıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Onlar kadar esansiyel yağ asitlerinden üretilen eicosanoidler de rol oynamaktadırlar ve enflamasyon bu üçlü arasındaki dengeye bağlı olarak şekillenmektedir (226). Eicosanoidler, 20 tane lipid mediatörünün oluşturduğu geniş bir ailedir ve öncü maddesi olan araşidonik asit, fosfolipid membranından fosfolipaz A2 enziminin aktivasyonu ile fagositik ve bağışık sistemdeki hücreler tarafından üretilmektedir. Araşidonik asitler daha sonra siklooksijenaz, lipoksojenaz ve epoksijenaz enzimlerinin devreye girmesi sonucu sırası ile prostaglandinlere, lökotrienlere ve de endoperoksidaz'a dönüştürülmektedir(227). Akut yanıtta ilk başta üretilen prostaglandin ve lökotrien, lökositlerin hareketini ve cevabını düzenleme ile konak yanıtı yönlendirmekte, enflamatuvar yanıtı kontrol edip klinik olarak daha az belirti görülmesini sağladıkları bilinmektedir (75)

Pro-enflamatuvar mediyatörlerin ortamdan uzaklaşması, enflamasyonun kapatıcı sinyali olduğu ve yanıtı pasif şekilde sonlandırdığı kabul edilirken varlığı yeni ortaya çıkan bazı endojen lipid mediatörlerinden sonra enflamasyonun çözünmesinin pasif bir olay değil programlanmış aktif bir biyolojik olay olduğu kabul edilmeye başlandı. Endojen lipid mediatörlerinin konak savunmasını bastırmak ve enflamasyonun çözünmesini yönetmek amacı ile vücut tarafından üretildiği bulunmuştur (133, 227). Akut enflamasyonun çözünme aşaması prostaglandin ve lökotrienler tarafından başlatılmaktadır fakat daha sonra resolvin, protectin, lipoxin ve maresinolmak üzere 4 gruba ayrılan bu lipid mediatörleri bayrağı devralmaktadır(24). Lipoxinler; nötrofillerin ortamda birikmesini önlerken makrofajların toplanmasına imkan sağlamaktadırlar (23). Protectinler; T hücre fonksiyonları ile yakından ilgili olan bu grup, IFN_γ ve TNF_α üretimi ile T hücre göçünü önlerken T hücrelerinin apoptozisini sağlamaktadır(10). Bunlara ek olarak nötrofillerin endotelyal hücrelerden geçişini önledikleri gibi makrofajların ölü nötrofilleri ortamdan uzaklaştırmasını (efferocytosis) sağlamaktadırlar (234). Makrofajlar tarafından üretilen maresinlerin ise rejeneratif etki göstererek efferocytosis'i teşvik etmektedirler. Bu ailedeki 4 üyeden sadece lipoxinler kökenlerini araşidonik asitten almaktadırlar geriye kalan maresin, protectin ve resolvinler diyetle

alınmaktadır; özellikle balık yağında bulunan ω -3 yağ asitinden sentezlenmektedirler (229).

2.5.1. Resolvin

Resolvinler kimyasal olarak E ve D olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadırlar ve besinle alınan omega 3 yağ asitlerinde bulunan esansiyel ω 3 doymamış yağ asitlerindeki eicosapentaenoic asid (E grubu) ve docosaheptaenoic asitlerden (D grubu) sentezlenmektedirler. Eicosapentaenoic asit (EPA) aspirin tarafından uyarılan siklooksijenaz2 enzimi yardımı ile 18Rhydroperoxyeicoapentaenoic asite dönüştürüldükten sonra nötrofiller tarafından alınıp 5 lipoxygenase enzimi ile E1 ve E2 formundaki resolvinlere indirgenmektedir(225). RvE1'e ilk kez aspirin ve EPA ile tedavi edilen farelerin karın boşluğunda rastlanılmıştır, daha sonra insanların nötrofil ve endotel hücreleri ile birlikte *in vitro* ortamda yapay olarak sentezlenmişlerdir (227). Resolvinler, özel hücreler üzerinde bulunan G protein-coupled reseptörleri ile temas sonrası etkilerini göstermektedirler. RvE1, monosit ve dendritik hücreler üzerinde bulunan kemokin benzeri reseptör 1 (chemokine-like receptor 1, ChemR23) ve nötrofillerin üzerinde bulunup lökotrien reseptörü olarak da işlevini sürdüren BLT1 aracılığı ile RvD'nin reseptörü ise; G protein-coupled reseptör 32 trombositlerin ve nötrofillerin üzerinde sentezlenen CB2 aracılığı ile etkisini göstermektedir. CB2 aktivasyonu P-selektin sentezlenmesini önleyerek nötrofillerin hasar bölgesinde toplanmasını önlemektedir. RvE1 reseptörleri de pro-enflamatuvar sitokinlerin üretilmesini önleyip nükleer factor kappaB sinyalini kapatmaktadır(17). Resolvinler, nötrofillerin dokuları ışgal etmesini önleyerek, efferocytosis ile canlı olmayan nötrofillerin ortamdaki uzaklaşmasını sağlayarak ve dokunun yenilenmesini sağlamak için enflamasyonun temizleyerek çözünmeye katkı sağlamaktadırlar (226).

Resolvinlerin enflamasyonun çözünme aşamasındaki önemi farkedildikten sonra periodontitis de dahil olmak üzere kronik enflamatuvar hastalıklara olası etkileri ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır; periodontal olarak sağlıklı ve lokalize agresif periodontitis (LAP)'i olan bireylerin kanından elde edilen nötrofillerle yapılan

bir çalışmada, RvE1 ilave edilmesi ile TNF veya bakteriyel ürünlere karşı üretilen nötrofil ürünlerinin 80% oranında azaldığı gözlemlenmiştir (225). RvD1'in IL-17'nin Del-1'e bağlı olarak yarattığı kemik kaybını önlediği bulunmuştur(149). RvE1'in periodontal hastalıkta sağladığı yararlar genel olarak osteoblastların daha fazla fonksiyon göstermelerini sağlamak, RANKL/OPG oranını düşürüp kemik kaybını sınırlamak, periodontal açıdan patojenik olan ortamı tersine çevirmek, makrofajların fenotiplerini M1 tipinden M2'ye dönüştürmek ve nötrofiller ile trombositlerin birikimini ve aktivasyonunu önlemek şeklinde özetlenmiştir(268).

2.6. Diyabet

Diyabet; insülin salgısında ve/veya aktivitesinde görülen bozukluk sonucu oluşan hipergliseminin neden olduğu metabolik hastalıktır ve tip 2 (TD2) ve tip 1 (TD1) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Tip 1 diyabet; insülin üretiminden sorumlu olan pankreastaki hücrelerinde görülen genetik kökenli bozukluk nedeni ile salgılanan insülinin yeterli gelmemesinden kaynaklanmaktadır. Genellikle çocuklarda ve gençlerde görülsede son zamanlarda yayınlanan raporlar TD1'in 30 yaşından sonra teşhis edilen TD1 oranının 15-30% civarında seyrettiğini belirtmiştir. TD1'i olan hastalar yetersiz insülin salgısı nedeni ile dışarıdan insülin desteği almak durumundadırlar bu nedenle bu durum insüline bağlı diyabet olarak da isimlendirilmektedir. TD2 ise insülin direnci ve salgısının zarar görmesi ile oluşmaktadır ve genellikle çevresel faktörler tarafından da etkilenecek daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır (158).

Vücudumuzdaki temel yapı taşlarını oluşturan protein, lipid ve nükleik asitler gibi moleküller fruktoz, galaktoz ve glikoz gibi monosakkaritlerle kendiliğinden glikasyona uğrar. Geri dönüşümsüz bir süreç olan glikasyon sonucu ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu gerçekleşir. AGE'ler vücuttaki hücre ve dokularda birikerek diğer protein ve lipid molekülleri ile çapraz bağlarlar böylelikle biriktikleri dokunun fonksiyon gösterememesine hatta ileri durumlarda aktifliğini kaybetmesine neden olurlar. AGE'lerin endotelial hücreler, yumuşak kas hücreleri, monositler ve fibroblastlar gibi çeşitli yapılarda hedef olarak kullandığı reseptörleri (RAGE) vardır ve

AGE-RAGE şeklinde bir ikili oluşturarak etkilerini gösterirler. Sağlıklı durumlarda az miktarda sentezlenen RAGE'ler diyabet vakalarında artış göstermektedir (32). Damarsal açıdan zengin dokularda bu şekilde biriken AGE'ler dokularda biriken oksidatif stresin artmasına, hücre-matrix ve matrix-matrix arasındaki ilişkinin, endotel hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasına ve MMPlerin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Daha çok kollajen üzerinde biriken AGE'ler kollajen makromoleküllerinin daha stabil olmasına neden olmaktadır. Endotelial hücreler üzerinde biriken bu makromoleküller bazal membranın kalınlığını artırırken lümenini de daraltmaktadırlar. Aynı zamanda damarsal endotelial büyüme faktörünün(vascular endotelial growth factor, VEGF)artmasına, VEGF de neovaskularizasyona olarak isimlendirilen normal olmayan yeni kan damarlarının oluşmasına neden olmaktadır. Tüm bunlar da diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarını ortaya çıkarmaktadır, diyabetin klasik komplikasyonları; retinopati, nöfropati, nöropati, makrovasküler komplikasyonlar ve gecikmiş yara iyileşmesidir. Yüksek damarlı yapıya sahip periodontal dokular da bu durumdan oldukça etkilenmektedirler ve artık periodontitis yukarıda sayılanlara ek altıncı komplikasyon olarak literatürdeki yerini almıştır (15, 67, 68, 144, 237). Diyabetik farelerde *P. gingivalis* ile deneysel periodontitis oluşturularak yapılan bir çalışmada RAGE-AGE birleşimi engellenmiştir. Bunun sonucunda da TNF_{α} ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokin miktarları ve alveol kemik kaybında azalma meydana gelmiştir (128). Yapılan başka bir çalışmada Tip 2 diyabeti olan bireylerdeki serum AGE düzeylerinin artışı ile periodontitis paralellik göstererek arttığını göstermektedir(248).

2.6.1. Diyabetin Periodontal Hastalık Üzerine Etkisi

Diyabet ile periodontal hastalık ilişkisi pek çok farklı araştırma tarafından incelenmiştir; mikrobiyal dental plak miktarları ve içerdikleri bakteri türleri benzer olmasına rağmen T1D olan çocuklarla sağlıklı olanların karşılaştırılması sonucu hasta çocuklardagörülen gingivitisin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (57). 1980 yılından 2007 yılına kadarperiodontal hastalığı diyabetle ilişkisinin incelendiği 2440 araştırma

arasından belirli kriterler baz alınarak sekizadet longitudinal, 49 cross-sectional araştırma seçilerek bir meta-analiz yayınlanmıştır. 49 araştırmanın 27'sinde diyabetik bireylerde olmayanlara göre daha fazla sayıda görülen periodontitisin daha şiddetli seyrettiği, diyabeti olan kişilerin olmayanlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir mm daha fazla ataşman kaybı görüldüğü tespit edilmiştir. Diyabet ile periodontitis arasındaki ilerleme hızının araştırıldığı dört longitudinal çalışmanın üçünde de diyabeti olan kişilerde periodontitisin ilerleme hızının arttığı gözlemlenmiştir (42). Sadece diyabetli bireylerden oluşan bir çalışmada kötüglisemik kontrolü olan bireylerde iyi olanlara kıyasla periodontitisin daha hızlı ilerlediği görülmüştür (22, 67, 68). Başka bir çalışmada glisemik kontrolü zayıf olan diyabetli bireylerin kontrollü olanlara veya diyabeti hiç bulunmayanlara göre 11 kat daha fazla kemik kaybının olduğu görülmüştür (255). Yine benzer bir araştırma yaşları 45 ile 90 arasında değişen 4543 bireye uygulanmıştır ve sonucunda zayıf olan glisemik kontrolün periodontitis görülme oranını diyabeti kontrol altında olanlara ve diyabeti olmayanlara göre ortalama üç kat artırdığını göstermiştir (256). Sistemik olarak sağlıklı bireylerde ortalama 15% olan kemik kaybı kontrollü diyabette 28%'e kontrolsüz diyabette 44%'e çıkmıştır (257).

2.6.1.1. Diyabetin Periodontal Dokuları Etkileme Mekanizmaları

Bakteriyel floranın diyabetik olan/olmayan kişilerde benzer içeriği olduğu bulunmuştur (218). Bu durumda diyabeti olan bireylerde daha fazla oranda veya daha şiddetli görülen periodontitisin mikroorganizmalardan ziyade dengenin konak yanıtı tarafındaki defektlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır (66, 214, 215, 266). Diyabetli bireylerde sistemik sağlıklı olanlara kıyasla; nötrofillerin yapışma, enflamatuvar bölgeye göç etme ve bakterileri öldürme özellikleri zarara uğramıştır, bu da onların bakterileri daha az oranda öldürmesine neden olurken periodontal yıkımı da artırmaktadır (153, 157).

Yukarıda ayrıntılı şekilde anlatılan AGE-RAGE birleşimi monositler üzerinde biriken oksidatif stresin miktarının daha çok olmasına, monositlerin ve makrofajların yüzey özelliklerinin değişmesine ve nuklear faktör kappa-B sentezinin

artmasına neden olurken biyokimyasal olarak da serumda monositlerin ürettiği IL-1 β ile TNF α 'nında artış gösterdiği bilinmektedir. Bu da enflamasyonun süresinin daha uzun olmasına, periodonsiyumun ve kemik yıkımının daha çok olmasına neden olmaktadır. Serum transudası olan diş eti oluğu sıvısı, serumda artan enflamasyonu tetikleyen sitokin düzeyleri doğrudan etkilenmektedir(65, 177). Osteoblastik karakterde olan hücrelerin ve kollajenin üretiminin baskılanması sonucu oluşan kemiğin miktarı kadar kalitesi de azalmaktadır (145). Osteoblast ve fibroblast gibi matrix üretiminden sorumlu tutulan hücrelerin üretiminin ve farklılaşmasının azalması buna karşılık toplu ölümlerinin artması bağ doku metabolizmasında oluşan defektler ile birlikte periodontal ataşman kaybının artmasına neden olmaktadır (88,141). Plazmadaki artan glikoz seviyesi ile paralel seyreden DOS'daki artış, periodontal cep içerisinde bulunan fibroblastların fonksiyonlarını yerine getirememesine ve yara iyileşmesi ile doku yenilenmesinin bozulmasına neden olmaktadır (180).

Diyabet, önemli bir etkisini de kollajen metabolizması üzerinde göstermektedir; hiperglisemik ortamda fibroblastlar tarafından sentezlenen kollajenin miktarı, olgunlaşması ve homeostatik turn-overinin bozulması sonucu yeni sentezlenen kollajen yapılar azalmaktadır, oluşan kollajen de çok sağlam yapıda olmayıp kollajenaz enzimi gibi bazı MMP'ler tarafından yıkıma çok müsaittir. Mevcut olan kollajenin de AGE ile oluşturduğu çözülebilir olmayan yapılar kollajen dengesinde bozukluğa ve periodontal hastalıkta geç kalmış, yetersiz doku iyileşmesine neden olmaktadır (158,210, 266).

2.6.2. Periodontal Hastalığın Diyabet Üzerindeki Etkisi

Periodontal hastalık ile diyabet arasındaki çift yönlü ilişki bilinmektedir, mevcut periodontal enflamasyonun diyabet hastalarında glisemik kontrolü zorlaştırdığı düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmada kötü prognozlu dişlerin çekimi takiben yapılan başlangıç periodontal tedavilerinin ardından tip 1 diyabet hastalarına verilen insülin dozunun azaldığı bildirilmiştir (158). Başka bir çalışmada diyabet hastalarından periodontitisi olanların olmayanlara kıyasla altı kat daha kötü glisemik kontrollerinin olduğu belirtilmiştir (256). Periodontal enflamasyonun diyabetin diğer

vasküler komplikasyonlarını tetiklediğini savunan bir araştırma, hem diyabeti hem de periodontitisi olan hastaların 82%'sinde periodontitisi olmayanların ise 21%'inde kardiyovasküler, serebrovasküler komplikasyonlara rastlanılmıştır (262). Periodontal tedavinin Hb1c düzeylerini çalışmaların bazılarında anlamlı bazılarında anlamsız olarak azalttığı görülmüştür. Bir grup, periodontal tedaviyi sadece mekanik tedavi olarak uygularken başka bir grup ek olarak antibiyotik verilmesinin glisemik kontrol sağlanmasında faydalı olacağı görüşündedir; bir çalışmada mekanik periodontal tedavisi tamamlanan diyabet hastalarında diş eti kanaması olan bölge sayısı düşüş göstererek 55%'ten 24%'e ulaşmıştır. Hb1c seviyesi de gerileyerek 0,8% oranında gerileyerek 6.5%'e ulaşmıştır(122). Başka bir çalışmada sadece mekanik periodontal tedavi ile Hb1c değerinde 0.4% oranında görülen iyileşme antibiyotik takviyesi ile 0.7%'e ulaşmıştır fakat iki sonucun da anlamlı olmadığı görülmüştür(109). Farklı sonuçların olması; T1D'nin T2D ile ayrımının yapılmamasından, diyabet haricindeki sistemik durumunun yaratacağı etkiden ve çevresel faktörlerin de (sigara ve kişinin vücut kitle endeksi gibi)prognuzu negatif yönde etkilemesinden kaynaklanmaktadır(158).

2.6.2.1. Periodontal Hastalığın Diyabet Üzerindeki Etki Mekanizması

Periodontal hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan anaerobik bakterilerin serumda salgılanan IL-6 ve TNF seviyelerini artırması ve bunun da zayıf glisemik kontrol ve insülin direncinde artış ile sonuçlandığı bilinmektedir. Periodontal tedavi ile sadece lokal olarak enflamasyonun kontrolü sağlanmıyor aynı zamanda serumda düşüş gösteren pro-enflamatuvar sitokin seviyeleri glisemik kontrolün sağlanmasına yardım ederken buna paralel olarak Hb1c değerini düşürdüğü kabul edilmektedir. Bunu destekleyen sonuçlarda, tip 2 diyabeti olan bireylerde periodontal tedavi sonrasında azalan serum TNF α seviyelerine paralel olarak Hb1c'nin 8'den 7.1'e düştüğü gözlemlenmiştir (78).

2.6.3. Diyabet ve Yardımcı T Hücreleri Arasındaki İlişki

Yardımcı T hücreleri tarafından yönetilen T1D patogenezinin, Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki denge bozukluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir (212). β hücrelerinde mevcut olan lezyona karşı Treg hücreleri gibi immunregulasyonun sağlanmasından sorumlu mekanizmalarda herhangi bir defekt olması ve tam fonksiyon gösterememesi durumunda fazla miktarda sentezlenen veya gereğinden daha çok fonksiyon gösteren T hücreleri pankreasta konumlanan β hücrelerinin proteinleri ile reaksiyona girerek yıkımlarına neden olmaktadır. T hücre dengesinin bozulmasının genetik alt yapısı da bulunmaktadır; MHC II koruyucu geninin olmaması veya bazı yıkıcı karakterdeki genlerin fazla sentezlenmesi T hücrelerini harekete geçirmektedir (242).

T2D, salgılanan pro-enflamatuvar sitokinlerin artış gösterdiği düşük şiddetli devamlı kronik enflamatuvar hastalık olarak kabul edilmektedir. Diyabetli hastalarda serumdaki geniş bir yelpazede pro-enflamatuvar sitokinlerin araştırıldığı bir çalışmada; hiperglisemi tablosunda kandaki IL-10, IL-2, IFN γ , IL-17, TNF α ve IL-6 sitokinlerinin arttığı; IL-4'ün ise etkilenmediği bulunmuştur yani karşımıza Th17 ve Th1 hücrelerinin egemen olduğu bir hücre profilini çıkmaktadır (296). Bununla paralellik gösteren başka çalışmalarda T2D'de kanda bulunan IL-6, TGF β ile IL-1 β düzeyleri artış göstermektedir, bu sitokinler de farklılaşmamış T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşmesini sağlayan sitokinlerdir bu nedenle T2D'li bireylerde Th17 hücrelerinin artış göstermesi beklenen bir sonuçtur (91, 107, 186). T2D ile metabolik olarak benzer bir tablo gösteren obez bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada obez bireylerin kanında olmayanlara kıyasla daha fazla IL-23 ile IL-17 sitokinine rastlanırken IL-12 ve IFN γ seviyelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (239). Başka bir çalışmada T2D'in IL- β , IL-6 gibi pro-enflamatuvar mediyatörlerin artışını sağlayarak kişiyi periodontal hastalığa daha yatkın hale getirdiği belirtilmiştir (11). Treg hücreleri için ise tam tersi söz konusudur; T2D teşhisi konmuş bireylerde sağlıklılara göre CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ hücre sayısı ile salgılanan TGF β ve IL-10 seviyeleri anlamlı olarak daha az bulunmuştur (N. ve ark., 2018). 687 çalışmanın sonuçlarının derlendiği meta analizde; T2D'li bireylerin serum

örneklerinde anlamlı olarak artan IL-6, TNF_{α} ve TGF_{β} bulunduğu anlamlı olarak da azalan $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ hücreleri ve salgılanan IL-10 olduğugözlemlenmiştir. IL-17 miktarında ise fark bulunamamıştır (304).

T2D gibi T1D'de de benzer sonuçlar bulunmaktadır; Tip 1 diyabetli bireylerde daha fazla enflamatuvar sitokin sentezlenmesine bağlı olarak Treg hücrelerinin sayısında azalma veya fonksiyonlarında bozukluk olduğunu göstermiştir (126). Diyabetli bireylerden elde edilen kan örneklerinde sağlıklılardan elde edilenlere kıyasla altı kat daha fazla IL-6 bulunmuştur. Bununla paralel olarak daha fazla Th17 hücresi ve IL-17 miktarı ve daha az Treg hücresi bulunmuştur (211). Yine başka bir çalışmada enflamasyon kontrolünde çok önemli bir noktada bulunan Th17-Treg dengesinin Tip 1 diyabette Th17 yönüne doğru kaydığını ve bunun da diyabetin damarlarla ilgili olan komplikasyonlarını tetiklediğini savunmuştur fakat bu tablonun hipergliseminin nedeni mi sonucu mu olduğu tam bilinmemektedir. (212).

Biz çalışmamızı *in vitro* ve *in vivo* olarak iki bölümden oluşturduk. Çalışmamızın *in vitro* bölümde RvE1'in farklılaşmamış T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşmesini azalttığı hipotezini test ettik. Bu hipotezden yola çıkarak dendritik hücrelerin antijenle karşılaşp olgunlaşmaya başladığı aşamadan, antijenini yakalayıp farklılaşmamış T hücrelerine sunulduğu ve her iki hücre grubu tarafından salgılanan spesifik sitokinlerin farklılaşmış T hücrelerini yardımcı T17 hücrelerine dönüştürdüğü aşamaya kadar üç farklı noktada RvE1'in etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızın *in vivo* bölümünde RvE1'in hem periodontitiste hem diyabette sentezlenen Th17 hücre sayısını azaltarak anti-enflamatuvar etki gösterdiği hipotezini test ettik. Çalışmanın bu ayağının amacını periodontitis oluşturulmuş diyabetik farelerin RvE1 ile tedavi edilmesi sonucu sentezlenen Th17 hücrelerinin hesaplanması oluşturmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tezin araştırma bölümü ABD'nin Massachusetts eyaletinde Cambridge bölgesinde bulunan The Forsyth Institute'de yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Materyaller ve Alındıkları Firmalar

MACS Miltenyi Biotec: Cd11c Microbeads Ultra saf kit, CD4⁺ T hücre izolasyon kiti, T hücre medyumunu (TexMACs), TGF β proteini ve chemR23(APC) antikorları

Biolegend: Fare CD3 ve CD28 antijeni, fare IL-6 proteini, monoklonal fare antikorları; CD4(APC-A), CD25(FITC-A), FoxP3(Pacific Blue), IL-17 (R-PE-A), I-A^k MHC class II(PE), CD40 (PE/Cy5), CD86(FITC) ve CD80(APC)

Sigma Aldrich: Ionomycin ile PMA

R&D sistem: ROR γ t (PerCP-Cy5.5-a)

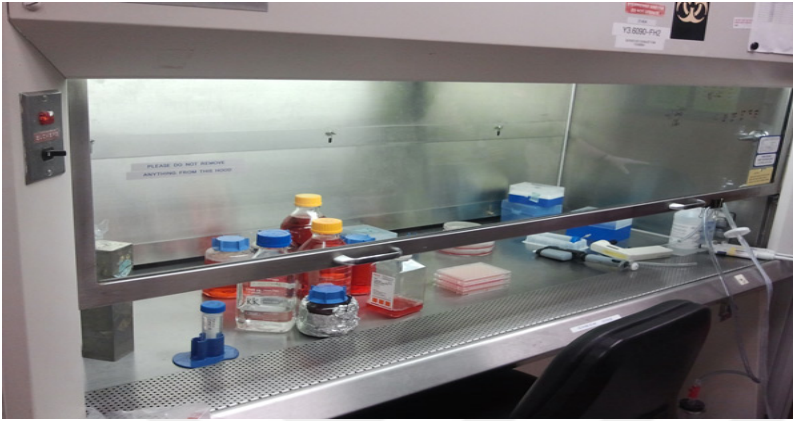
Thermofisher Scientific: monensin

Millipore Sigma: IL-2 LUMINEX kiti

3.2. *In Vitro* Deneyler

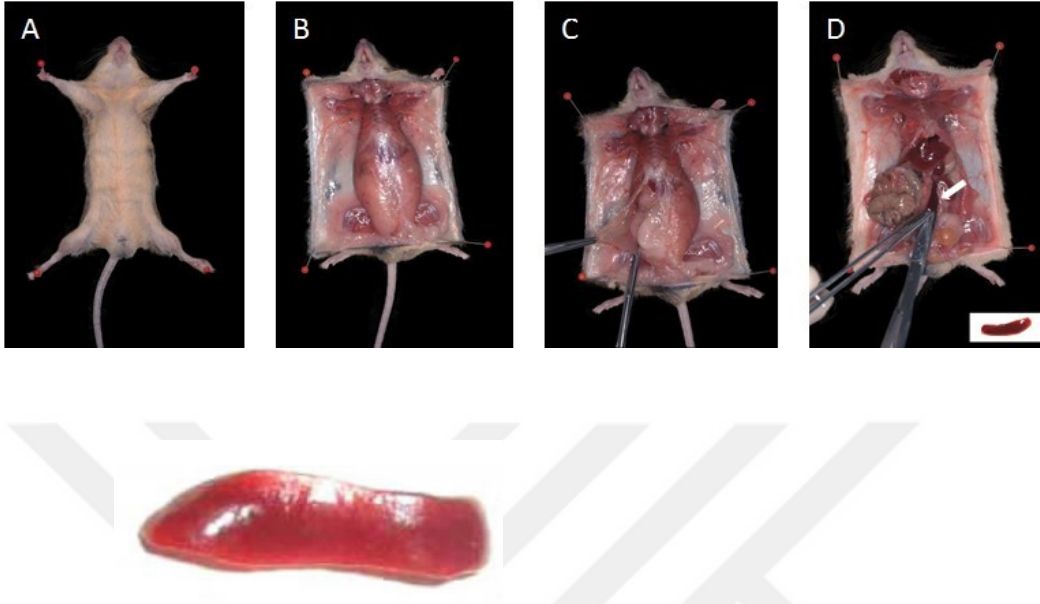
Çalışmamızda kullandığımız dişi ve erkek FVB, BALB/CBYJ tipinde olan fareler Jackson ve Charles River laboratuvarlarından alınmıştır. Wild type olarak isimlendirilen genetiğinde herhangi bir değişiklik yapılmamış fareler Forsyth Enstitüsü'nün hayvan bölümünde patojen olmayan ortamda 6 ile 10 hafta arasında muhafaza edilerek beslenmiştir. Tüm işlemler Hayvan Koruma ve Kullanma Komitesi ,(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) ile Forsyth Enstitüsü'nün

Hayvan Koruma ve Kullanma Komitesi tarafından ortaklaşa oluşturulan protokollere uygun olarak yapılmıştır. Yaşları 6 ile 10 hafta arasında değişen fareler sakrifiye edilip eksizyon yöntemi ile dalakları alınmıştır. 3-2 numaralı şekilde dalağın farenin karın boşluğundaki yeri ve eksize edildikten sonraki görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 3-1: Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı steril hood

Elde edilen dalak 6 mm'lik cam gode içerisinde PBS şeklinde kısaltılan steril fosfat içeren solüsyon (phosphate buffered saline, PBS) ile bekletilmiştir. Gode içerisindeki dalak ezilerek hücrelerine ayrıştırılmış ve kırmızı kan hücrelerinin eriyip ortamdan yok olması için amonyum, potasyum ve klorid içerikli ph değeri 7,4'e ayarlanan ACK lysis buffer eklenerek on dakika bekletilmiş ve sıfır derece 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler yıkama amacı ile iki kez on dakika PBS solüsyonunda bekletilmiş sonrasında yine önceki işlemde olduğu gibi santrifüj edilmiştir. Her santrifüjden sonra ise altta çöken hücreler üzerindeki sıvı aspire edilmiştir. Elde edilen solüsyon daha saf hücreler elde etmek için 70 ve 40 μ m'lık naylon filtrelerden geçirilmiştir. Splenositler daha sonra manyetik olarak aktifleştirilen bir hücre ayrıştırma sistemi ile izole edilerek spesifik hücre türlerine ayrıştırılmıştır



Şekil 3-2: Farenden elde edilen dalak ve karın boşluğundaki yeri

3.2.1. Manyetik Olarak Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırma Sistemi (Magnetic activated cell sorting, MACS)

MACS sütunları, microbead'leri ve solüsyonundan oluşan bu sistem manyetik etiketleme yöntemine dayanmaktadır. Microbeadler; üzerinde antikor işaretlenmiş manyetik nanopartiküllerdir ve bu antikorlar hücre yüzey reseptörlerine özeldir. Hücre kültürlerine eklenen microbeadler dört santigrat derecede on dakika boyunca inkübe edildikten sonra süspansiyon, manyette takılı bulunan kolon içerisine aktarılmıştır. İşaretlenen hücre yüzey reseptörlerine sahip olan hücreler manyetin içerisinde kalırken işaretlenmeyenler alttan akmaktadır. MACS sisteminde pozitif ve negatif olmak üzere iki yöntem vardır; negatif seçim yönteminde, işaretlenmeyerek kolonun altından akan

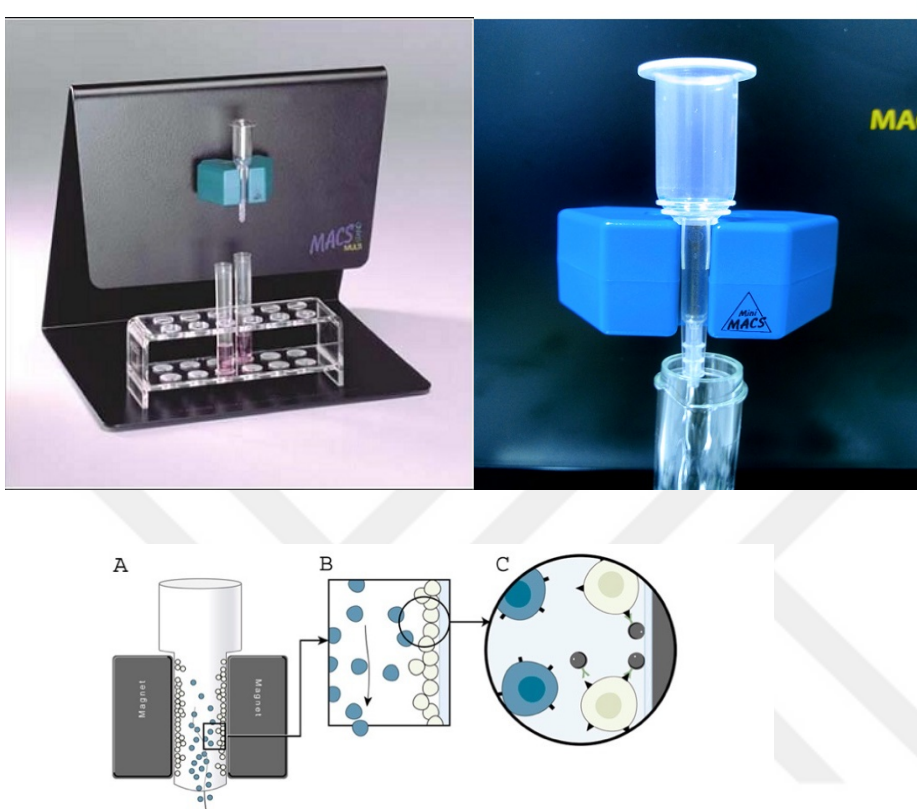
süspansiyon hedef hücreler iken pozitif seçimde, hedef hücreler işretlenerek kolon içinde kalanlardır ve kolon manyetten ayrıldıktan sonra üzerinden basınç uygulanarak elde edilmektedir. Bu sistem ile yüksek oranda saf ve canlı hücreler elde edilmektedir (<https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/macs-cell-separation/basic-principle-of-magnetic-cell-separation.html>) . Şekil 3-3`te MACS sistemi gösterilmiştir.

MACS sistemine aktarılan splenositlerden CD11c⁺ dendritik hücreler pozitif seçim yöntemi ile CD4⁺ T hücreleri ise negatif seçim yöntemi ile izole edilmiştir. CD4⁺ T hücreleri için;CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD45R, CD49b, CD105, Anti MHC Class II, Ter119 ve TCR γ / δ yüzey markerlarını işaretleyen antikorlar kullanılmıştır.

3.2.2. T Hücre Farklılaşması

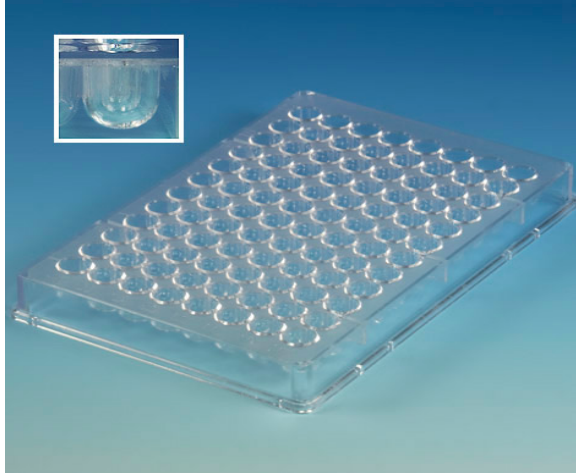
İzole edilen farklılaşmamış CD4⁺ T hücreleriTh17 hücrelerine farklılaştırılırken 5 farklı grup oluşturulmuştur; 1) T hücre aktivasyon grubu 2) T hücre polarizasyon grubu 3) 1 nM 4) 10 nM ve 5) 100 nM RvE1 grubu. Tüm deneyler şekil 3-4`te gösterilentabanı U şeklinde olan 96 kuyucuktan oluşan plakalar içerisinde yapılmıştır ve her koşul için üç farklı kuyucuğun herbirinde 10⁵ CD4⁺ T hücresi 200 μ l T hücre medyumunda (10% FBS and 1% Penicilin Streptomycin ilave edilmiş) olacak şekilde inkübasyon yapılmıştır. Aktivasyon ve polarizasyon grupları için, tabanı U şeklinde olan 96 kuyucuktan oluşn plakalardaki her kuyucuk 200 μ l steril PBS içerisinde bulunan 30 μ l of anti-CD3(10 μ g/ml) ile dört saat boyunca 37°C`de inkübe edilmiş ve sonrasında 200 μ l steril PBS ile iki kez yıkanmıştır. Aktivasyon grubuna 1.5 μ g/ml anti-CD28 eklenmiş polarizasyon grubu için; toplamı bir ml olan5 ng/ml TGF β proteini, 1,5 μ g/ml CD28 antikoru ve 20 ng/ml IL-6proteini içeren bir polarizasyon kokteyli hazırlanarak 100 μ l`si kullanılmıştır. Resolvin gruplarına ise 100  $\mu$ l polarizasyon kokteyline ek olarak sırası ile 1, 10 ve 100 nM RvE1 ilave edilmiştir. Firmadan alınan RvE1 uygulanacak doza göre etanol içerisinde seyreltilmektedir. Tüm hücreler 37°C`de beş gün boyunca inkübe edilmiş ve RvE1 ilk gün ve üçüncü gün eklenmiştir, buharlaşan

medyum nedeni ile hücrelerin kurumaması için ikinci ve dördüncü gün taze medyum ilavesi yapılmıştır.



Şekil 3-3: Hücre izolasyonunda kullanılan MACS sistemi

5 günün sonunda hücreler FACS analizi için supernatantlar ise LUMINEX ve AYOXXA analizleri için toplanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde en iyi sonucu elde etmek için farklı resovlin dozları kullanılmıştır sonucunda da aralarında anlamlı fark olmasa da 10 nM RvE1 ile daha başarılı sonuçlar elde edildiği için bundan sonraki deneylerde sadece bu doz kullanılmıştır.



Şekil 3-4: U-bottom şeklinde 96 kuyucuktan oluşan plaka

3.2.3. Dendritik Hücrelerin Uyarması ile Th17 Farklılaşması

Dendritik hücrelerin uyardığı farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüştürme kapasitesini ölçmek ve RvE1'nin buradaki fonksiyonunu öğrenmek amacı ile $CD11c^{+}$ dendritik hücreleri (1000/200 μ l) ile $CD4^{+}$ T hücreleri (50,000/200 μ l) U bottom şekilli 96 kuyucuklu plakalarda inkübe edilmişlerdir. Dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağlamak için antijen olarak PAM3CSK4 (100 ng) ilave edilmiştir. PAM3CSK4; triacylated lipopeptide formüllü sentetik bir moleküldür ve bakterilerin virulans faktörü olan lipopolisakkaritlerinin acyl amino uçlarını taklit etmektedir. PAM3CSK4'nin NF- κ B'nin uyarıcı yapısı olduğu bilinmektedir ve yapılan çalışmalar bu molekülün TLR2 aracılığı ile Th17 farklılaşmasını sağladığı bulunmuştur.

6 farklı deney grubu oluşturulmuştur;

- 1) Sadece farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri
- 2) Farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri + PAM3CSK4
- 3) Dendritik hücreler + farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri

- 4) Dendritik hücreler +farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri +10 nM RvE1
- 5) Dendritik hücreler + farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri + PAM3CSK4
- 6) Dendritik hücreler + farklılaşmamış $CD4^{+}$ T hücreleri + PAM3CSK4 + RvE1

İlk olarak hücreler 10 nM RvE1 ile 24 saat $37^{\circ}C$ 'de inkübe edilmiş daha sonra 100 ng Pam3CSK4 ilave edilmiştir. Üçüncü gün bir doz daha RvE1 uygulanmıştır. Beşinci gün FACS analizi için hücreler ve sitokin seviyelerini belirlemek için supernatantlar toplanmıştır.

3.2.4. Dendritik Hücre Olgunlaşması

Resolvinin dendritik hücre aktivasyonundaki etkisini araştırmak amacı ile $Cd11c^{+}$ dendritik hücreler, RvE1 olduğu ve olmadığı ortamda 100 ng Pam3CSK4 ile uyarılmışlardır. 2×10^5 dendritik hücre 48 kuyucuklu plakalarda 500 μ l RPMI (10% FBS, 1% antibiyotik içeren) medyum içerisinde inkübe edilmişlerdir. İlk olarak hücelere 24 saat boyunca $37^{\circ}C$ 'de RvE1 uygulanmış daha sonra Pam3CSK4 ilave edilmiştir. İkinci gün bir doz RvE1 daha uygulanmış üçüncü günün sonunda ise elde edilen hücreler FACS analizi yapılması için süpernatantlar ise sitokin seviyelerini belirlenmesi için toplanmıştır. Kontrol amacı ile hücre ile RvE1 ve hücre ile Pam3CSK4 grupları oluşturulmuştur.

3.3. *In Vivo* Çalışma

3.3.1. Ligatür Kaynaklı Alveol Kemik Kaybı ve Oluşturulan Fare Grupları

In vitro çalışmada olduğu gibi Jackson laboratuvarlarından (Bar Harbor, ME) FVB tip fareler alınmıştır. Tüm işlemler Hayvan Koruma ve Kullanma Komitesi

(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) ile Forsyth Enstitüsü'nün Hayvan Koruma ve Kullanma Komitesi'nin ortaklaşa oluşturduğu protokollere uygun olarak yapılmıştır. Fareler, doku içine enjekte edilen 100mg/kg'lık Ketamine ve 5 mg/kg'lık Xylazine ile uyutulduktan sonra üst çenede hem sağ hem sol ikinci molar dişlerin etrafına 7-0 ipek geçirilerek düğümündamak bölgesinde kalmasına dikkat edilecek şekilde bağlanmıştır. Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır;

- 1) Wild type (herhangi bir genetik değişikliği bulunmayan fareler, WT)
- 2) transjenik fareler (chemR23 reseptörü fazla sentezlenen fareler, ERV1)
- 3) diyabetik fareler (db/db)
- 4) double transjenik fareler (ekstrachemR23 reseptörü sentezlenen aynı zamanda diyabetik olan fareler, db/ERV1).

Her grup da kendi içerisinde 3 alt gruba ayrılmıştır;

- 1) Kontrol grubu(ligatür bulunmayan grup)
- 2) Ligatür grubu(yapay periodontitis oluşturulmuş grup)
- 3) Ligatür + RvE1 grubu (yapay periodontitis oluşturulmuş ve RvE1 ile tedavi edilmiş grup).

RvE1 verilen grupta olan farelere yedi gün boyunca her gün topikal 10 μ M uygulanmıştır. Bir hafta sonra kurban edilecek farelerin sağ üst çenesi histolojik inceleme için 24 saat boyunca 10% oranında formalin içeren solüsyonda bekletilmiştir. Dekalsifikasyon için dört hafta 10%`luk EDTA içerisinde bekletilen örnekler daha sonra bir gece boyunca önce 50% daha sonra 70% etanol içeren sıvılarda dört santigrat derecede muhafaza edilmişlerdir. Örnekler parafine gömülmeden bir gün önce sırası ile önce sekiz saat 95% etanol daha sonra bir gece boyunca 100% etanol içerisinde bekletilmiştir. Parafine gömülen örnekler sonrasında beş μ m'lik kesitler elde edilecek şekilde bölünmüştür.

3.3.2. Transjenik Farelerin Hazırlanması (ERV1)

Transjenik fareler Forsyth Enstitüsü'nün hayvan biriminde hazırlanmışlardır. Farelerin tam-uzunluk hCD11b uyarıcı cDNA'sı klonlanarak yükseltilmiş ve tam-uzunluk chemR23 cDNA elde edilmiştir. Farelerin kulağından alınan biyopsi örnekleri ile PCR kullanılarak farelerin genotipi teyit edilmiştir; fare chemR23 için reverse primer: 5'- TAGAAAGCCAGGACCCAG-3'¹² forward primer: 5'- CTCGGTCTCCTAGGCAAC-3'.

3.3.3. Diyabetik Farelerin Hazırlanması

Leptin hormonu beyne tokluk hissi göndermektedir ve reseptörünün eksikliği de doğumdan kısa süre sonra obeziteye neden olmaktadır. Doğumda normal kiloya sahip fareler bu reseptörün eksikliğinden dolayı sürekli olarak açtırlar ve hızlı kilo almaya çok müsaittirler. Bu durum tip iki diyabeti taklit etmektedir ve bu fareler db/db şeklinde gösterilir. Erkek *db/-* (heterozigot) ve *db/db* (homozigot), FVB [FVB.BKS(D)-*Lepr^{db}*/ChuaJ] tip fareler Jackson laboratuvarından alınmıştır. Double transjenik (db/ERV1) olarak isimlendirilen fareler ise hem diyabetikler hem de resolvin reseptörleri (chemR23) fazla sentezlenmiştir. Oluşturulmaları için ise; öncelikle transjenik fareler (ERV1) ile *db/-* (heterozigot) olanlar çiftleştirilerek ilk (F1) jenerasyon oluşturulmuştur (*ERV1⁺ db/-*), F1 jenerasyonu ise daha sonra kendi içerisinde çiftleştirilerek db/ERV1 transjenik olanlar elde edilmiştir. Genotip tayini için ise Jackson laboratuvarı tarafından hazırlanan protokole uygun olarak RsaI ile enzimin sindirilmesi kısıtlanarak PCR ile gen analizi yapılmıştır; 5'- AGAACGGACACTCTTTGAAGTCTC-3' forward primer için 5'- CATTCAAACCATAGTTTGGTTTGTGT-3' reverse primer için kullanılmıştır. Çift bandlı *db/db* fareler 108 and 27 bp tek bandlı WT fareler ise tek band 135 bp ile göstermektedirler. Kan şekeri ise farelerin herbirinden alınan bir damla kanın "Blood Glucose Monitoring System QSTEPS Biometer Dual Monitoring System; Biomedix, St. Paul, MN" sistemi kullanılarak ölçülmüştür.

3.4. Analiz Yöntemleri

3.4.1. FACS Analizi

Lazer temelli bir teknoloji olan flow cytometry heterojen hücre popülasyonunda bulunan hücre yüzeyi moleküllerinin ve hücre içinde üretilen moleküllerin analizini yapmak, farklı hücre türlerinin karakterini belirlemek ve tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte floresan ile işaretlenmiş antikorlar kullanılarak floresan yoğunluğu ölçülmekte ve protein tayini yapılmaktadır(<https://www.facs-analysis.com>). Bizim çalışmamızda dendritik hücreler üzerinde chemR23, MHC II, CD80, CD40 ve CD86,antikorları ölçülmüştür. Analiz yapılmadan önce hücrelerin ölçüm için hazırlanması gerekmektedir bunun için de hücreler oda sıcaklığında on dakika sırası ile fikse edilmeleri için 4% Paraformaldehit içeren, permeabilize edilmeleri için 0.1% Triton içeren solüsyonlarda daha sonra bloke etmek için buz üzerinde on dakika 0.5% BSA içeren solüsyonunda bekletilmişlerdir. Daha sonra yukarıda sayılan antikorlardan oluşan karışım hücrelere eklenerek 15 dakika buz üzerinde bekletilip analiz yapılmıştır.

T hücreleri için ise CD4, CD25, CCR6, chemR23, FoxP3, ROR γ t ve IL-17 antikorları ölçülmüştür. Hücre içinde üretilen antikorların analizi için önce üç farklı kuyucuktaki hücre kültürleri 24 kuyucuklu daha büyük bir plakaya alınmış ve “PMA (phorbol myristate acetate) (50 ng/ml), ionomycin (1 μ M) ve monensin (1X)” içeren bir ml toplam medyum içinde 37°C`de altı saat bekletilmiştir. Hücre dışı salgılanan yüzey reseptörlerinden olanchemR23 ile birlikte CCR6, CD25 ve CD4`den oluşan bir antikor kokteyli hazırlanmış ve hücrelere eklenmiştir daha sonra Paraformaldehit, BSA ve Triton adımları aynı yukarıda anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. En son hücre içi salgılanan antikorlardan olan ROR γ t, FoxP3 ve IL-17 karışımı hücrelere eklenmiş daha sonra analiz yapılmıştır. Tüm FACS analizleri “Attune NXT Flow Cytometer Software sistemi” kullanılarak yapılmıştır.

3.4.2. Sitokin Seviyesi Ölçülmesi

IL-2, LUMINEX kitleri ile Th17 ailesine ait sitokinler; $TGF\beta$, IL-17A, IL-6, IL-17F, IL21, CCL20 de AYOXXA ile ölçülmüştür.

LUMINEX

Salgılanan proteinleri ölçmek amacı ile kullanılan yüksek hassasiyeti ve düşük miktardaki hücre süspansiyonu ile daha fazla sayıda mediyatörü ölçme kapasitesi nedeni ile sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Teknik olarak ise öncelikle antijene özel antikorlardan oluşan manyetik mikropartiküllerin kuyucuklara emdirilerek kaplanmaktadır daha sonra standart ve hücre süspansiyonları kuyucukluklara eklenerek hareketli durumda olan antikorlar ile antijenin birbirine bağlanması sağlanmaktadır. Yıkama aşaması ile bağlanmayan antikorlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra eklenen streptavidin-phycoerythrin (streptavidin-PE) ilgili antikorlara bağlanmaktadır. Bağlanmayan streptavidin-PE'ler de yine yıkanarak ortamdan uzaklaştırılırlar. Daha sonra plakalar analiz için özel cihazlara alınmaktadır. Makinenin içerisinde bulunan manyetler superparamanyetik mikropartikülleri yakalayarak tutarken iki farklı ışık emici kuyucukları ışıklandırmak için kullanılmaktadır. İlk ışın bölgeyi belli etmek amacı ile boyayı hareketlendirirken ikincisi PE'yi hareketlendirerek birbirine bağlı antijen miktarını hesaplamaktadır. Her bir kuyucuktaki örnekler CCD kamera aracılığı ile filtrelerden geçerek hareketlenme miktarları arasındaki fark hesaplanmaktadır (<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/luminex-multiplex-assays.html>). Şekil 3-5'te LUMINEX kiti ve kitin ölçüm cihazı görülmektedir.

Biz T hücresi ve dendritik hücrelerden elde ettiğimiz IL-2 miktarlarını LUMINEX yöntemi ile analiz ettik. Bunun için üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırladığımız standartları ve örnekleri kuyucuklara ekledikten sonra mikropartikül kokteyli ekleyerek bir gece soğuk ve karanlık odada sallayıcı (shaker)

üzerinde beklettik. Ertesi gün yıkama işleminin ardından Biotin antikor kokteyli ekleyip oda sıcaklığında yine karanlık ortamda bir saat shaker üzerinde beklettik. Daha sonra sırası ile yıkama ve streptavidin-PE aşamalarını uygulayıp yarım saat shaker üzerinde beklettikten sonra son kez yıkayıp özel cihazı ile ölçüm gerçekleştirilmiştir (<https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>).

AYOXXA

Çalışmamızda Luminex gibi multiplex bir protein analiz sistemi olan AYOXXA'nın Th17 ailesine ait sitokinler için özel olarak hazırladığı kit kullanılmıştır. Düşük hacimdeki (üç mikrolitre) süspansiyonların içerisinde çok sayıda protein analizi yapabilen bu sistemin hassasiyeti çok yüksektir. Analiz için ise LUNARIS ölçüm sistemi kullanılmıştır (<https://www.ayoxxa.com/company>).



Şekil 3-5: LUMINEX kiti ve analiz cihazı

Histolojik Analiz:

Kesitleri boyamak için izlenilen kullanılan materyaller, uygulanan adımlar ve gerekçeleri aşağıda anlatılmıştır.

1)Elde edilen kesitler öncelikle parafin mumunun uzaklaştırılması (deparaffinizasyon) için sırası ile iki kez beşer dakika olmak üzere xylene, 100% ethanol ve 95% ethanol içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra bir kez beş dakika 80%, 70% ve 50% ethanol içerisinde bekletilip distile su ile iki kez beş dakika süresince yıkanmıştır.

2)Endojen peroksidaz (hidrojen peroksitleri parçalayan enzim) aktivitesini bloke etmek için oda sıcaklığında pH değeri 7,4 olan 0.3%'lük H_2O_2 kesitlere eklenerek beş ile on dakika arasında bekletilmiştir.

3)PBS ile 5 dakika boyunca yıkama yapılmıştır

4) Antijeni geri alma işlemi için yüksek ısıda bir dakika, düşük ısıda yedi dakika mikrodalga içerisinde ısı uygulanmış sonrasında beş dakika PBS ile yıkanmıştır.

5)Primer antikor uygulanarak bir gece dört derecelik dolapta muhafaza edilmiştir.

6)Ertesi gün dolaptan alınarak oda sıcaklığına getirilen örnekler iki kez beşer dakika PBS ile yıkanmıştır.

7)ABC kiti eklenen örnekler 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

8)İki kez beşer dakika PBS ile yıkandıktan sonra 45 saniye süresince DAB kiti uygulanan slaytlar daha sonra musluk suyuna alınmıştır.

9)Slaytlar hematoksilen (histolojik çalışmalarda hücre çekirdeğini ve kromozomları koyu renkli göstermek için kullanılan boya) içinde bekletilip sonra musluk suyu ile yıkanmıştır.

10)Slaytlar dehidratasyon için sırası ile 50%`lik, 70%`lik, 80%`lik, 95%`lik, 100%`lük etanol ve en sonunda xyleneiçinde bekletildikten sonra cam lamel yapıştırılarak kurumaya bırakılmıştır.

11)Mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Xylene; petrol, odun katranı ile maddened doğal olarak bulunan aromatik hidrokarbon molekülünde olan, histoloji laboratuvarlarında dokuları işleyen, boyamaya yardım eden veya lamel ile üzerlerini kaplanmasını sağlayan renksiz fakat yüksek toksisiteye sahip bir sıvıdır (Kandyala R. et al., 2010). Histolojik kesitler alınırken dokunun morfolojisini sabitlemek için fiksasyon yapmak gereklidir fakat bu işlemin proteinin biyokimyasını değiştirdiği ve moleküllerin maskelenerek kendilerini boyayacak antikora bağlanmalarını zorlaştırdığı bilinmektedir. Antijen geri alımı moleküllerin maskelenmesini kaldırarak, antikorun bağlanmasını kolaylaştırmak amacı ile mikrodalga fırında, otoklavda, buhar fırınında veya ultrasound ile dokulara ısı uygulanması işlemidir. (<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/antigen-retrieval-methods>). ABC kiti boyama esnasında arka planda oluşan yansımaları önlemek için kullanılmaktadır (<https://vectorlabs.com/vectastain-abc-kit-standard.html>). DAB kiti, nikel klordi ile cobalt kloridin kullanılarak peroksidazların koyu kahverengi rengine boyanmasını sağlayan iki farklı sıvıdan oluşan kittir. Görüntüleme esnasında diğer antijen odaklarından ilgili antijenin ayrılmasını sağlamaktadır (<https://vectorlabs.com/dab-peroxidase-hrp-substrate.html>).

3.5. İstatistik

SPSS 25.0 (Statistical Packages of Social Sciences) program kullanılarak veriler bilgisayarada analiz edildi. Açıklayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler şeklinde gösterildi. İkiden fazla grubun normal dağılımına uymayan değişkenlerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmaları (post-hoc) için ise Mann-whitney U testi yapıldı.

Sonuçlar Bonferroni düzeltmesi yapılarak yorumlandı. $p<0,05$ olması durumuna aradaki fark anlamlı kabul edildi.



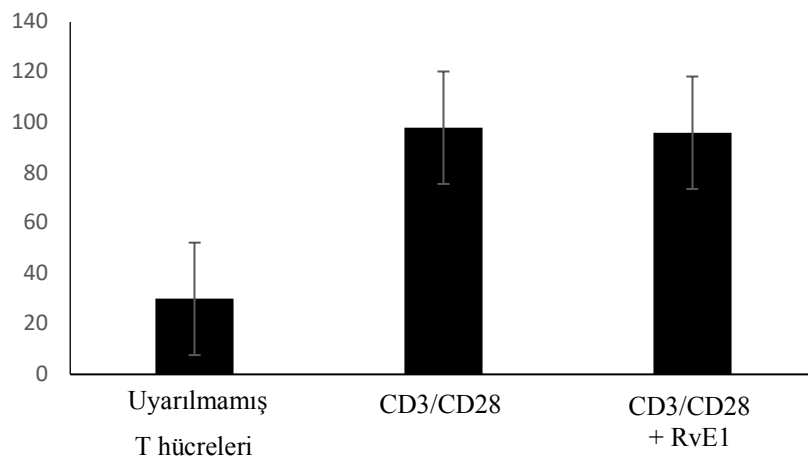
4. BULGULAR

4.1. *İn Vitro* Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar

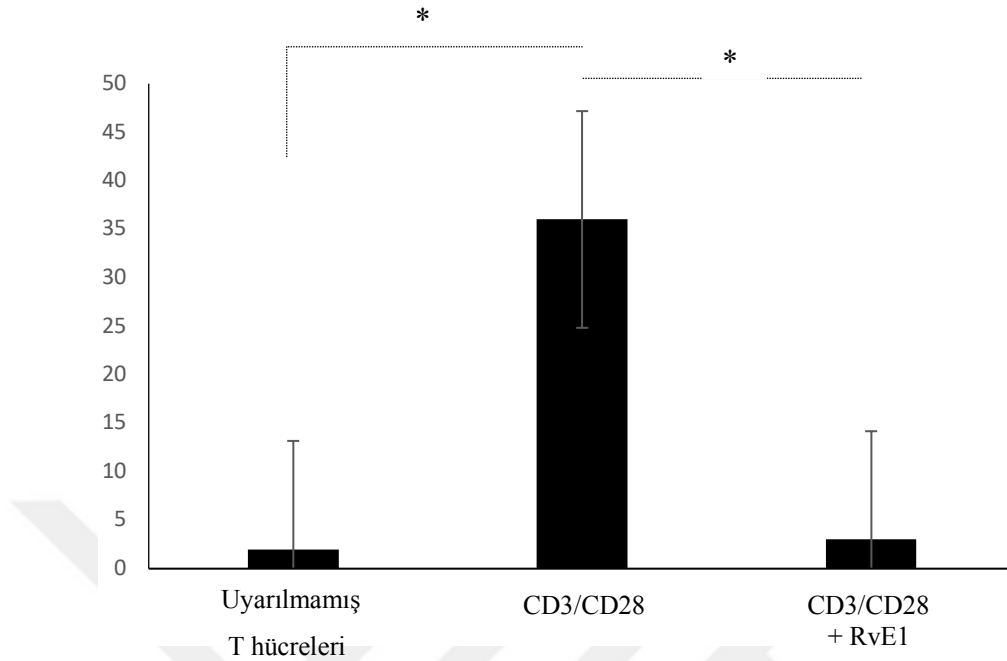
4.1.1. RvE1'in T Hücre Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi

RvE1'in T hücre aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek amacı ile herhangi bir uyarıcı ajan veya antijen eklenmedendalak hücrelerinden izole edilen farklılaşmamış CD4⁺ T hücreleri CD3/CD28 ileaktifleştirilmiş ve RvE1 ilave edilerek beş gün boyunca kültüre edilmiştir. Beş günün sonunda toplanan hücreler flow cytometryile incelenerek CD4 ve CD25 sentezi analiz edilmiştir; birbirinden bağımsız üç deneyden elde edilen sonuçların ortalamasına göre RvE1'in CD4 sentezi üzerine herhangi bir etkisi yoktur, her iki gruptaki sonuçlar 95%'in üzerinde bulunmuştur ($p>0,05$)(Şekil 4-1a). Buna karşılık RvE1, CD25 sentezini anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0,05$); kontrol grubunda 36% olan oran RvE1 ilavesi ile 3%'e düşürülmüştür (Şekil 4-1b).

a) CD4



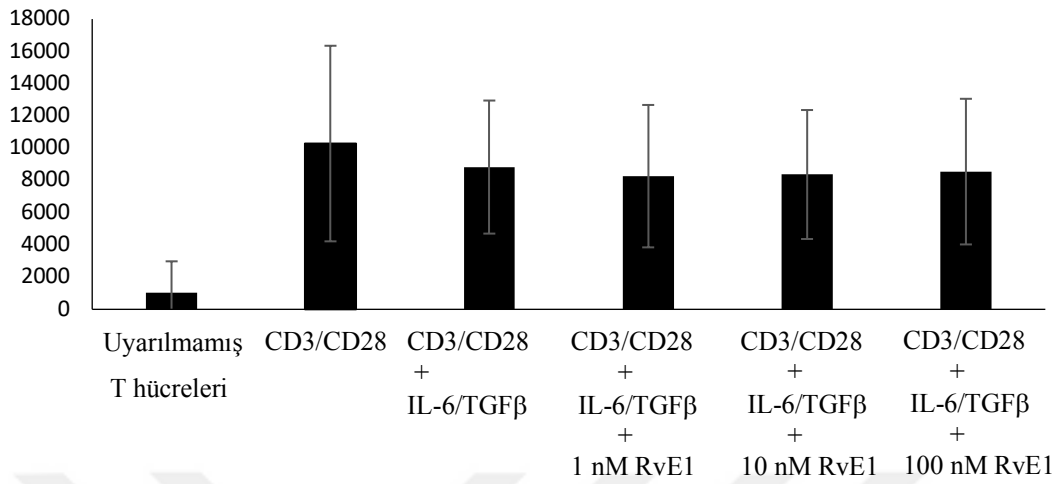
b) CD25



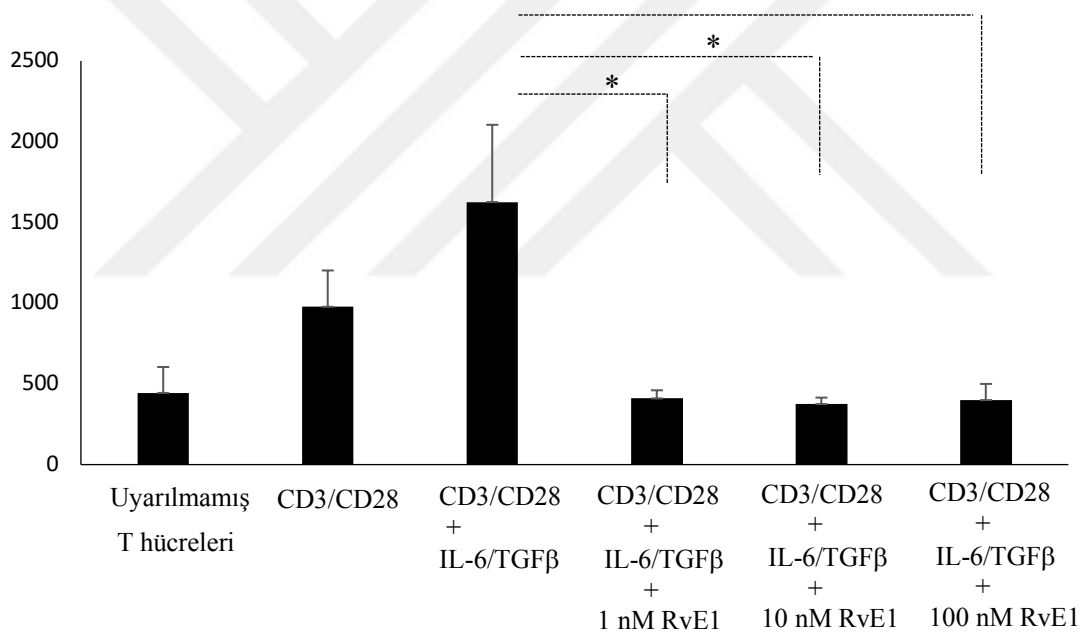
Şekil 4-1: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi sırasında ilave edilen RvE1'in a) CD4 ($p>0,05$) ve b) CD25 ($p<0,05$) sentezine etkisi. * $p<0,05$

Daha sonra dalaktan elde edilen farklılaşmamış $CD4^+$ T hücrelerinin yine aynı ajanlar kullanılarak aktive edilmesinden sonra IL-6 ve $TGF\beta$ eklenerek Th17 hücrelerine farklılaşması sağlanmış 1, 10 ve 100 nM'lık üç farklı RvE1 grubu oluşturularak da farklı dozdaki resolvinlerin etkisi hesaplanmıştır. Birbirinden bağımsız 6 deneyden elde edilen sonuçlara göre; Th17 hücrelerine farklılaşan hücreler farklılaşmayanlara göre iki kat daha fazla CD25 reseptörü sentezlemektedir ve her üç dozdaki resolvin bu oranı azaltarak farklılaşmamış hücrelerden daha düşük seviyeye getirmiştir ($p<0,05$)(Şekil 4-2).

a) CD4



b) CD25



Şekil 4-2: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1'in a) CD4 ($p>0,05$) b) CD25 ($p<0,05$) sentezine etkisi * $p<0,005$

CD4⁺CD25⁺ hücre oranlarına bakıldığında ise temsili bir deneyden elde edilen sonuçlarda 58,8 olan oran Th17'ye farklılaşan grupta 70%'e çıkarılmış resolvinin 1 nM dozu ile 6,1%'e, 10 nM ile 3,67%'ye ve 100 nM ile 4,6'ya gerilemiştir (Şekil 4-3).

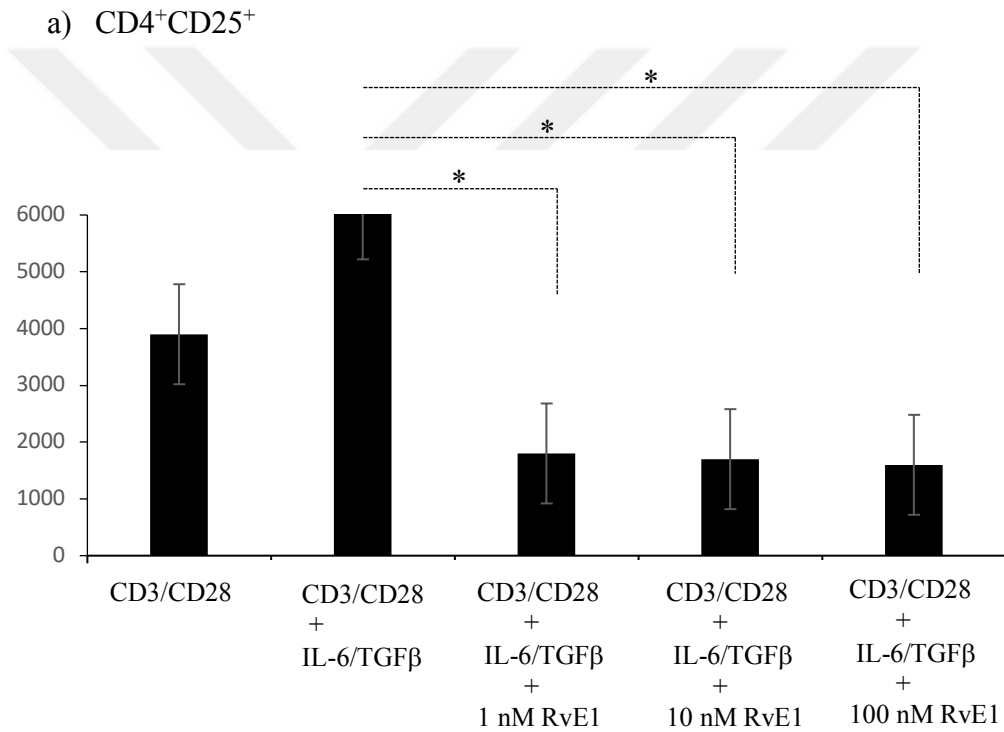
4.1.2. RvE1`in Th17 Farklılaşması Üzerindeki Etkisi

Resolvinin Th17 hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisini incelemek amacı ile Th17`nin transkripsiyon faktörü olan ROR $\gamma$ t ve spesifik sitokini olan IL-17 reseptörlerinin sentezlenme seviyeleri hesaplanmıştır. ROR $\gamma$ t hesaplanarak farklılaşmamış CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin Th17`ye dönüşme oranları, IL-17 hesaplanarak da ne kadar sitokin salgıladıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; hücreler CD3/CD28 ile aktive edildiği zaman sentezlenen ROR γ t ve IL-17 oranları artmıştır, IL-6/TGF β ile Th17 hücrelerine farklılaştığı zaman ise bu reseptörlerin sentezinde az da olsa artış görülmüştür. RvE1 ilavesi ise her iki reseptörün sentezlenme oranlarını anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0,05$); yani RvE1 reseptör düzeyinde Th17 hücrelerinin hem farklılaşmasını hem de sentezledikleri sitokin miktarını azaltmıştır (Şekil 4-4).

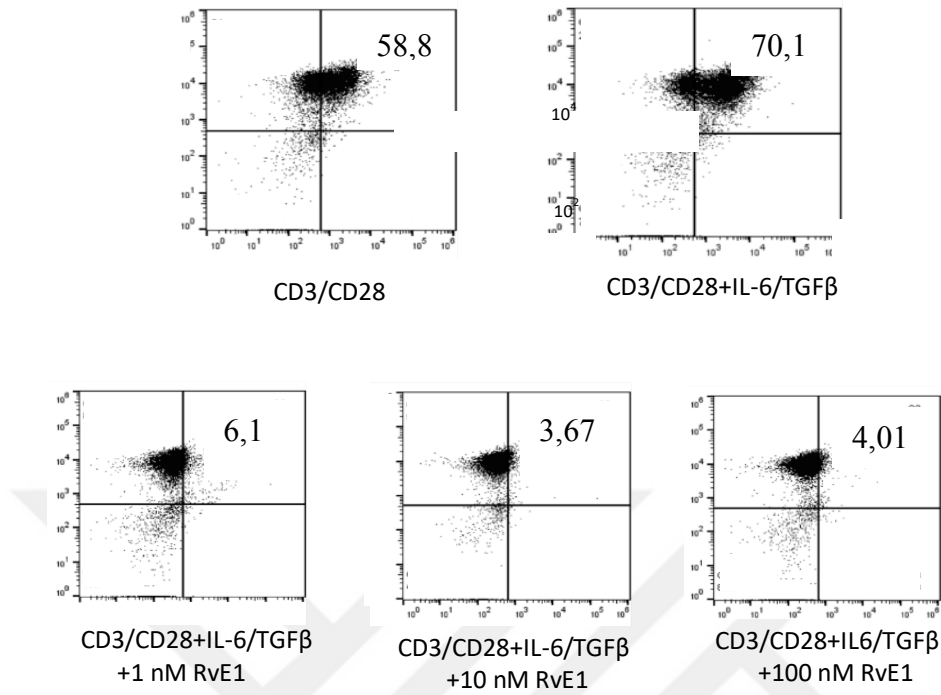
Daha sonra CD4⁺CD25⁺ tarafından sentezlenen ROR γ t ve IL-17 reseptörleri hesaplanmıştır; her iki reseptörün sentezi anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$) ve bu fark sadece CD4⁺ hücreleri ile çıkan sonuçlardan daha fazladır bu da bize resolvinin CD4⁺CD25⁺ hücreleri üzerinde daha fazla etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 4-5).

Sentezlenen reseptörlere ek olarak Th17 farklılaşmasını değerlendirmek için salgıladıkları protein seviyelerine de bakılmıştır; bu amaçla AYOXXA ile IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-10 seviyeleri hesaplanmıştır (Şekil 4-6). IL-17 ailesinin en önemli iki üyesi olan IL-17A ve IL-17F RvE1 verildikten sonra anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$) fakat IL-17A üzerinde daha etkili sonuç görülmüştür. IL-6/TGF β ile Th17 hücrelerine farklılaşan hücreler çok daha fazla oranda IL-21 sentezlerken RvE1 bu sitokinin salgılanmasını azaltarak neredeyse sıfırlamıştır. Bununla birlikte artış göstermesi beklenen IL-10 miktarı da anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$). CD25 sentezinden elde ettiğimiz sonuçları desteklemek amacı ile CD25 ligandı olan IL-2`nin hücreler tarafından salgılanma miktarları da hesaplanmıştır. Sonuçlar reseptör ile paralellik göstererek Th17`ye farklılaşan hücrelerin salgıladığı IL-2 artış olurken resolvinin üç farklı dozunun da bunu anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür ($p<0,05$)

(Şekil 4-6). CCR6 reseptörü ve ligandı CCL20 Th17 hücrelerinin enflamasyon bölgesinde toplanmasından sorumludurlar, resolvinin bu iki molekül üzerindeki etkisine de bakılarak Th17 sentezlenmesi dışında farklılaşan Th17 hücrelerinin hareketi üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; Th17'ye farklılaşan hücrelerde anlamlı şekilde daha fazla CCR6 ve CCL20 sentezlenmiştir ve RvE1 her ikisinin de miktarını azaltmıştır ($p<0,05$) fakat CCL20 üzerinde daha etkili olarak seviyesini neredeyse sıfırlamıştır (Şekil 4-7). Çalışmanın bundan sonraki bölümü 10 nM resolvin ile devam ettirilmiştir.

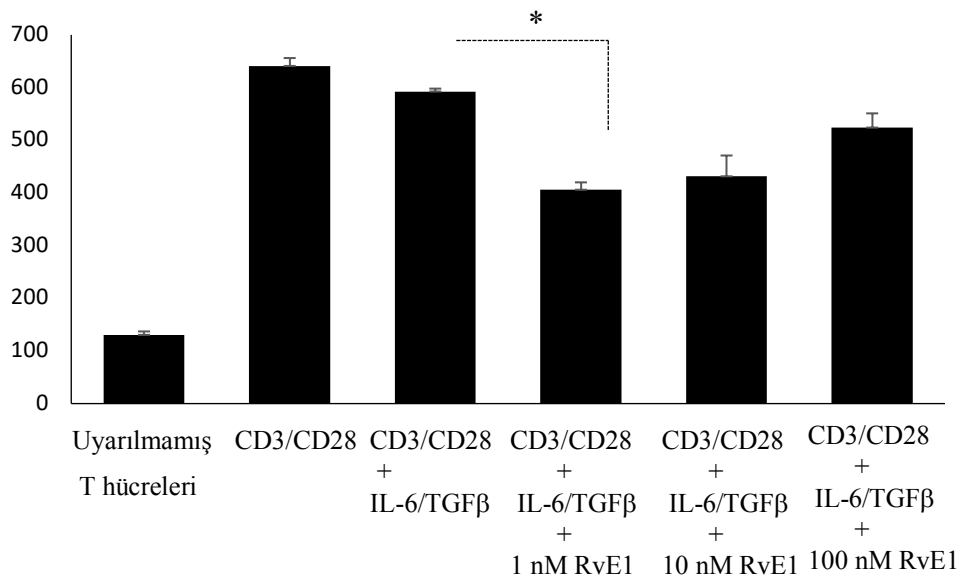


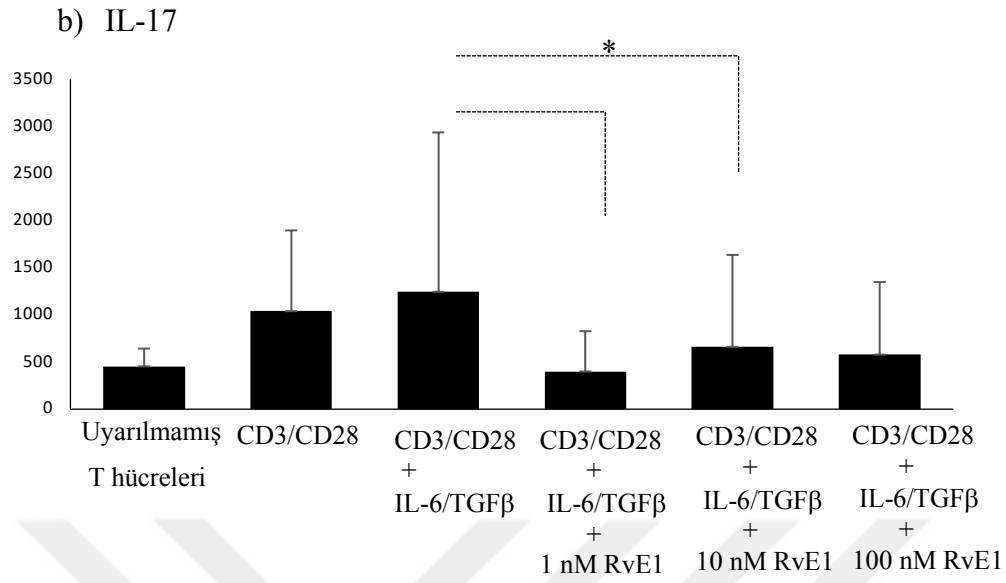
b)



Şekil 4-3:Farklaşmamış T hücrelerinin aktifleştirilmesi ve Th17'ye farklılaştırılması sırasında ilave edilen RvE1'in CD4⁺CD25⁺ T hücrelerine etkisi a) birbirinden bağımsız 6 deneyin ortalama sonucunu ($p < 0,05$) b) temsili olarak seçilen bir tane deneyin şematik görüntüsünü göstermektedir. * $p < 0,05$ Not; b şikkındaki şemada dikey sütunlar CD4⁺, yatay sütunlar CD25⁺ hücreleri göstermektedir

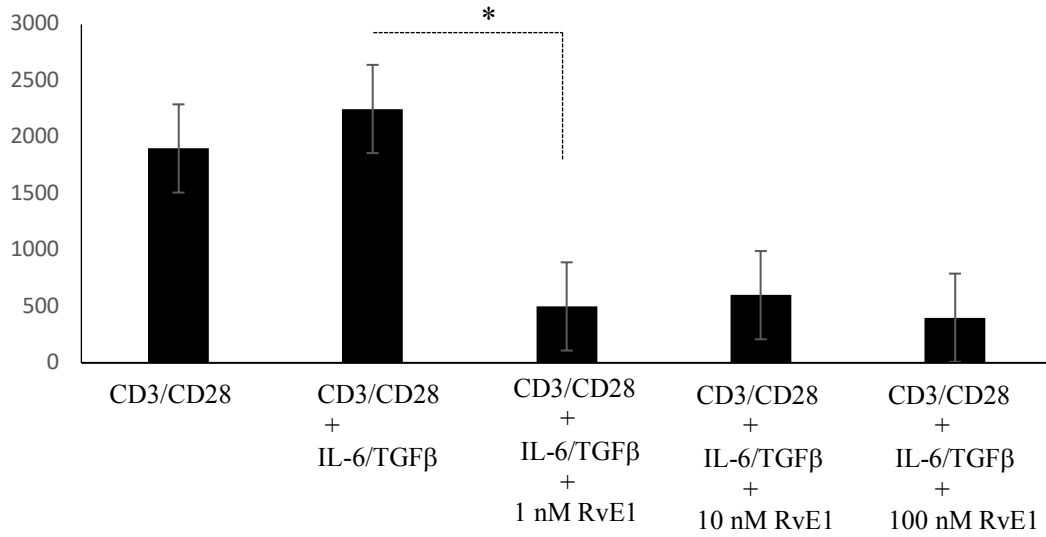
a) RORγt



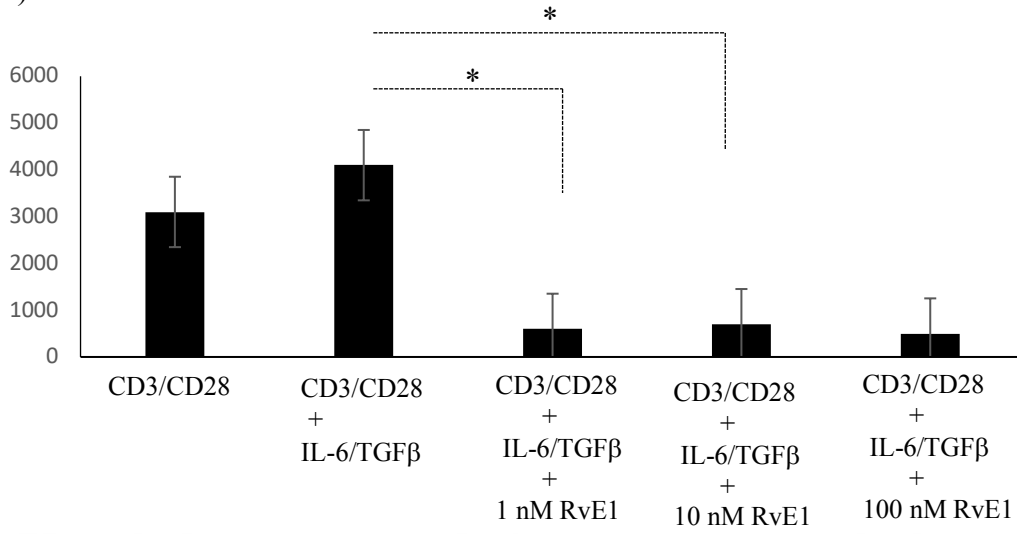


Şekil 4-4: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1'in a) ROR γ t ($p < 0,05$) b) IL-17 ($p < 0,05$) üzerine etkisi* $p < 0,05$

a) CD4⁺CD25⁺ROR γ t⁺

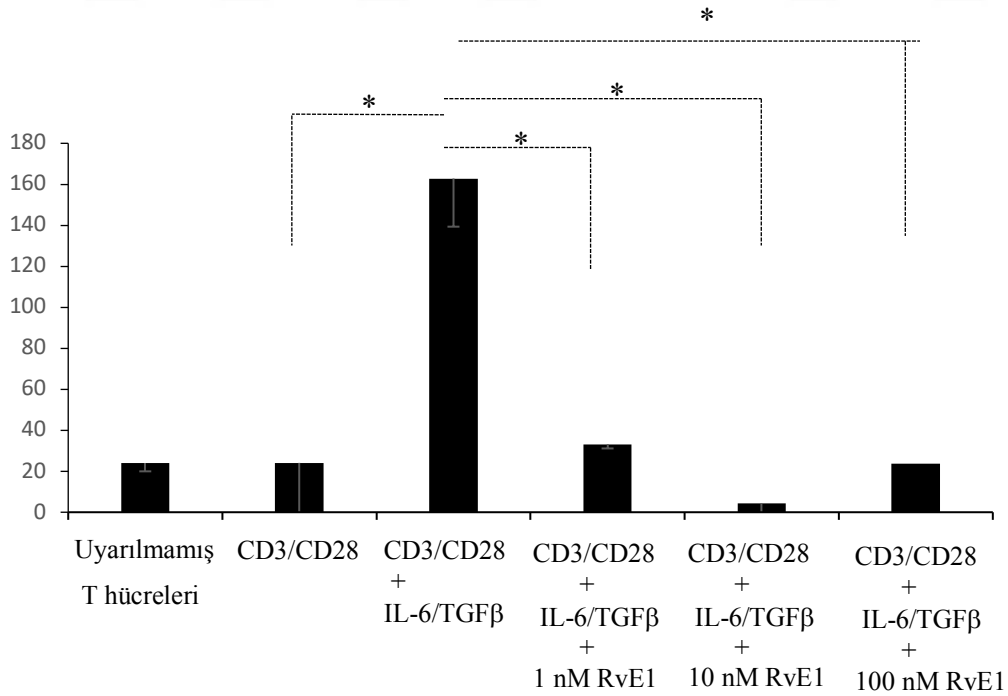


b) $CD4^+CD25^+IL-17^+$

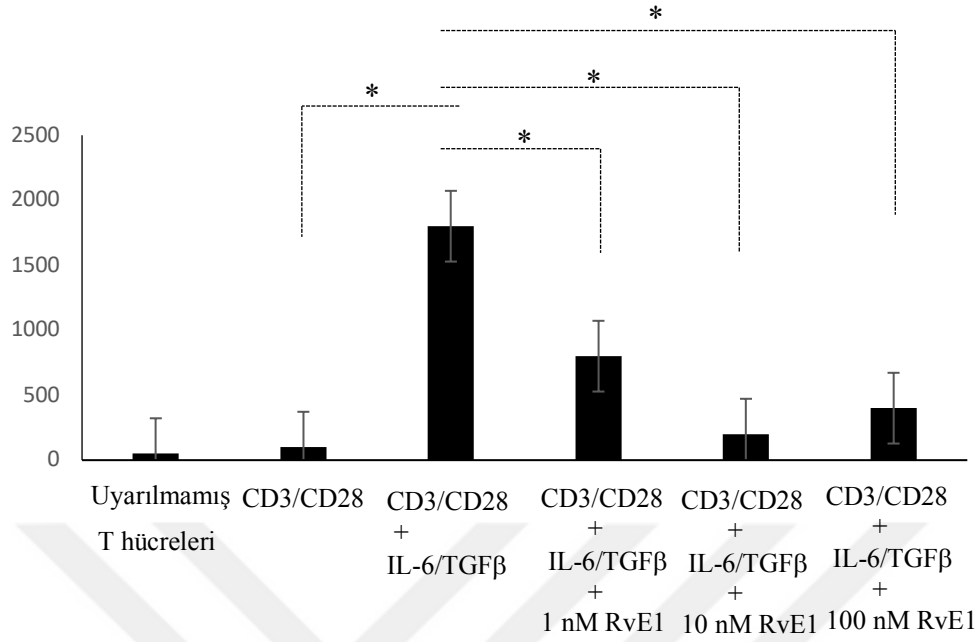


Şekil 4-5: $CD4^+CD25^+$ hücreler tarafından sentezlenen ROR γ t ve IL-17 miktarı a) ROR γ t miktarını ($p < 0,05$) b) IL-17 miktarını ($p < 0,05$) göstermektedir. * $p < 0,05$

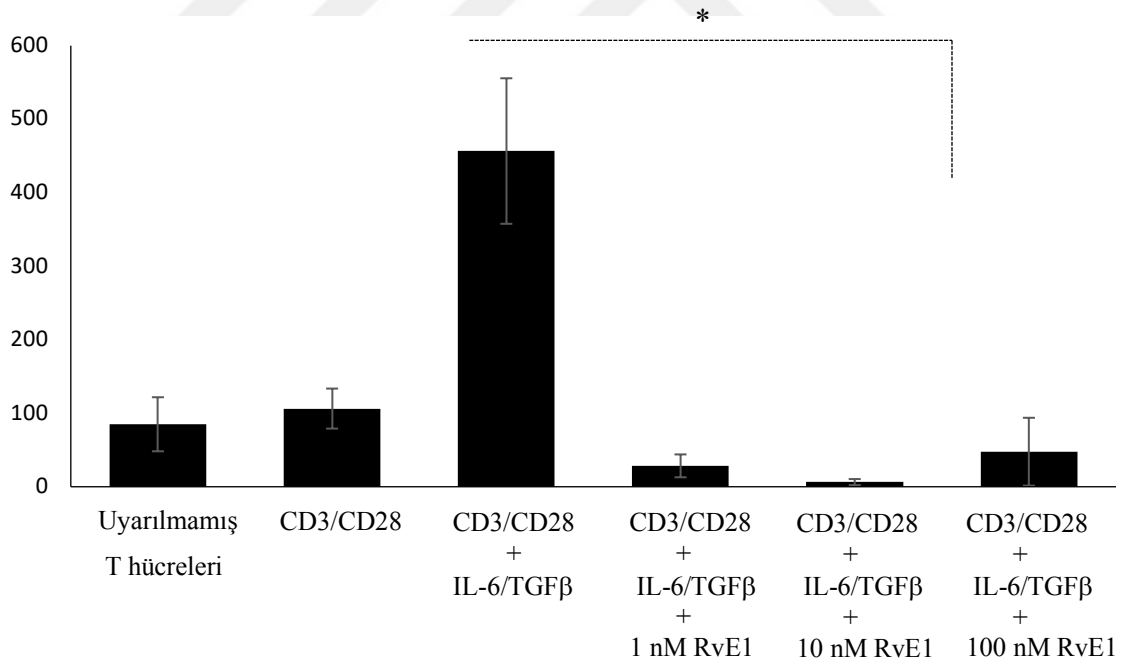
a) IL-17A



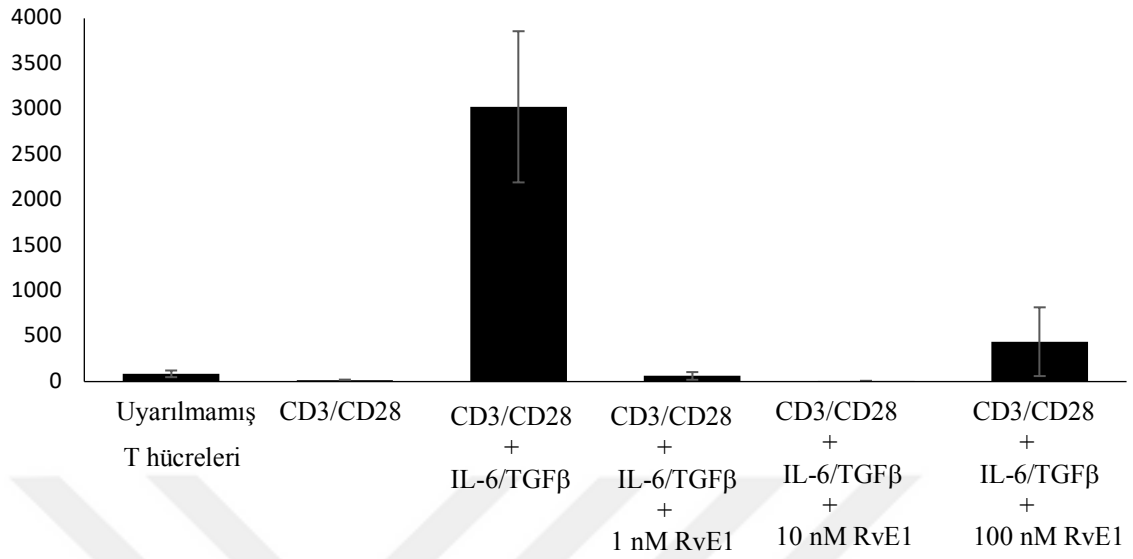
b) IL-17F



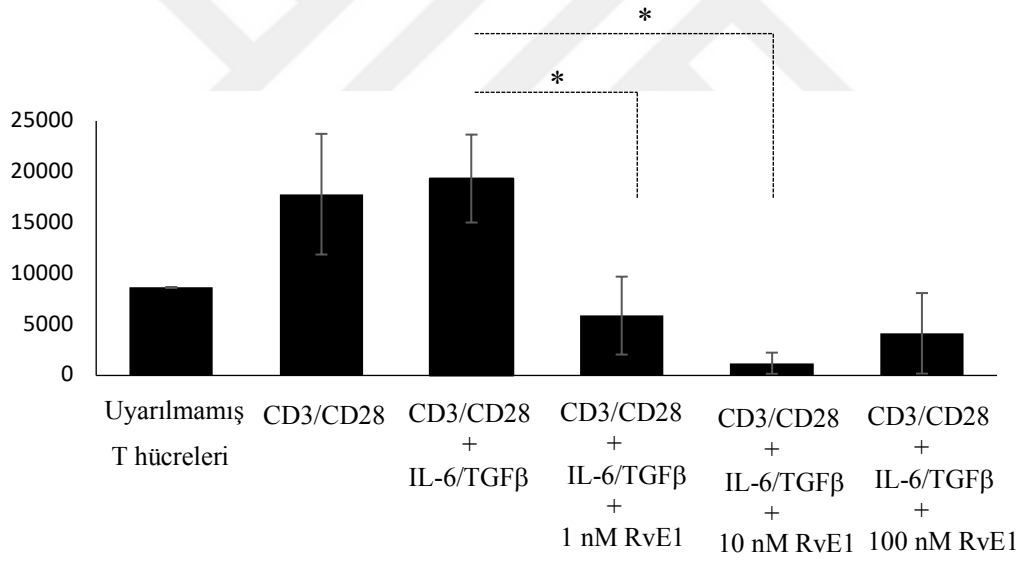
c) IL-10



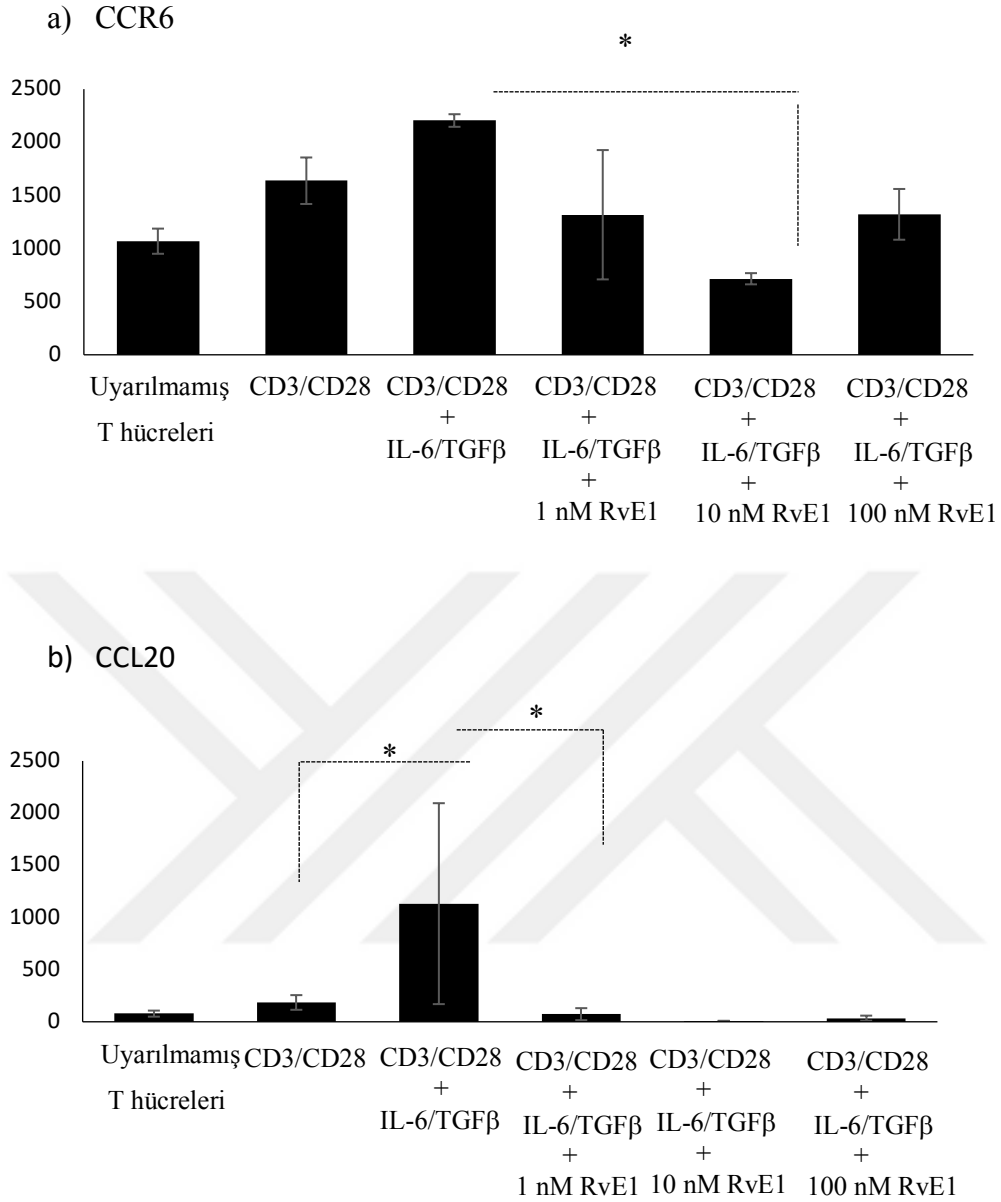
d) IL-21



e) IL-2



Şekil 4-6:Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17'ye farklılaşması sırasında ilave edilen RvEin sitokin salınımına etkisi. Birbirinden bağımsız 6 deneyin ortalaması sonucu a) IL-17A ($p < 0,05$) b) IL-1F($p < 0,05$) c) IL-10 ($p < 0,05$) d) IL-21 ($p > 0,05$) e) IL-2 ($p < 0,05$) seviyelerini göstermektedir. * $p < 0,05$



Şekil 4-7: Farklılaşmamış T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17 hücrelerine farklılaşması sırasında ilave edilen RvE1'in a) CCR6 ($p<0,05$) b) CCL20 ($p<0,05$) sentezine etkisi.. * $p<0,05$

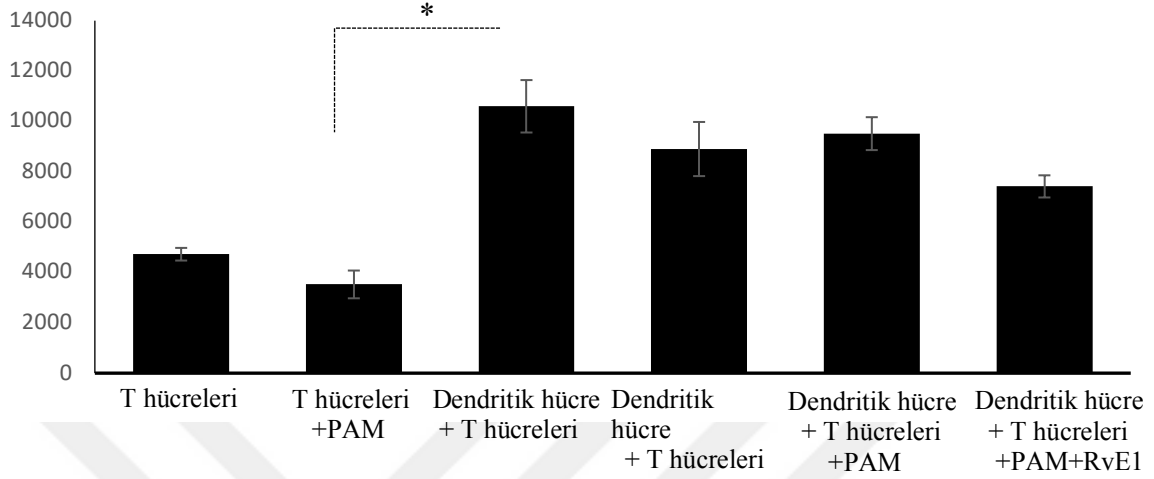
4.1.3. RvE1'in Dendritik Hücreler Tarafından Uyarılan Th17 Hücreleri Üzerine Etkisi

İlk çıkan sonuçlar IL-6 ile $TGF\beta$ 'nın birlikte kullanılması ile uyarılan farklılaşmamış $CD4^+$ T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüştüğünü ve RvE1'in bu hücrelerin sentezlenmesini, sitokin salgılamasını ve enflamatuvar bölgede toplanmasını azaltma yönünde etkilediği görülmüştür. Daha sonra bir adım geri giderek farklılaşmamış $CD4^+$ T hücrelerinin eklenen proliferatif ajanların kaynağı olan dendritik hücreler tarafından uyarılması ile nasıl bir sonuç elde edileceği ve resolvinin bu ortamdaki etkisi araştırılmıştır. Gereç ve yöntem bölümünde daha ayrıntılı anlatılan çalışma grupları oluşturulmuş ve dalaktan izole edilen dendritik hücreler ve T hücreleri PAM3CSK4 antijeni ile uyarılarak RvE1 olduğu / olmadığı ortamda beş gün boyunca kültüre edilmişlerdir. Beş günün sonunda flow cytometry kullanılarak hücre analizi, AYOXXA yöntemi kullanılarak ise supernatantlarda sitokin miktarları belirlenmiştir.

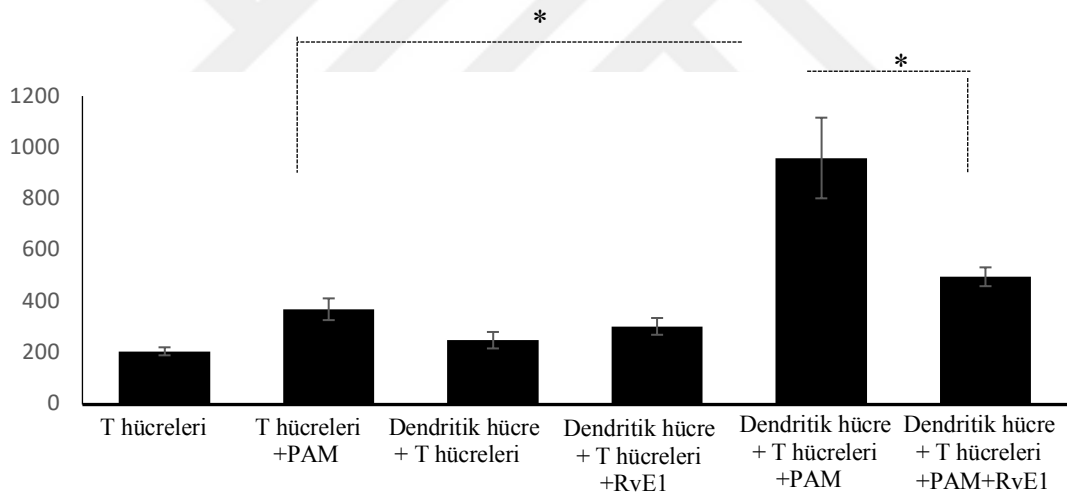
4.1.3.1. RvE1'in T Hücre Aktivasyonu Üzerine Etkisi

Sadece T hücreleri ve PAM3CSK4 ile uyarılan T hücreleri diğer gruplara göre daha düşük miktarlarda CD4 sentezlemiştir, buna karşılık dendritik hücrelerin ortama dahil edilip T hücreleri ile birlikte kültüre edilmesi sonucu CD4 reseptörleri anlamlı şekilde ($p<0,05$) daha fazla sentezlenmişlerdir. Kontrol amacı ile oluşturulan; T hücreleri, dendritik hücreler ile aynı anda kültürü yapılan T hücreleri, PAM3CSK4 tarafından uyarılıp sonrasında resolvin eklenen T hücreleri, birbirine yakın oranda CD25 sentezlemiştir, dendritik hücreler ile birlikte aynı zamanda PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerinden daha fazla CD25 reseptör sentezlenmiştir, RvE1 uygulaması ise anlamlı şekilde bu sentezi azaltmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4-8).

a) CD4



b) CD25



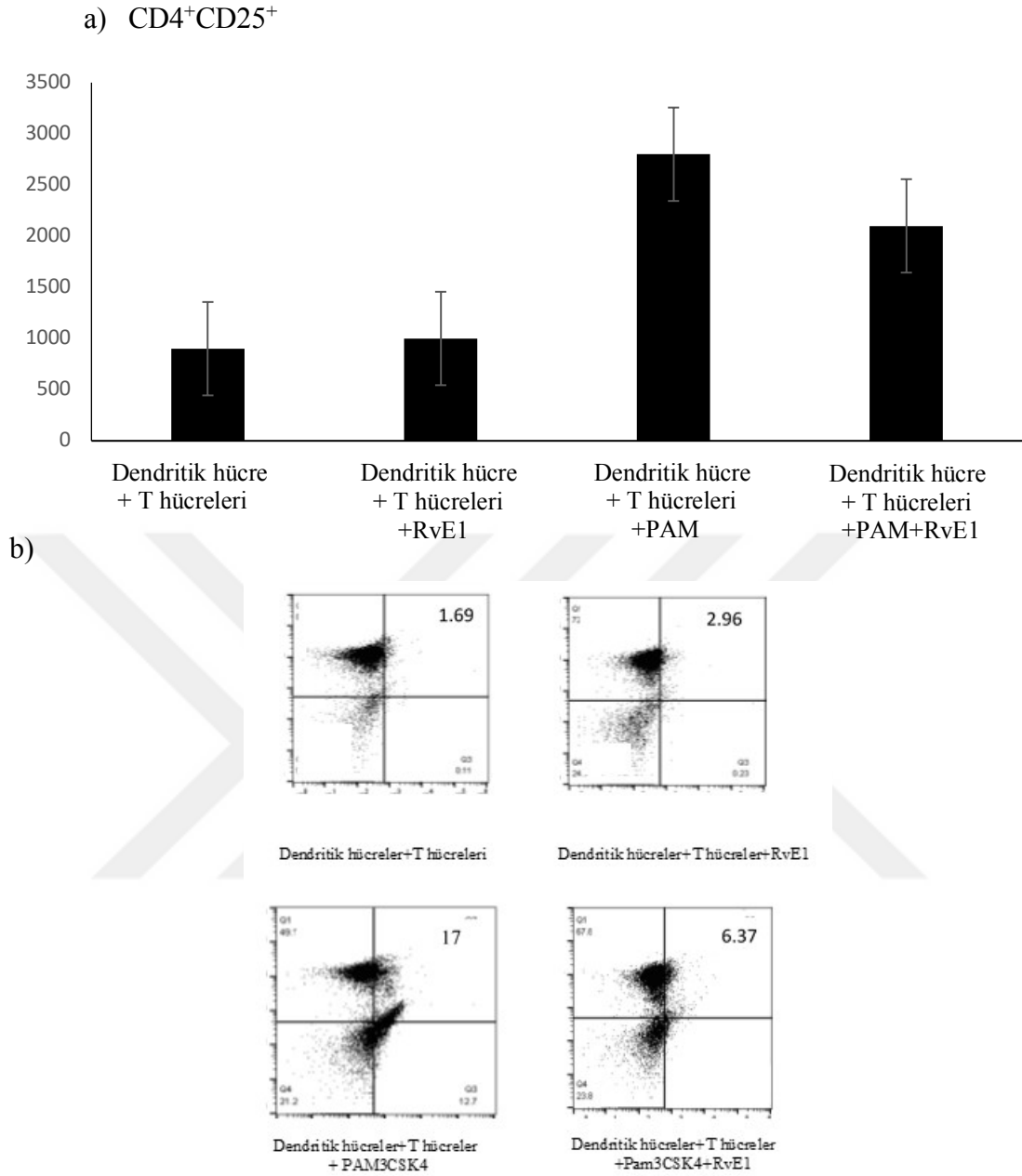
Şekil 4-8:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen CD4 ve CD25 reseptörleri. Birbirinden bağımsız 6 deney ortalamasına göre a) CD4 miktarını ($p<0,05$)b) CD25 miktarını ($p<0,05$) göstermektedir. * $p<0,05$

CD4⁺CD25⁺ hücreler hesaplandığı zaman ise temsili bir deneyden elde edilen sonuçlar PAM3CSK ile uyarmanın, 1,69% olan oranı 17%'ye çıkardığı ve ilave edilen RvE1'in tekrar hücrelerin aktivitesini bastırarak 6,37%'ye düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4-9).

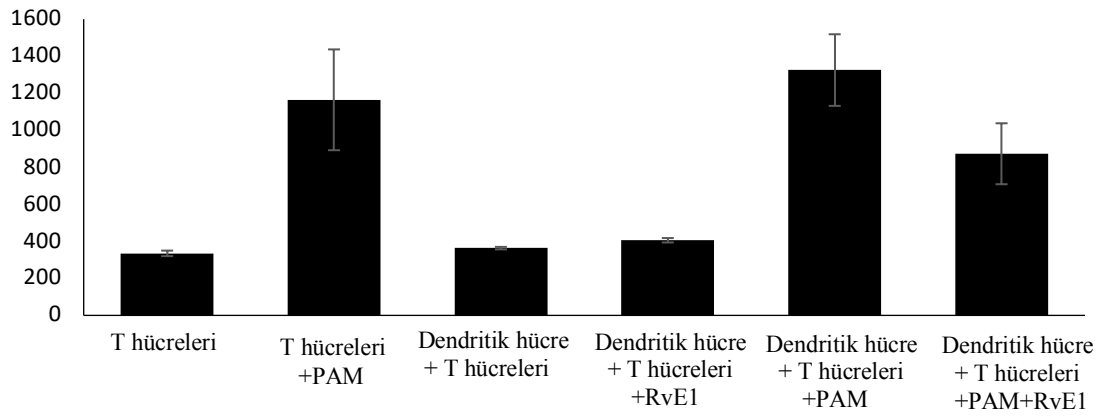
4.1.3.2. RvE1`nin Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi

Th17 farklılaşmasını incelemek için yine bir önceki deney grubunda olduğu gibi ROR γ t ve IL-17 sentezlerine bakılmıştır. PAM3CSK4 tarafından uyarılmayan hücrelerde her iki reseptör de neredeyse hiç sentezlenmemiştir; fakat PAM3CSK4 tarafından uyarılan farklılaşmamış T hücrelerinin ROR γ t ve IL-17 reseptör üretme kapasitelerinde artış görülmüş, dendritik hücrelerin de ortama ilave edilmesi ile bu artış daha da belirginleşmiş ve en yüksek noktasına ulaşmıştır. RvE1 ilavesi ise her iki reseptörün sentezini azaltırken ROR γ t miktarındaki fark anlamlı ($p<0,05$), IL-17 miktarındaki fark anlamsız ($p>0,05$) olarak bulunmuştur. CD4⁺CD25⁺ hücrelerinin sentezlediği ROR γ t ve IL-17 reseptörleri resolvin ile birlikte düşüş gösterse de aradaki fark anlamsız olarak bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4-10).

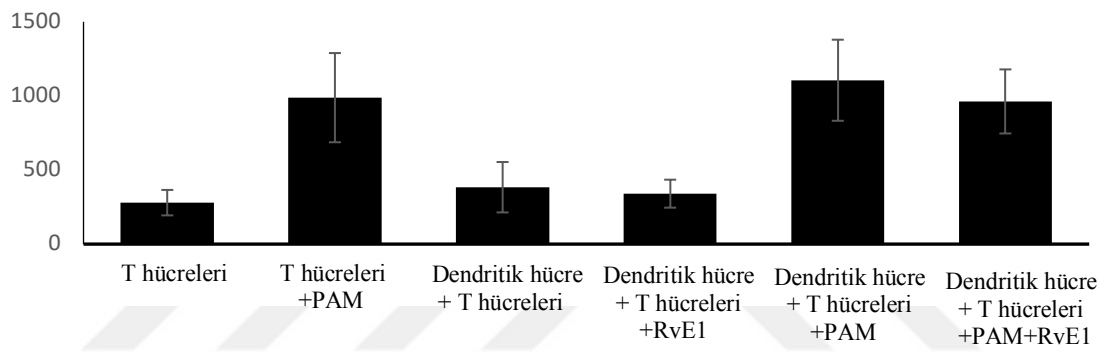
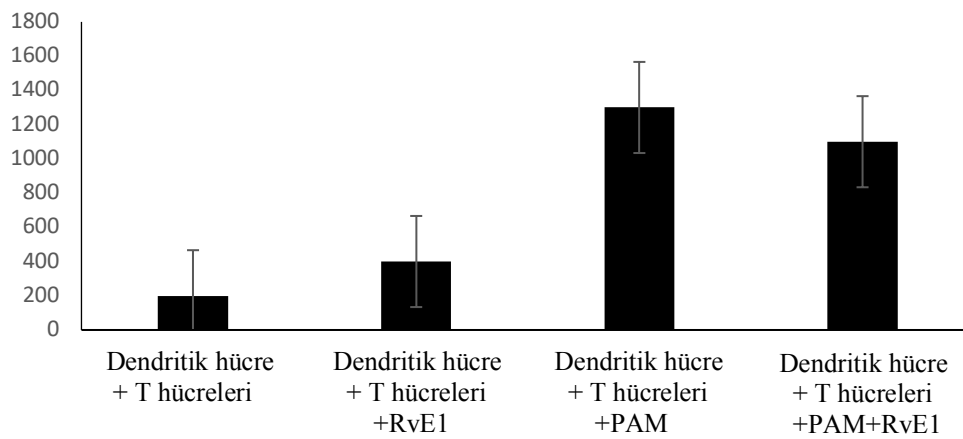
AYOXXA ile analizi yapılan IL-17A sitokini ise PAM3CSK4 ile uyarıldıktan sonra artış göstermiş RvE1 verilmesi ile anlamlı şekilde düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Hücrelerin enflamatuvar bölgeye göç etmesinden sorumlu CCR6 reseptörü ile CCL20 proteini hücrelerin uyarılmasından sonra artış göstermiştir fakat uygulanan RvE1 sonrası gözlemlenen düşüş anlamsızdır ($p>0,05$). CD25'in sorumlu olduğu IL-2 sitokinin salgılanmasını bir miktar azaltsa aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Farklılaşmamış T hücrelerinin IL-6/TGF β ile uyarılması sonucu RvE1 hem CD25 sentezlenmesini hem de buna paralel olarak IL-2 salgılanmasını azaltmıştır fakat buradaki anlamlı etki sadece CD25 ile sınırlı kalmıştır (Şekil 4-11).



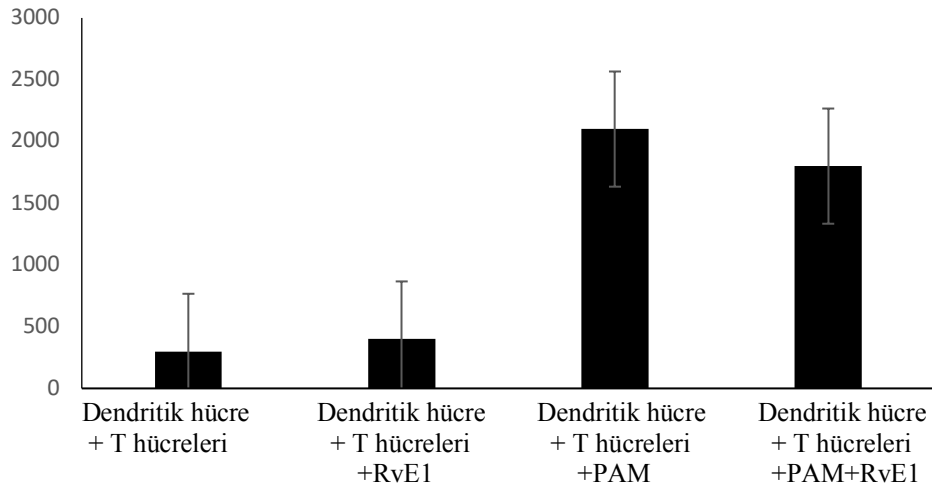
Şekil 4-9:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen $CD4^+CD25^+$ T hücreleri a) birbirinden bağımsız 6 deneyin ortalama sonucunu b) temsili olarak seçilen bir tane deneyin şematik görüntüsünü göstermektedir * $p<0,05$ Not: b şikkında dikey sütunlar $CD4^+$ hücreleri, yatay sütunlar $CD25^+$ hücreleri göstermektedir

a) ROR γ t

b) IL-17

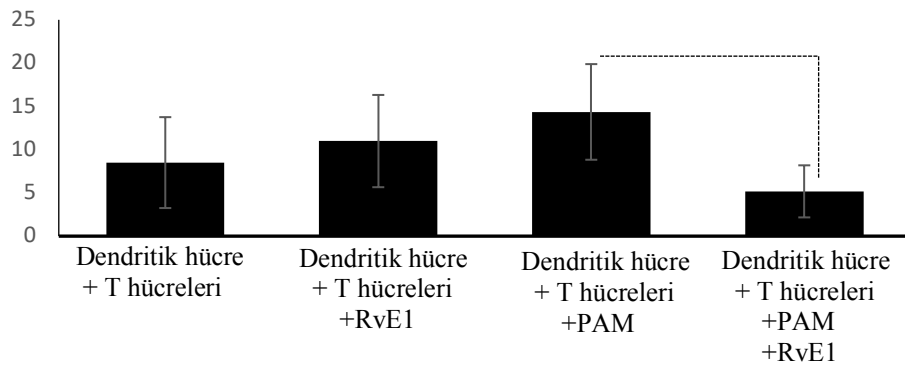
c) CD4⁺CD25⁺IL-17⁺

d) $CD4^+CD25^+ROR_{\gamma t}^+$

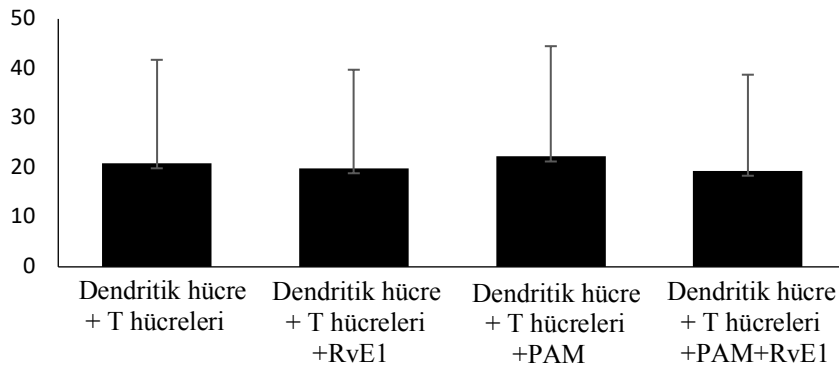


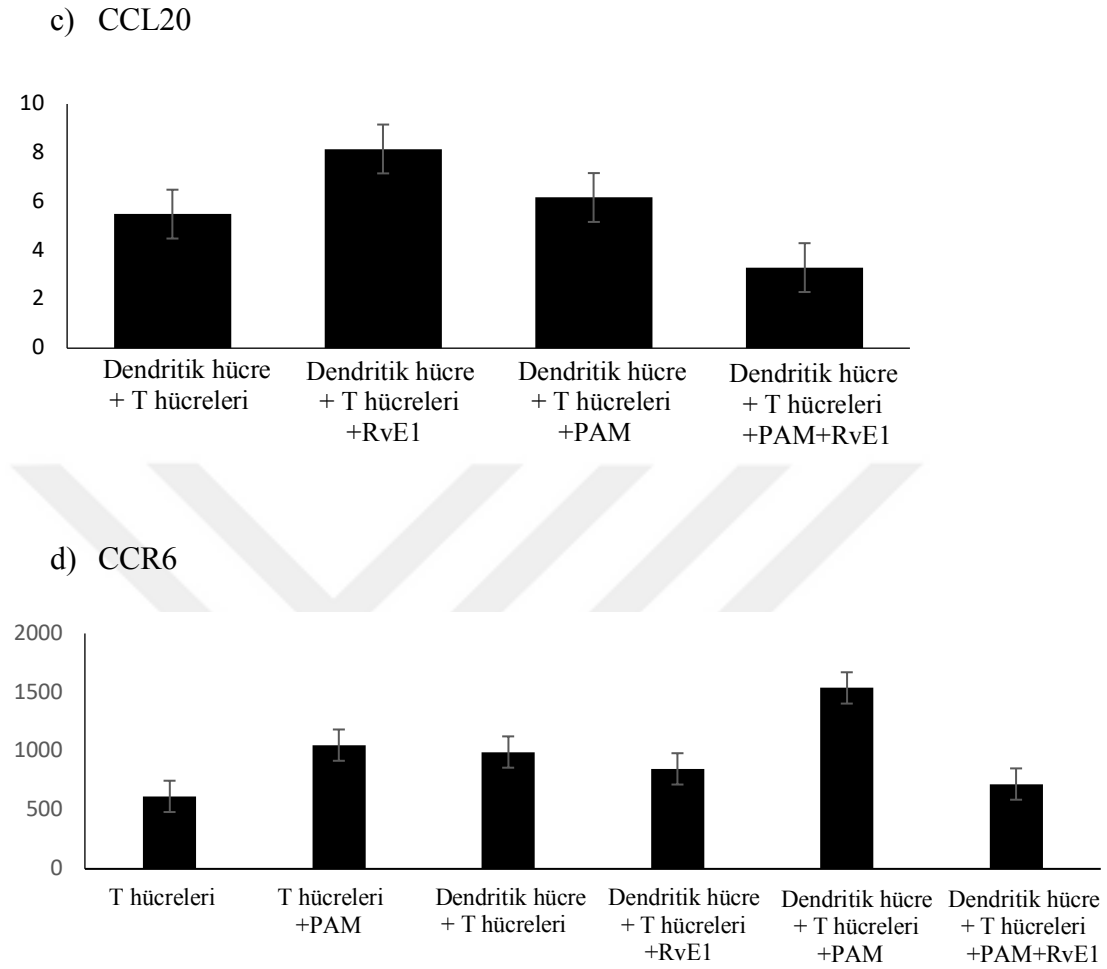
Şekil 4-10:Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu sentezlenen a) $ROR_{\gamma t}$ ($p < 0,05$) b) IL-17 ($p > 0,05$) reseptörleri. $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinin sentezlediği c) IL-17 ($p > 0,05$)d) $ROR_{\gamma t}$ ($p > 0,05$) reseptörleri.* $p < 0,05$

a) IL-17A



b) IL-2





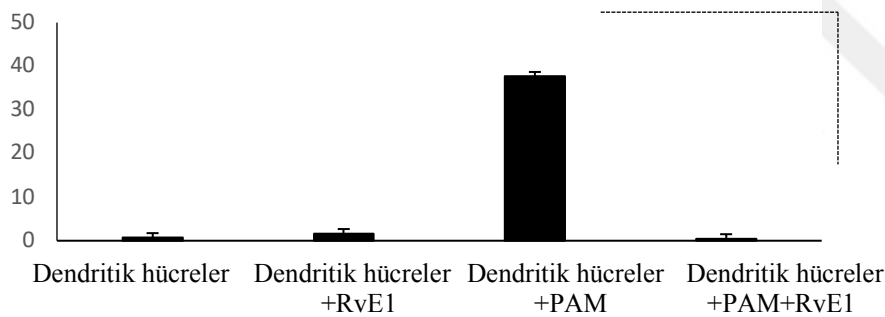
Şekil 4-11: Dendritik hücreler varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılan T hücrelerine RvE1 uygulanması sonucu salgılanan a) IL-17A ($p < 0,05$) b) IL-2 ($p > 0,05$) c) CCL20 sitokinleri ($p > 0,05$) ve sentezlenen d) CCR6 reseptörü ($p > 0,05$) * $p < 0,05$

4.1.4. RvE1'in Dendritik Hücre Olgunlaşması ve Aktivasyonuna Etkisi

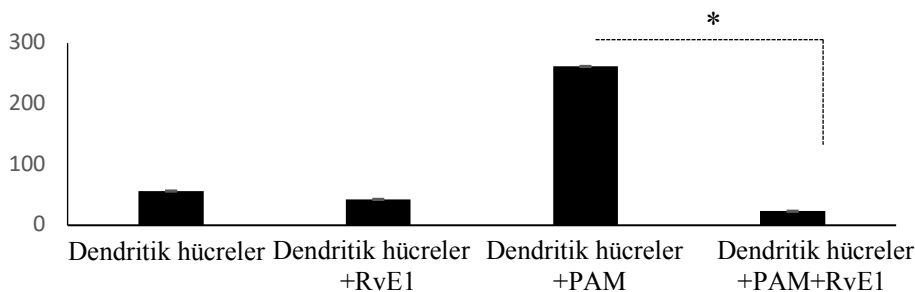
Dendritik hücreler tarafından uyarılan farklılaşmamış T hücreleri PAM3CSK4'ün antijen olarak kullanıldığı durumlarda Th17'ye farklılaşmış ve RvE1 Th17 sentezlenmesini ve IL-17 salgılanmasını azaltmıştır bunun üzerine resolvinin olgunlaşma ve aktivasyon aşamalarında dendritik hücreler üzerine nasıl etki

göstereceğini hesaplamak için bir adım geriye giderek, T hücrelerinin bulunmadığı RvE1'nin ise hem olduğu hem de olmadığı durumlarda dendritik hücreleri PAM3CSK4 tarafından uyarılarak olgunlaşma esnasında sentezledikleri yüzey moleküllerine ve salgıladıkları protein seviyelerine bakılmıştır. Yukarıda ayrıntılı olarak dendritik hücre tarafından uyarılan T hücre aktivasyonunun üç aşamada gerçekleştiği anlatılmıştır elde ettiğimiz sonuçlar RvE1'nin, aktivasyonun son aşaması olan pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar ajanların salgılanma miktarlarını etkilediği göstermektedir. Salgılanan IL-6 ve IL-2 miktarlarında gözlemlenen düşüş miktarı fazla iken ($p<0,05$), anti-enflamatuvar özelliği ile bilinen $TGF\beta$ anlamlı şekilde artmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4-12). Buna karşın RvE1'in aktifleşmenin başlamasını sağlayan, CD80 molekülü üzerine hiçbir etki görülmezken, diğer reseptörlerin (CD40, CD86 ve MHC II) üzerinde az miktarda düşüş sağlasa da anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4-13).

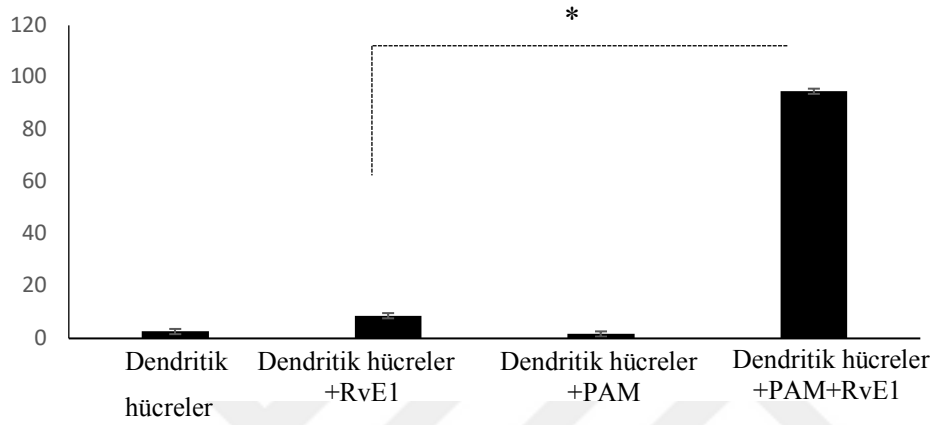
a) IL-6



b) IL-2

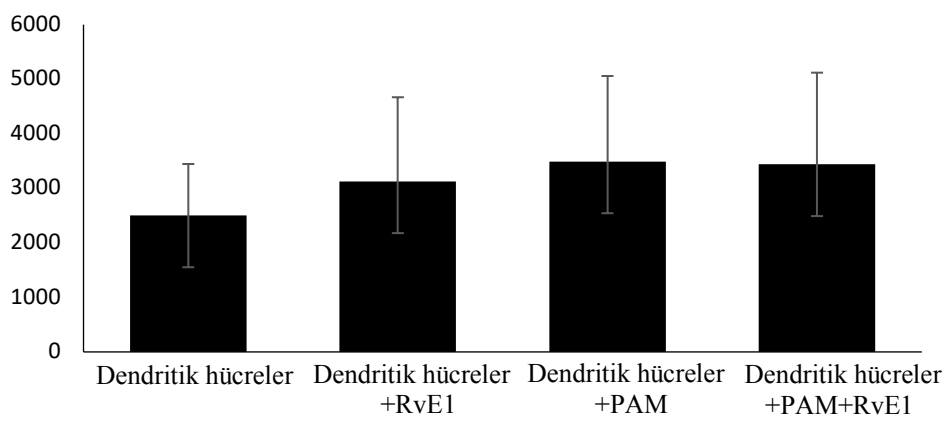


c) $TGF\beta$

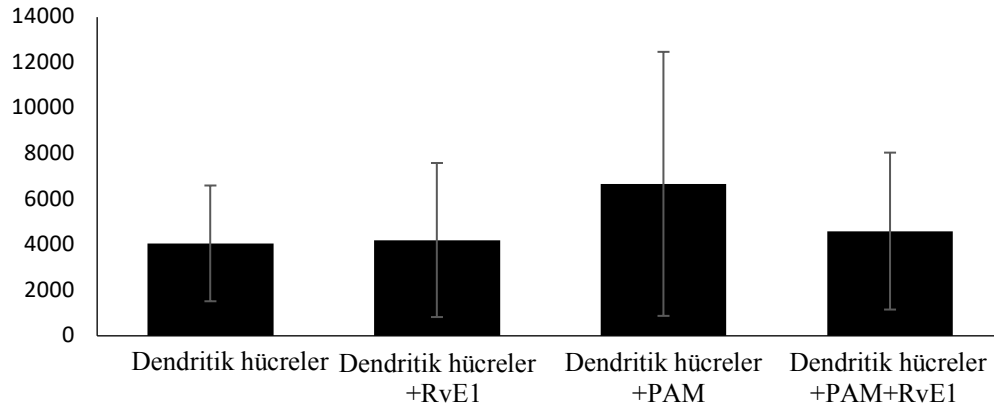


Şekil 4-12:PAM3CSK4 ile uyarılan dendritik hücrelerin salgıladığı a) IL-6 ($p<0,05$), b) IL-2 ($p<0,05$) ve c) $TGF\beta$ ($p<0,05$) . * $p<0,05$

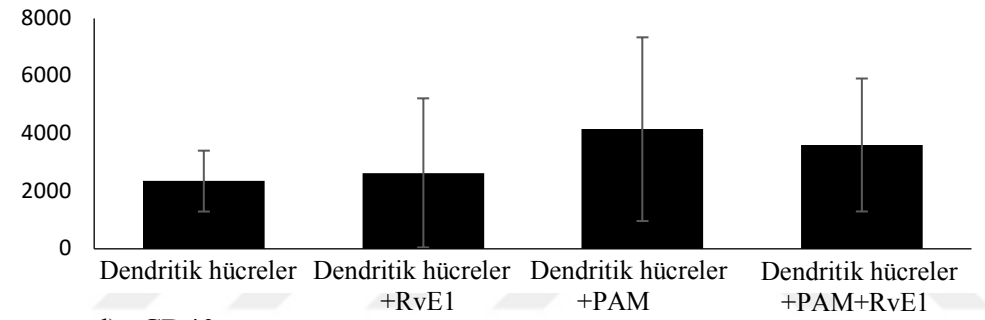
a) CD86



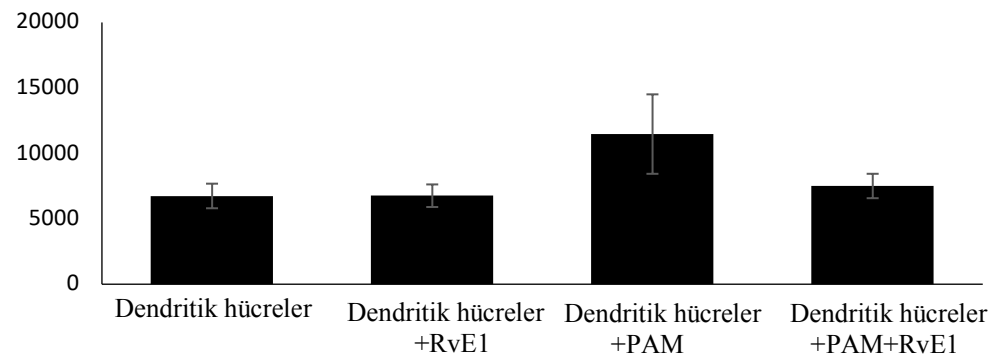
b) CD80



c) MHC II



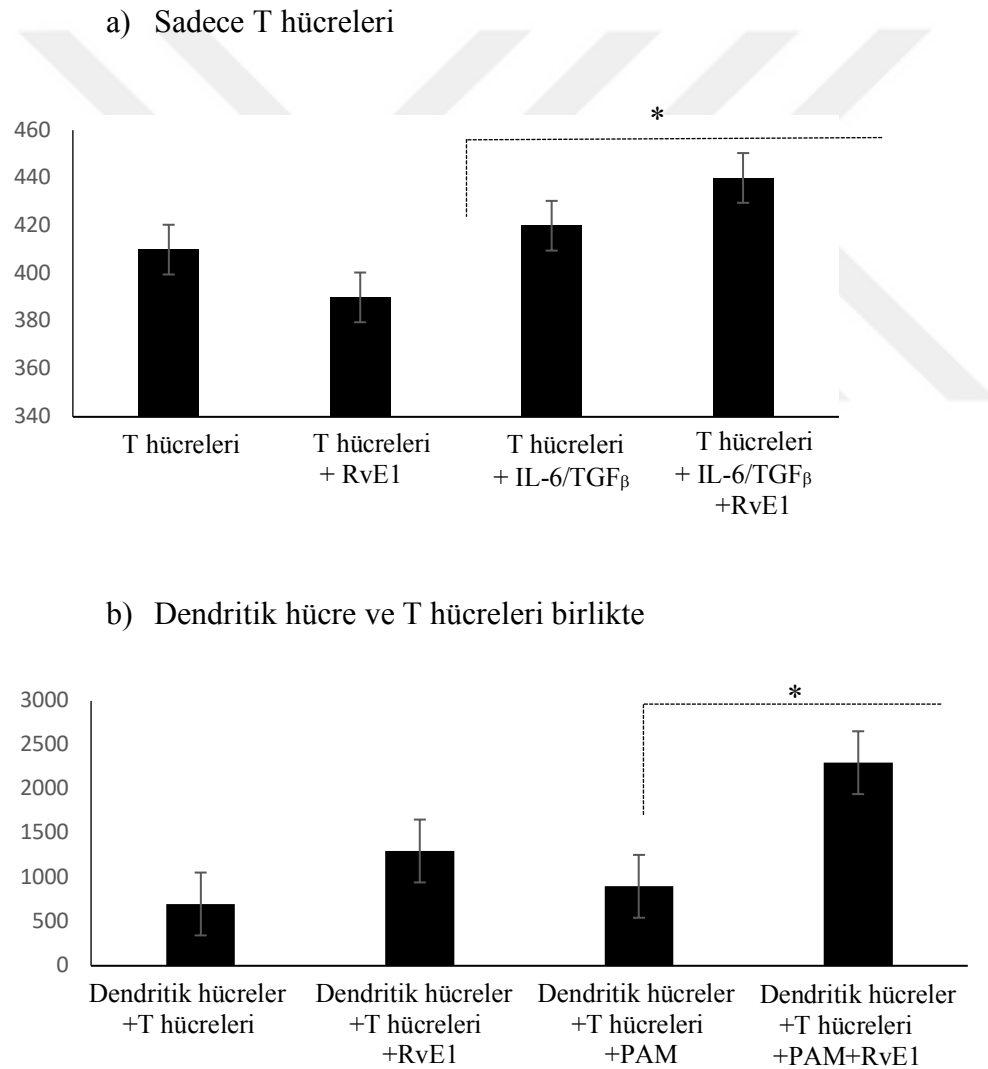
d) CD40



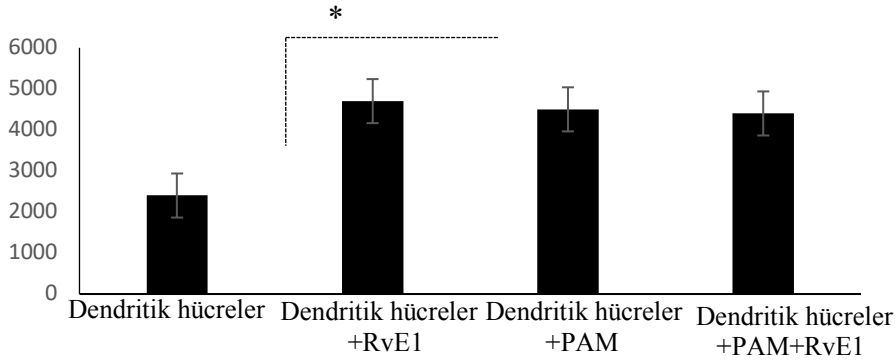
Şekil 4-13: PAM3CSK4 ile uyarılan dendritik hücrelerin sentezlediği a) CD86 ($p > 0,05$), b) CD80 ($p > 0,05$), c) MHC II ($p > 0,05$) ve d) CD40 ($p > 0,05$) reseptörleri. * $p < 0,05$

4.1.5. Dendritik Hücre ve T Hücreleri Üzerinde ChemR23 Sentezi

Elde edilen sonuçlar RvE1 reseptörü olan chemR23'ün hem dendritik hücrelerde hem de T hücrelerinde sentezlendiğini göstermiştir. IL-6/TGF β tarafından veya dendritik hücreler tarafından PAM3CSK4 varlığında uyarılan T hücrelerinin sentezlediği chemR23, RvE1 ilave edildikten sonra daha fazla sentezlenmiştir. Dendritik hücelere ise RvE1 ilave edilmesi veya PAM3CSK4 ile uyarılması chemR23 sentezini hemen hemen eşit oranda anlamlı olarak artırmıştır (Şekil 4-14)



c) Sadece dendritik hücreler

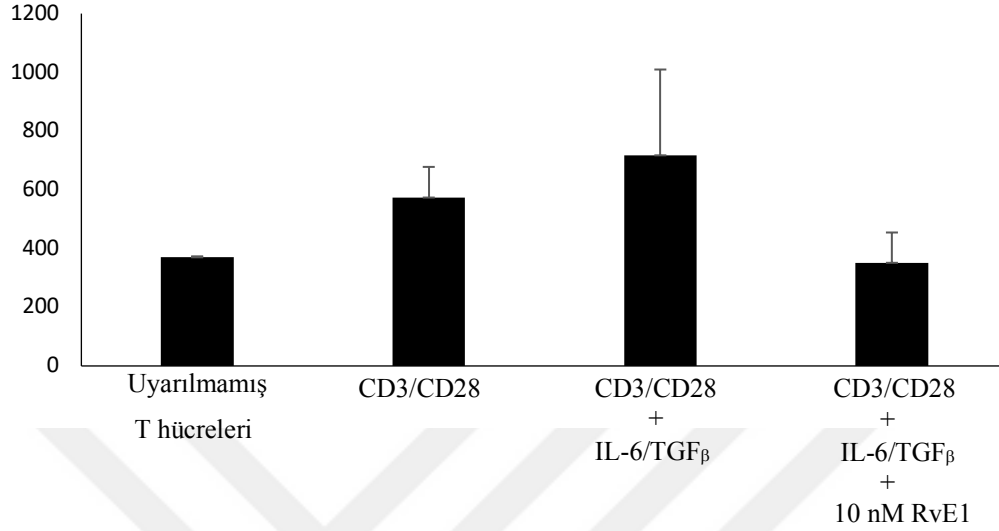


Şekil 4-14:Hücreler tarafından sentezlenen chemR23 seviyesi a) TGF β ve IL6 ile uyarılan T hücreleri tarafından sentezlenen ($p<0,05$) b) PAM3CSK4 varlığında dendritik hücreler tarafından uyarılıp farklılaşan T hücreleri ve dendritik hücreler tarafından sentezlenen($p<0,05$) c) PAM3CSK4 ile uyarılıp aktiveştirilen dendritik hücreler tarafından sentezlenen ($p<0,05$)* $p<0,05$

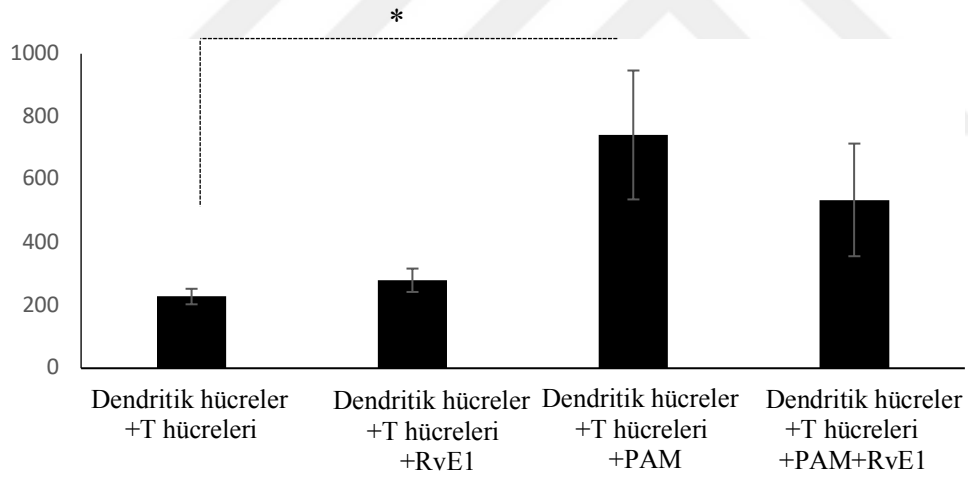
4.1.6. RvE1'in FoxP3 Sentezine Etkisi

Çalışmamızda CD25 sentezini baskılamada bu kadar etkili olan RvE1'in Treg hücrelerinin ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) transkripsiyon faktörü olan FoxP3 sentezi üzerindeki etkisi de incelenmiştir; elde ettiğimiz sonuçlara göre hem dendritik hücreler hem de TGF β ve IL-6 tarafından uyarılarak farklılaşan Th17 hücrelerinin daha fazla FoxP3 sentezledikleri görülmüştür ve RvE1'in IL-6/TGF β tarafından uyarılan T hücrelerini anlamlı olmayacak şekilde ($p>0,05$), dendritik hücreler tarafından uyarılan T hücrelerinde de anlamlı olacak şekilde ($p<0,05$) FoxP3 sentezini azalttığı bulunmuştur.

a) IL-6/TGF β ile uyarılan T hücreleri



b) Dendritik hücreler ve PAM3CSK4 ile uyarılan T hücreleri



Şekil 4-15:Hücreler tarafından sentezlenen FoxP3 reseptörü a)TGF β ve IL6 ile uyarılan T hücreleri tarafından (p>0,05) b) dendritik hücrelerin varlığında PAM3CSK4 tarafından uyarılıp farklılaşan T hücreleri tarafından sentezlenen (p<0,05) . * p<0,05

4.2. *In Vivo* Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmanın bu bölümünde dört farklı tipte fareler kullanılmıştır; genetiğinde herhangi bir değişiklik yapılmış wild type fareler, tip 2 diyabeti taklit eden diyabetik fareler, RvE1 reseptörü fazla sentezlenen transjenik fareler ve hem diyabetik hem de RvE1 reseptörü fazla sentezlenen double transjenik fareler son grubu oluşturmaktadır. Her bir fare grubunda üç tane alt grup kullanılmıştır; herhangi bir işlem yapılmamış fareler kontrol grubu, yapay periodontitisi taklit eden fareler ligatür grubu ve yapay periodontitis oluşturulmuş ve RvE1 ile tedavi edilen fareler de resolvin grubu olarak isimlendirilmiştir.

4.2.1. Farelerden Elde Edilen Serum Örneklerinin Analizi

4.2.1.1. RvE1'in Th17 Farklılaşmasını Uyarıcı Mediyatörler Üzerine Etkisi

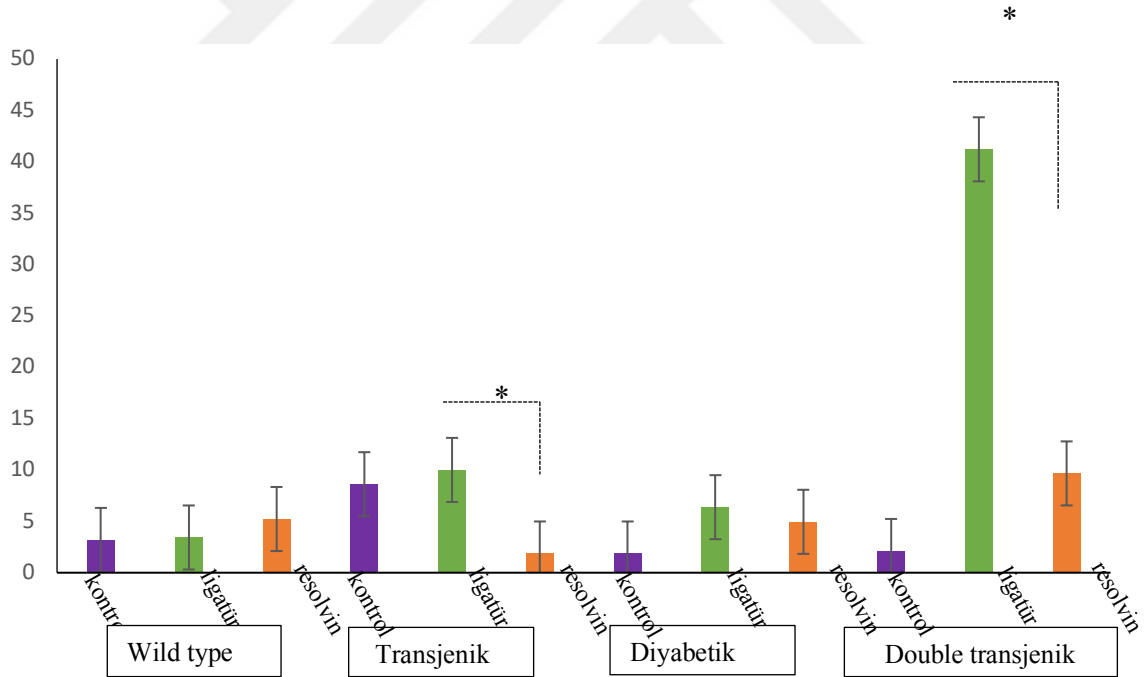
Salgılanan IL-6 miktarına bakıldığında zaman transjenik farelerin kontrol grubunda daha fazla olduğu görülmüştür. Kontrol grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlenirken ($p < 0,05$), aynı şey diğer gruplar için söylenememektedir. Aradaki fark anlamlı olmasa da ligatürle yapay periodontitis oluşturulduğu zaman double transjenikler ile diyabetiklerde daha belirgin olmak üzere dört grubun da IL-6 salgısındaki artış dikkat çekmektedir. Grup içi karşılaştırma yapıldığında ise; wild type ile diyabetik farelerde her üç grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Transjenik ve double transjenik farelerin ise arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). RvE1 uygulaması ise wild type ve diyabetik fareler üzerinde etki göstermezken transjenik ve double transjenik farelerde IL-6 sentezini anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 4-16a).

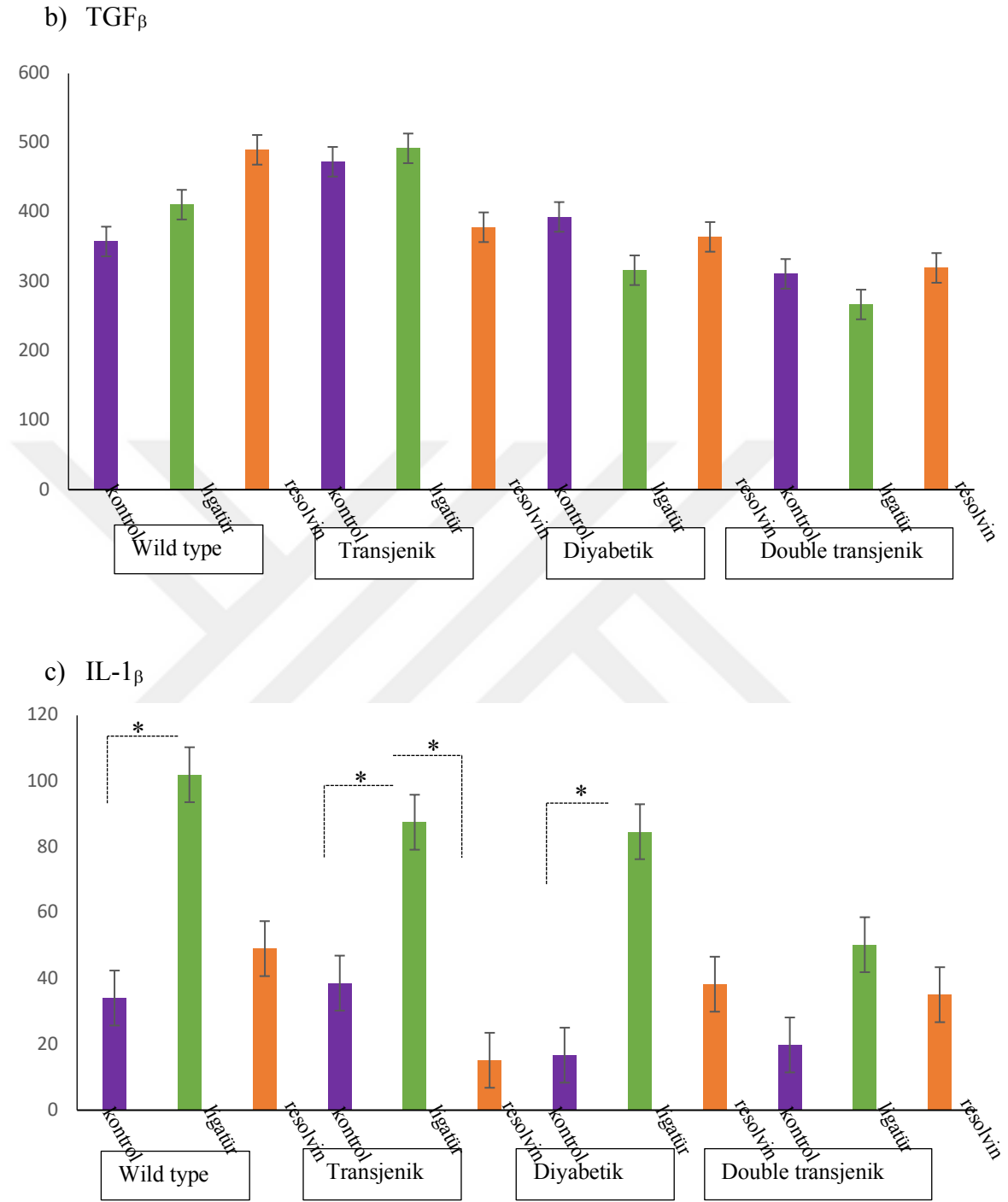
Th17 farklılaşması için gerekli başka bir mediyatör olan $TGF\beta$ ise yine IL-6 gibi en fazla kontroller arasından transjenik farelerde diğerlerine göre daha fazla sentezlenmiştir fakat diğer kontrol grupları ile aralarında anlamlı bir fark yoktur.

($p>0,05$). Uygulanan ligatür transjenik ve wild type farelerde $TGF\beta$ sentezinin artışına resolvin de wild type olanlarda artışa transjeniklerde ise düşüşe neden olmuştur fakat aralarında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Diyabetik ve double transjenik grubundakiler ise ligatürle azalan $TGF\beta$ sentezi yapılan resolvin tedavisi anlamlı olmayacak şekilde artırmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-16b).

Pro-enflamatuvar açıdan kuvvetli başka bir sitokin olan IL-1 β ise aralarında anlamlı fark olmayacak şekilde tüm kontrol gruplarında eşit miktarlarda sentezlenmiştir ($p>0,05$). Ligatür bağlanması sonucu doğal yollarla gelişen deneysel periodontitis tüm gruplarda sentezlenen sitokin seviyelerini yükseltmiştir. Uygulanan RvE1, bu sitokin miktarını grupların tamamında azaltmıştır ($p<0,05$). Etkisini en fazla transjenik farelerde en az ise double transjenik farelerde göstermiştir (Şekil 4-16c)

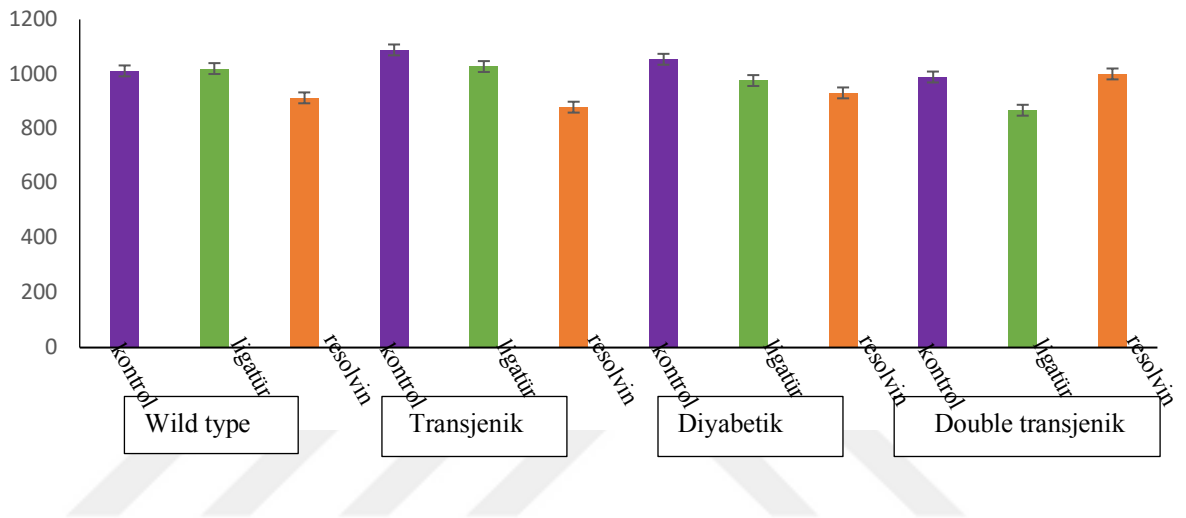
a) IL-6





Şekil 4-16: RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde a) IL-6, b) $TGF\beta$ ve c) $IL-1\beta$ salınımına etkisi * $p < 0,05$

Dört farklı tipteki farelerin kontrol gruplarında salgılanan IL-23'ün eşit seviyede olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Ligatür de salgılanan bu sitokin seviyesinde anlamlı bir fark yaratmamıştır ($p>0,05$). RvE1 ise double transjenik haricindeki gruplarda salgısını azaltmış, double transjeniklerde artırmıştır fakat yine hiçbir fark anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde IL-23 salınımına etkisi

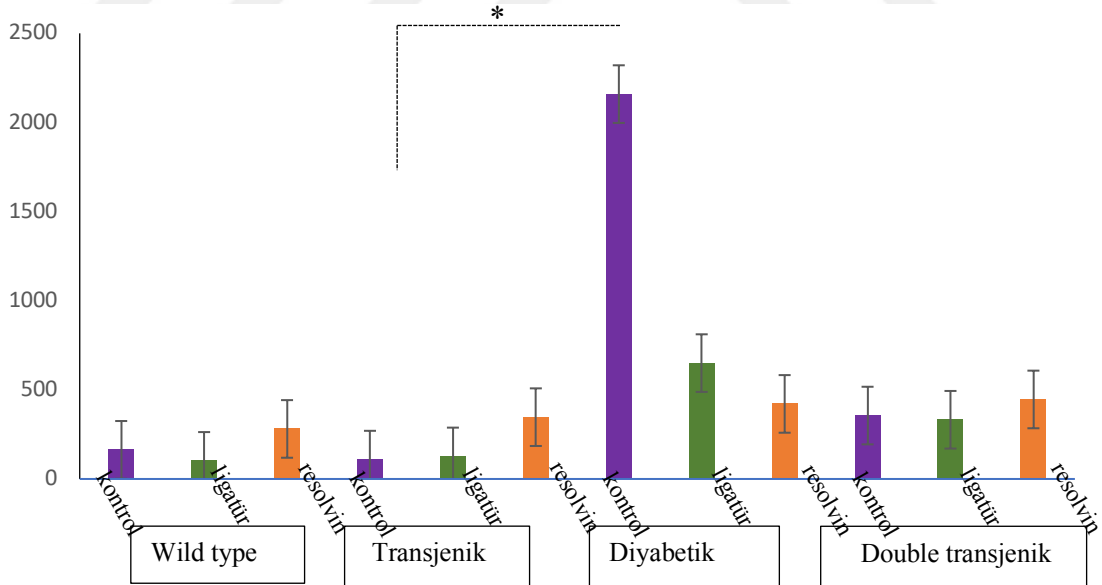
4.2.1.2. RvE1'in Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi

Th17 ailesinin salgılanan en önemli sitokini olan IL-17A, diyabetik-kontrol gruplarında diğerlerine göre daha fazla salgılanmıştır ($p<0,05$). Ligatür uygulanması tüm gruplardaki IL-17A sentezini artırırken aradaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$). RvE1 tedavisi ise wild type farelerde IL-17A sentezini artırırken, diyabetiklerde azalmasına neden olmuştur fakat her iki fark da istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Bununla birlikte RvE1, transjenik ile double transjenik farelerde daha fazla etki gösterse de aradaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4-18a).

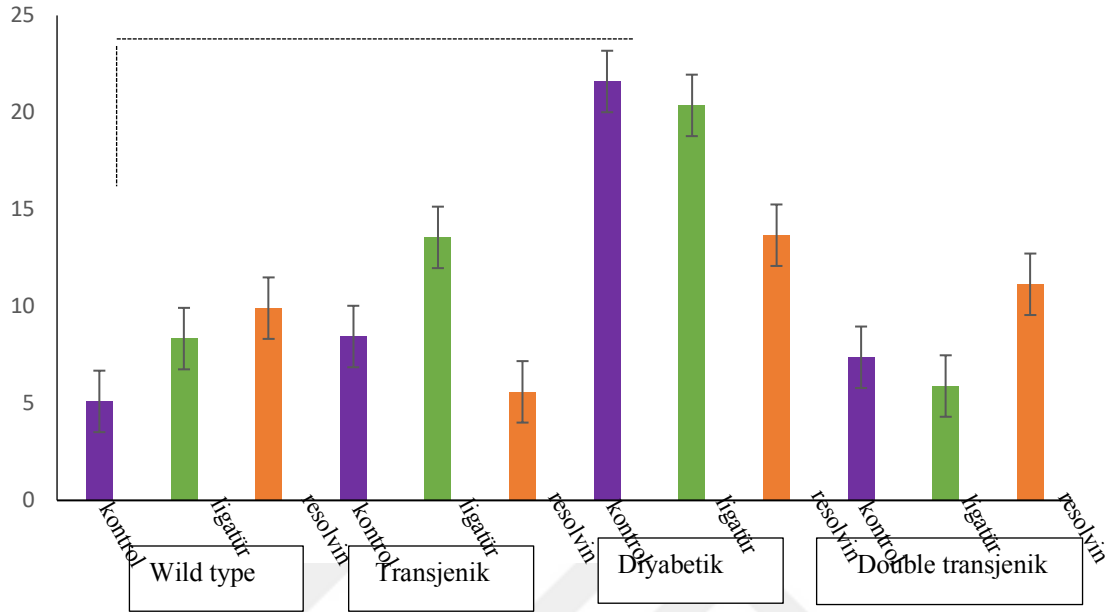
IL-17F kontrol gruplarına bakıldığı zaman en yüksek diyabetik farelerde salgılandığı farkediliyor. Aralarındaki fark anlamlı olmasa da ligatür uygulaması IL-17F salgısını transjenik fareler ile birlikte wild type olanlarda artırırken diğerlerinde azaltmıştır ($p>0,05$). Wild type ile reseptörün fazla sentezlendiği diyabetik farelerde (double transjenik) etkisi bulunmayan resolvinin diyabetik ile transjeniklerde bahsedilen sitokinin ortamda daha az bulunmasını sağladığı bulunmuştur, etkisinin en iyi transjenik fareler üzerinde gösterdiği saptanmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-18b).

CCL20, IL-17A ve IL-17F ile paralellik gösterip en fazla diyabetik farelerin kontrol gruplarında salgılanmaktadır ($p<0,05$). Ligatür, salgılanan CCL20 miktarının grupların hepsinde azaltırken ($p>0,05$) diyabetik farelerde gözlemlenen fark daha belirgindir. RvE1 ise double transjenik, wild type ve transjenik olanlarda daha fazla, diyabetiklerde daha az CCL20 salgılanmasına neden olmuştur fakat aradaki farklar anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 4-18c).

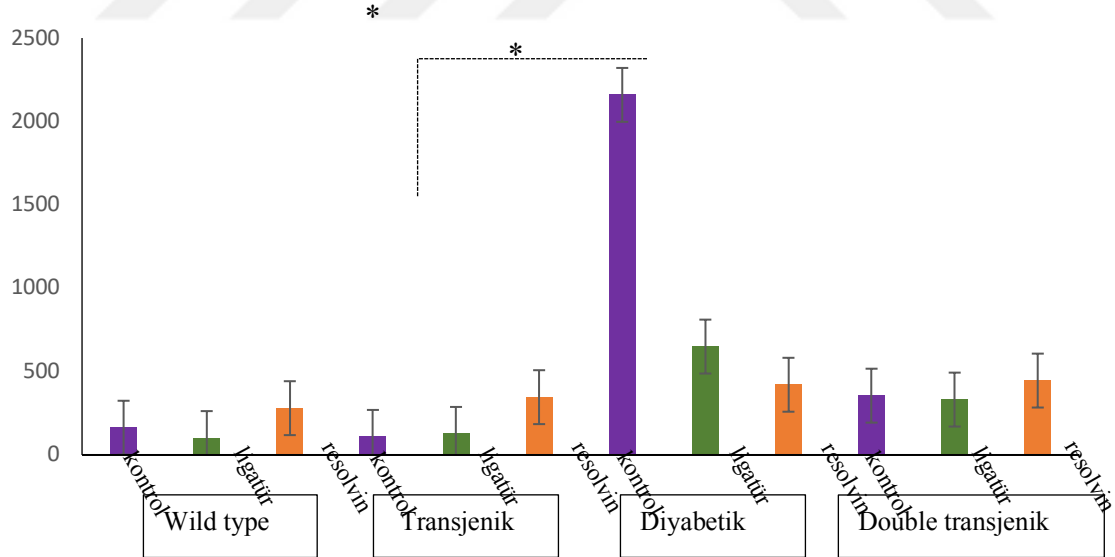
a) IL-17A



b) IL-17F

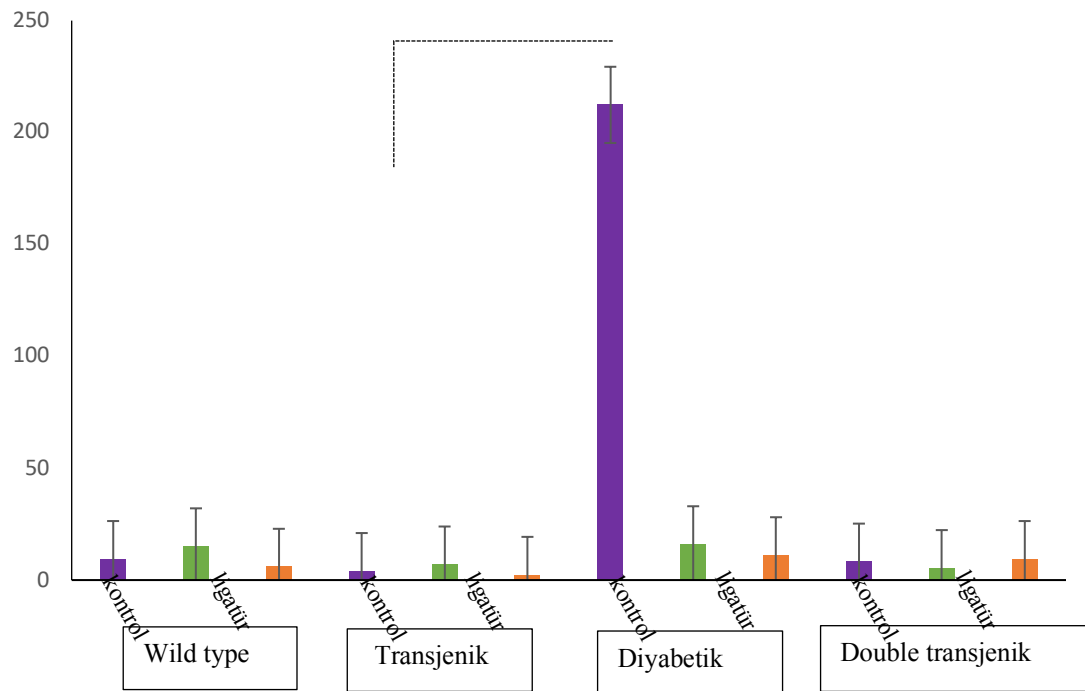


c) CCL20



Şekil 4-18: RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde a)IL-17A b)IL-17F ve c) CCL20 salgılanmasına. * p<0,05

Kontrol grupları arasında en çok IL-10, diyabetik farelerde görülmüştür ($p<0,05$). Bununla birlikte bağlanan ligatür salgılanan IL-10'u hem transgenic hem wild type farelerde büyük oranda azaltmıştır. Diyabetik olmayan farelerde ise IL-10 salgısı arasındaki fark anlamlı olmamakla birlikte ligatürle birlikte artış göstermiştir ($p>0,05$). (Şekil 4-19).



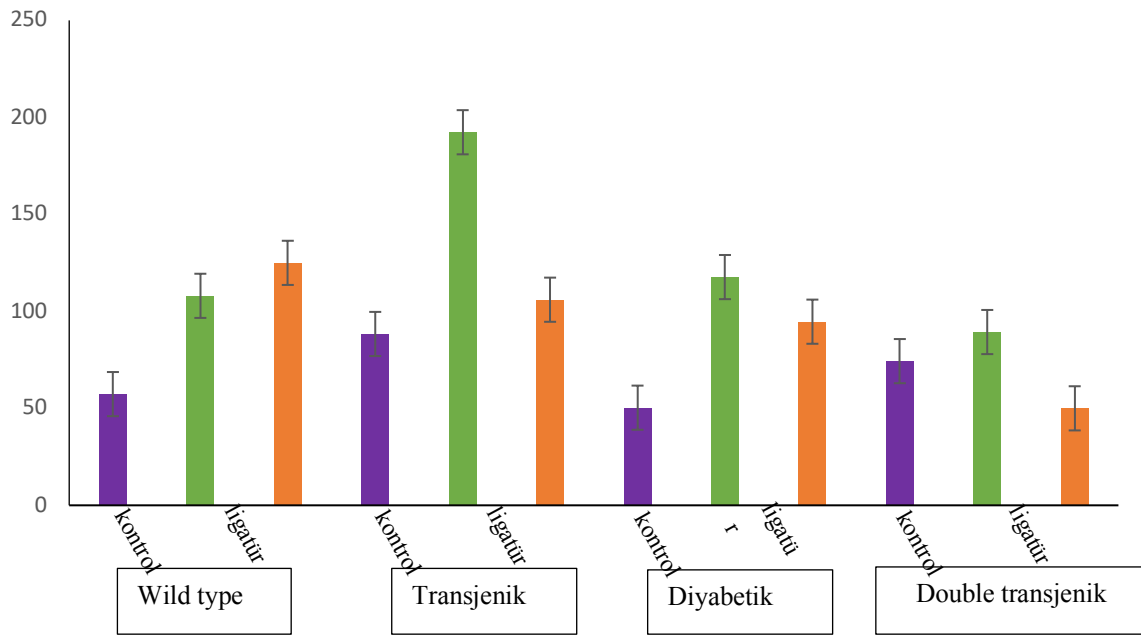
Şekil 4-19: RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler üzerinde IL-10 salgılanmasına etkisi. * $p<0,05$

4.2.2. Farelerden Elde Edilen Üst Çene Kesitlerinin Histolojik Analizi

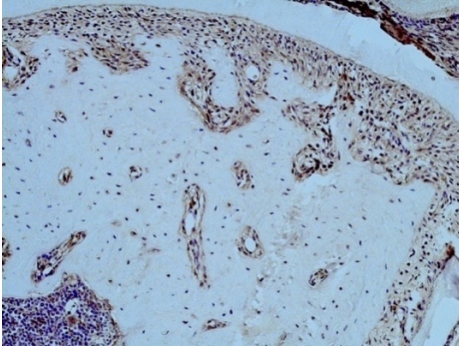
4.2.2.1. IL-17 Hücrelerinin Sayımı

Üst çeneden alınan kesitler IL-17 antikoruna boyanmış sonrasında tüm gruptaki farelerin kontrol gruplarında yakın oranlarda IL-17 sentezlendiği görülmüştür, ligatür bağlanması transjenik farelerde daha fazla etkili olsa da tüm gruplardaki IL-17 sitokinlerinin sentezinde artışa yol açmıştır. Bununla birlikte RvE1; double transjenik, farelerle birlikte diyabetik ve transjenik olanlarda da hücre sayısının azalmasına neden olsa da aradaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$), wild type fareler üzerinde ise etki göstermemiştir (Şekil 4-20).

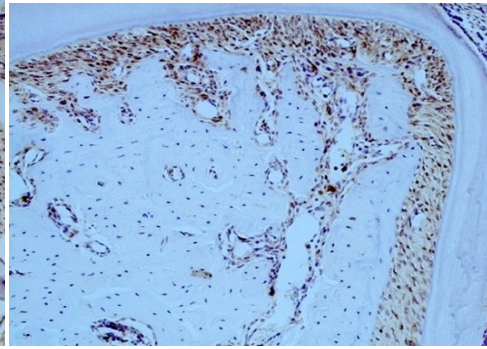
a) IL-17



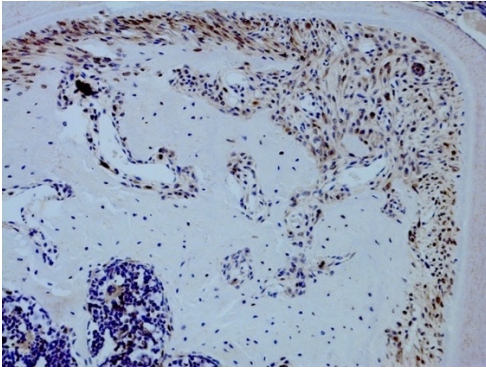
b) IL-17 hücre boyamaları



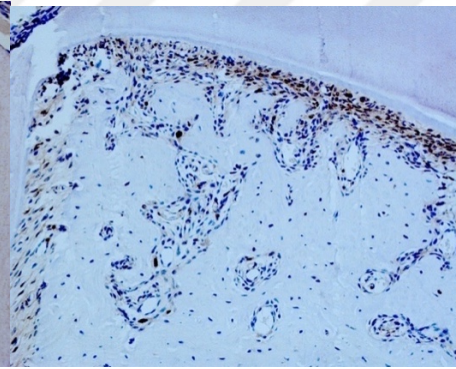
Wild type-ligatür grubunda IL-17 hücreleri



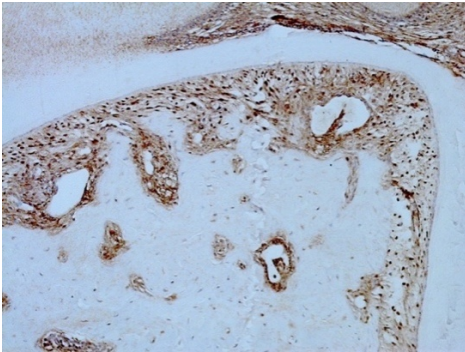
Transjenik-ligatür grubunda IL-17 hücreleri



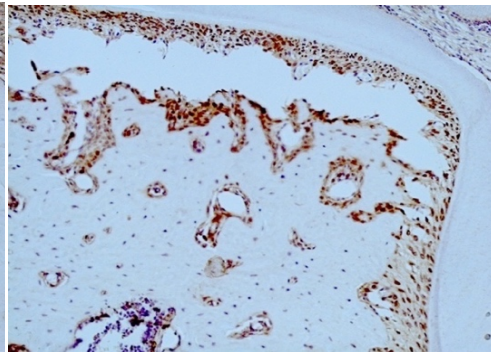
Diyabetik-ligatür grubunda IL-17 hücreleri



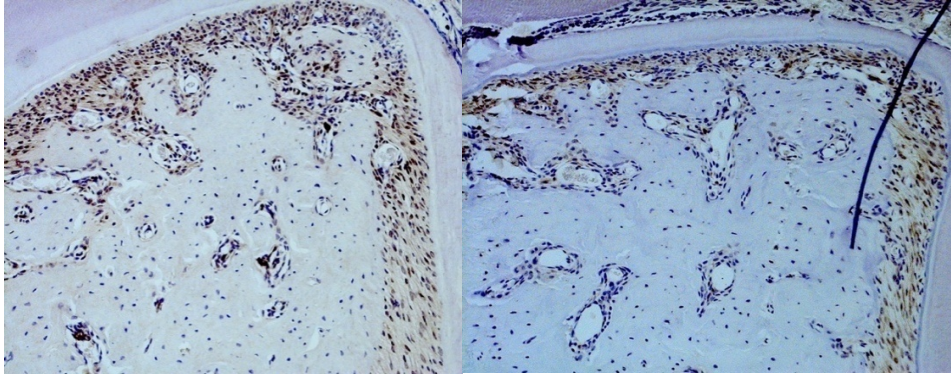
Double-transjenik ligatür grubunda IL-17 hücreleri



Wild type-ligatür grubundaki IL-17 hücreleri.



Transjenik-ligatür grubundaki IL-17 hücreleri



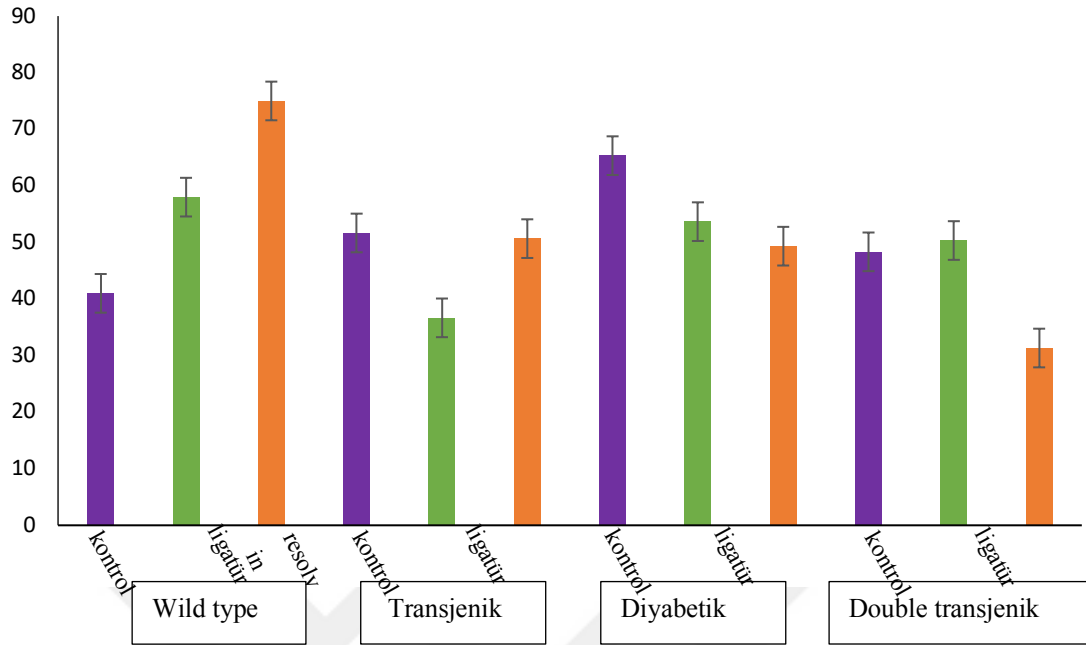
Diyabetik-ligatür grubundaki IL-17 hücreleri Double-transjenik-ligatür grubundaki IL-17 hücreleri

Şekil 4-20: RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik fareler tarafından sentezlenen IL-17 sitokinin seviyesi a) üç farklı fare grubunun ortalama değerini ($p>0,05$) b) temsili olarak seçilen boyama örneklerini göstermektedir.

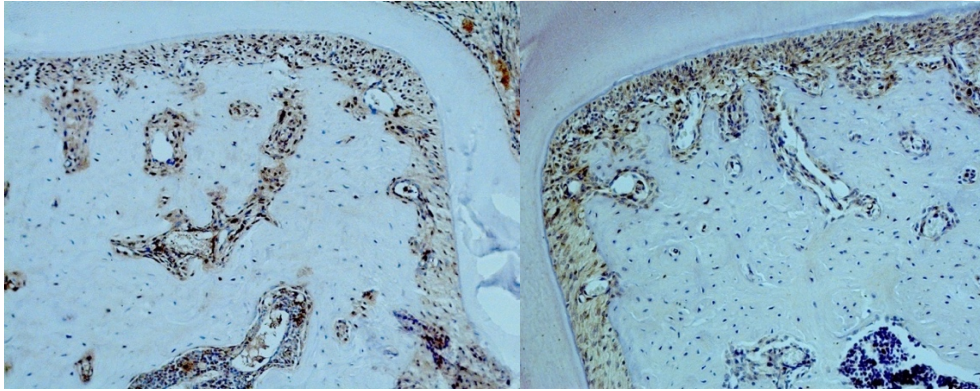
4.2.2.2. IL-2 Hücrelerinin Sayımı

Elde edilen üst çene kesitlerinin IL-2 antikoruna ile boyanması sonucu ilgili antikor arada anlamlı fark olmayacak şekilde en fazla diyabetik farelerin kontrol grubunda birikmiştir ($p>0,05$). Dişlerin etrafına bağlanan ligatür wild type ve double transjenik farelerde IL-2 sentezini artırırken, geri kalanlarda azaltmıştır fakat aradaki farkların hiçbirisi anlamlı değildir ($p>0,05$). RvE1 ise anlamlı olmasa da db/db ve db/ERv1 farelerde sentezlenen IL-2 sitokininini azaltmış, diğerlerine artırmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4-21).

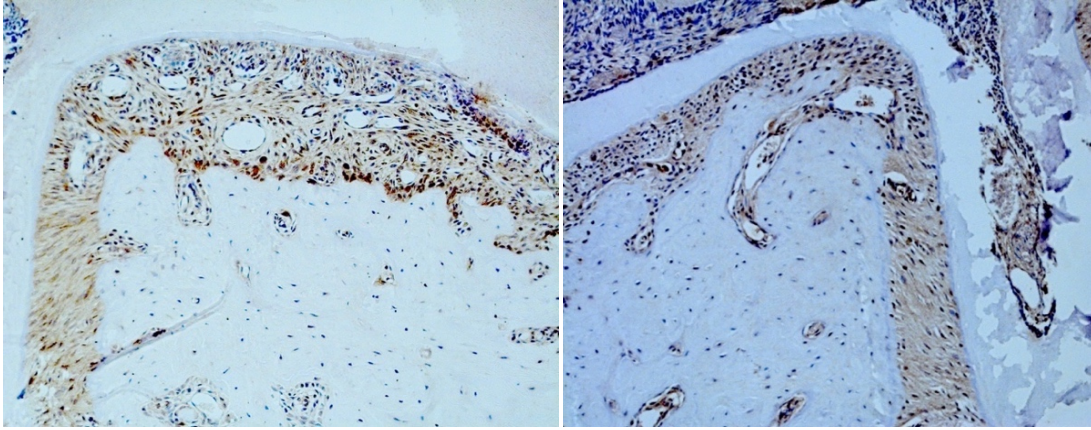
a) IL-2



b) IL-2 hücre boyamaları

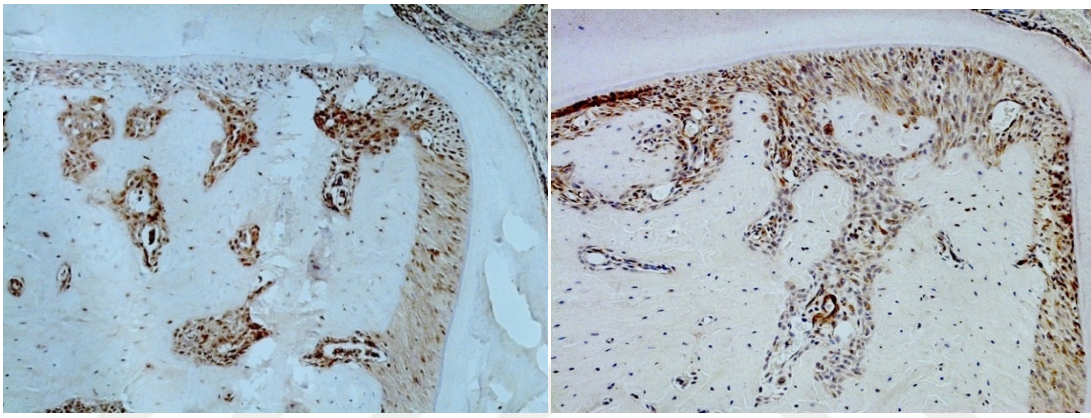


Wild type-ligatür grubundaki IL-2 hücreleri Transjenik-ligatür grubundaki IL-2 hücreleri

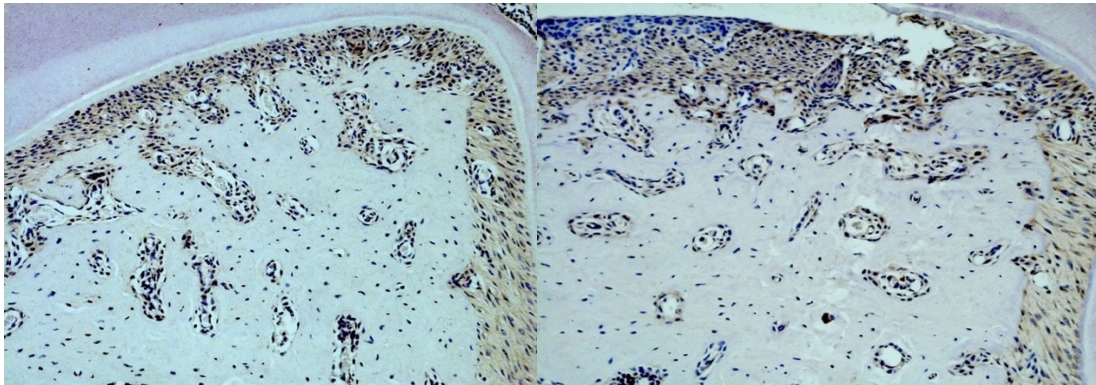


Diyabetik-ligatür grubundaki IL-2 hücreleri

Double transjenik-ligatür grubundaki IL-2 hücreler



Wild type-ligtür grubundaki IL-2 hücreleri Transjenik-ligtür grubundaki IL-2 hücreleri



Diyabetik-ligatür grubundaki IL-2 hücreleri

Double transjenik ligatür grubundaki IL-2 hücreleri

Şekil 4-21:RvE1'in ligatürle deneysel periodontitis oluşturulmuş wild type, transjenik, diyabetik ve double transjenik farelerin salgıladığı IL-2 sitokin miktarına etkisi a) birbirinden farklı üç fare grubundan elde edilen ortalama değeri ($p>0,05$) b) IL-2 antikoruna boyanan ve rastgele seçilen hücre kesitlerini göstermektedir

5. TARTIŞMA

5.1. Amacın Tartışılması

Periodontal hastalık, gingivitis olarak isimlendirilen diş eti ile sınırlı enflamatuvar bir süreç olarak başlar ve temel nedeni diş ve etrafını saran diş eti üzerinde oluşan mikrobiyal dental plakta bulunan bakteri kolonizasyonudur. Tedavi edilmediği durumda ilerleyerek cep adını verdiğimiz oluşumların gerçekleşmesine ve hem periodontal ligaman dokusunda hem de daha ileri vakalarda kemikte yıkıcı reaksiyonlar gerçekleşmesine neden olur bu aşamadan sonra da periodontitis ismini alır (121). Temel olarak mikroorganizmaların neden olduğu bu hastalığın etkilediği bölge sayısı ve derecesini konak yanıtı yönetmektedir(269). Konak yanıtı, canlı bir varlığın vücudunu izinsiz işgal eden faktörlere karşı geliştirdiği yanıt veya gösterdiği tepki olarak tanımlanabilir; periodontal hastalığa uyarlandığı zaman ise periodonsiyum tarafından oluşturulan konak yanıtı periodontal dokuları işgal eden bakterilere karşı yine oradaki lokal dokular tarafından geliştirilen savunma mekanizması olarak açıklanabilir (114). Konak yanıt ile mikrobiyal biyofilm arasında kurulmuş olan dinamik dengenin, bakteri birikiminin uzaklaştırılmaması veya miktarının artması ya da konak savunmasında genetik, hormonal, sistemik veya çevresel faktör kaynaklı defektler oluşması sonucunda bozulması enflamasyonun kronikleşmesine neden olmaktadır (268). Sadece konak yanıtının yetersiz olması değil olması gerekenden fazla görülmesi de periodontal yıkımı tetiklemektedir (82).

Hücrel olarak ise nötrofillerin başlattığı savunma hemen arkasından ortama gelen monositler ve makrofajlar ile devam ettirilmektedir. Bu aşamaya kadar koruyucu karakterde olan akut enflamatuvar yanıt ölü hücrelerin, bakteri veya ürünlerinin ortamdan tam olarak temizlenmesi durumunda kronikleşip patolojik bir hal alarak doku yıkımını başlatır (87). Mikroorganizmaları sindirme özellikleri ile fagosit olarak da isimlendirilen nötrofiller ile makrofajlar doğal bağışıklığın kilit savunma oyuncularındır fakat yeterli olmadıkları durumlar vardır ve burada hafıza yeteneklerinden

faýdalandıkları, daha güçlü saldırı ve savunma yapabilen kazanılmış bağışıklığın sahneye çıkmasını sağlamaktadırlar (108,114).

Doğal ve kazanılmış bağışıklık arasında oluşan işbirliğinden, doğal bağışıklığın en az fagositler kadar önemli bir başka üyesi olan antijen sunan hücreler sorumludurlar. Bu hücre grubunun da en önemli elemanı olan dendritik hücreler tehlike sinyali algılayıp kazanılmış bağışıklığı uyarak her iki sistem arasında anahtar köprü görevi üstlenmektedirler. Mukozal yüzeylerde lokalize olan dendritik hücreler kendilerinden olanı ve olmayanı ayırt etme yetenekleri sayesinde patojeni tanıyarak ele geçirirler daha sonra lenfositlerin yoğun olarak bulunduğu lenf organlarına göç ederek T hücrelerine sunarlar ve kazanılmış bağışıklığın başlamasını sağlarlar. Aynı zamanda salgıladıkları sitokinler ile hangi T hücresinin farklılaşacağını da tayin etmektedirler (56).

Lenf organlarında farklılaşmamış halde bulunan T hücreleri, dendritik hücreler tarafından salgılanan sitokin doğrultusunda yardımcı T hücrelerine farklılaşmaktadırlar ve bu aşamadan sonra devreye giren yardımcı T hücreleri kazanılmış bağışık yanıtın kontrolünü ve düzenlenmesini ele alıp salgıladıkları sitokinlerin dengesine bağlı olarak hastalığın prognozu belirlemektedirler (77). Bugüne kadar yapılan araştırmalar neticesinde Th1,Th17 ve Th2 hücrelerinin pro-enflamatuvar özellik göstererek doku yıkıma neden olduğu, Treg hücrelerinin ise anti-enflamatuvar karakterde olup doku yıkımını baskıladığı yönünde sabit bir konsensus bulunmasına rağmen periodontitisin patogeneğinde hangi T hücre grubunun hangi aşamada egemen olduğu veya reaksiyonlarının periodontal dokularda yıkıma mı iyileşmeye mi neden olduğu konusunda bir görüş birliği yoktur (267). T hücrelerinin yoğun enflamasyon durumlarında stabil bir fenotip göstermeyip kendi içlerinde farklılaşmaları da araştırmacıların fikir birliğine varmasını güçleştirmektedir. Th2 ve Th1 hücreleri daha sabit bir yapıya sahipken özellikle Th17 hücreleri çevresel faktörlerden etkilenerek otoimmün ve enflamatuvar hastalıklarda Treg, Th2, Th1 ve TFH hücrelerine farklılaşabilmektedirler. Th1'i taklit eden Th17 olarak isimlendirilen, bir hücre grubu bulunmaktadır; IL-17⁺IFN γ ⁺ olan bu hücreler IL-17 ve ROR γ t ile birlikte CCR6 sentezleyebilmektedir. Bu hücreler Th17 hücreleri kadar güçlü olmasa da benzer fonksiyon göstermektedirler (112). Hem Th17 hem de Th1 enflamatuvar yanıtta benzer

özellik göstermektedirler fakat normalde bağışık yanıtı baskılayarak anti-enflamatuvar etki gösteren Treg hücrelerinin kronik periodontitiste IL-17 üreterek pro-enflamatuvar fonksiyon gösterdikleri düşünülmektedir. FoxP3⁺IL-17⁺ hücreler gingivitisi olan hastaların diş eti dokularında görülmezken periodontitisi olan hastalarda yüksek oranlarda bulunmuştur. Neden olarak da ya periodontopatojenlere karşılokal olarak geliştikleri yani diş eti dokularında üretildikleri ya da kan dolaşımında üretilip diş etine sonradan geldikleri üzerinde durulmaktadır, fakat bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (184). *In vivo* çalışmaların bazılarında diş eti dokusunun bazılarında kanın kullanılması, örneklerin alan araştırmacıların farklı olması, periodontitisin değişik aşamalarında alınmış olması, diş eti doku örneklerinde dokunun farklı bir tabakasının alınması; *in vitro* olan çalışmalarda ise farklı bakteri türlerinin kullanılması, analiz yönteminin değişkenlik göstermesi gibi nedenlerde sonuçlarda bir bütünlük oluşmasını güçleştiren faktörler arasındadır. Hangi aşamada hangi T hücresinin üstün olduğu netlik kazanmasa da periodontitisin her döneminde ortamda yoğun olarak T hücre popülasyonu olduğu kesin olarak bilinmektedir (77).

Periodontal cepte bulunan epitelin bütünlüğünün bozulması bakteri veya ürünlerinin dolaşım sistemine katılıp daha uzak bölgede bulunan diğer organları etkilemesi ve lokal olarak üretilen enflamatuvar mediyatörlerin yine aynı şekilde sistemik olarak yayılması sonucu daha uzak bölgelerde görülen enflamatuvar molekül miktarının artması ve damarların endotel hücrelerinde gerçekleşen aktivasyon ve fonksiyon bozuklukları periodontitise daha geniş açıdan bakılmasını sağlamış ve diş hekimleri dışında diğer hekimlerin de ilgi alanına girmesini sağlamıştır (118). Günümüze kadar periodontal hastalık ile kardiyovasküler hastalık, diyabet, romatoid artrit, iltihapsal bağırsak hastalığı gibi pek çok Enflamatuvar hastalık ile periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır; periodontitisin altıncı komplikasyonu olarak kabul edildiği diyabet ile arasındaki ilişki her zaman araştırmacıların ilgi duyduğu bir konu olmuştur. Yapılan pek çok hayvan çalışması ve epidemiyolojik çalışma diyabet ile periodontitis arasında iki taraflı bir ilişki olduğu ve birbirlerinin etkilerini artırdığını; tedavi edilmeyen periodontitisin diyabette şeker kontrolünü zorlaştırdığını yine aynı şekilde kontrol altına alınmayan diyabetin de periodontitisin şiddetini ve ilerleme hızını artırdığını göstermiştir (302).

Periodontitis, diyabet ve nörolojik hastalıklar gibi pek çok kronik enflamatuvar hastalığın temel nedeninin devam eden enflamasyon olduğu kabul edildikten sonra enflamatuvar yanıtın endojen kontrol odaklarının bulunması hastalığın hem teşhisinde hem de tedavisinde yeni bakış açıları gelişmesini sağlamıştır (226). Endojen kontrol odakları vücut tarafından üretilen ve enflamasyonun çözünmesini sağlayan doymamış yağ asitlerdir; prostaglandinlerin (PGE_2 ve PGD_2) üretilmesi ile başlayan çözünme sürecinde kan akışı ve damarların dilatasyonu kontrol edilmektedir. Daha sonra bölgesel enfekte alanların kendi içerisinde enflamasyonu sonlandıracak sinyal yollarının aktive edilmesi ile programlanmış çözünme başlar; bu aşamada prostaglandinler enzimleri aktive ederek endojen lipid mediatorlerinin sentezlenmesini sağlamaktadırlar. (133).

Hücrel olarak da çözünmenin ana hedefi ortama gelen nötrofil akışını durdurmak ve makrofajların, ölü nötrofillerin ve fibrinin ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktır. Gerçekleşen tüm bu hücrel olayların amacı doku hasarını azaltmak hatta mümkünse sıfırlamak ve akut inflmasyonun ilerleyip kronik hale gelmesini önleyerek dokunun yenilenmesini tekrar homeostatik duruma dönmesini sağlamaktır. Hafif bir hasar mevcutsa akut çözünme olarak isimlendirilen nekrotik dokuların yeni dokularla yer değiştirerek rejenerasyonu gerçekleşirken daha şiddetli hasar olması durumunda kronik çözünme yani fibroblast tarafından yönlendirilen kollajen birikimi ile tamir veya skarlı iyileşme gözlenir (87).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda endojen lipid mediatörlerinin daha çok akut enflamasyona olan etkileri üzerinde durulmuş ve araştırmalar bu yönde yapılmış olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalarda lipid mediatörlerinin serbest yağ asidi reseptörlerini kullanarak endotel hücrelerin adezyon üreten moleküllerinin sentezlenmesini baskılayarak lökosit birikimini önleyip salgılanan sitokin miktarlarını etkileyerek romatoid artrit, astım, kardiyovasküler hastalık ve iltihabi bağırsak hastalığı gibi kronik seyreden hastalıklar üzerinde de etkili oldukları bulunmuştur (287). RvD1'in kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) ile ilişkili olarak; inhalasyon veya damar yolu (i.v) ile verildiği zaman sigara kaynaklı hava boşluğu genişlemesini önlediği ve nötrofil, makrofaj gibi akut enflamatuvar markerların miktarını azalttığı

gözlemlenmiştir. Aynı zamanda akciğerde biriken IL-6 miktarını azalttığı, IL-10 seviyesini ise artırdığı bulunmuştur. IL-6 gösterdiği pro-enflamatuvar, IL-10 ise anti-enflamatuvar etkisi ile kronik enflamasyonun önemli belirteçleri arasında yer almaktadır (96). Kronik kalp yetmezliği ile D grubu resolvinler arasındaki ilişki incelendiğinde yetmezlik olan hastaların kanında sağlıklılara göre iki kat daha az resolvin hesaplanırken kanlarından izole edilen T hücreleri üzerinde resolvinin hiçbir etkisi olmadığı saptanmıştır. Nedeni olarak da bu hastaların T hücrelerinde resolvinin hedef reseptörünün (GPR32) sentezindeki defekt gösterilmiştir (46). Periodontitis açısından bakıldığında çalışmada RvD2'nin RANKL oranını azaltıp, OPG oranını artırarak periodontitiste görülen kemik kaybını azalttığı bulunmuştur. (168). RvE1'in osteoklast farklılaşmasını bloke ederek rezorpsiyonu baskıladığını gösteren başka *in vitro*(93) ve *in vivo* çalışmalar da mevcuttur (86, 305). Yine farklı bir hayvan çalışmasında deneysel periodontitis oluşturulmuş tavşanlara topikal RvE1 verilmesinin enflamasyonun klinik belirtilerinin tamamen ortadan kaldırdığı görülmüştür aynı zamanda diş mobilitesinde, sondalanabilir cep derinliğinde, kemik içi defekt ölçümünde azalma meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra yumuşak ve sert dokuda rejenerasyon sağlanmış vertikal ve horizontal olarak kemik dolumu sağlanmıştır. Biyokimyasal olarak IL-1 β ve serum CRP düzeylerinde, histolojik olarak da osteoklast aktivitesinde iyileşme gözlemlenmiştir (85).

Biz çalışmamızı tasarladığımız sırada gerçekleştirdiğimiz literatür incelemesi sonucu Th17 hücrelerinin kronik enflamatuvar hastalıklarda oldukça etkili rolleri olduğunu, hem periodontitiste hem de diyabette sentezlerinin arttığını farkettilik. Endojen lipid moleküllerinin akut enflamatuvar hücreler üzerine etkisini gösteren daha çok çalışma olmasına rağmen kronik enflamasyon üzerindeki etkisi üzerine olan çalışmalar daha sınırlı sayıdadır, bunlardan periodontitisle ilgili olanlar, periodontitisin klinik belirtilerini azalttığını ve kemik rezorpsiyonunu baskıladığını göstermiştir. Enflamasyonun çözünme sürecinde Th17 hücrelerinin nasıl fonksiyon gösterdiklerine dair de çok az çalışma mevcuttur. Bu nedenle biz öncelikle *in vitro* olarak RvE1'in Th17 farklılaşmasına etkisini araştırdığımız çalışmamızda olumlu etkisini gördükten sonra kazanılmış bağışıklığı aktive eden dendritik hücreler üzerinde de etkisini

araştırmayı hedefledik. *In vivo* olarak da Th17 hücreleri etrafında RvE1'in diyabet ve periodontitis üzerindeki etkisi incelenmiştir.

5.2. Yöntemin Tartışılması

Farklı dokulardan ve organların uyum içerisinde birlikte çalışması sonucu oluşan lenfoid sistemin esas elemanları olan lenfositlerin kan dolaşımı ile ikincil lenf organları arasında sürekli hareket halinde olması lenf sisteminin görevini bir bütün olarak gerçekleştirmesini sağlamaktadır (167). Tam karın boşluğunda kan dolaşımının çok stratejik bir noktasında lokalize olan dalak, yüksek organize damarsal sistemi sayesinde (159) diğer lenfoid organların tamamından daha fazla lenfosit barındırmaktadır bu da dalağı vücuttaki bağışık yanıtın düzenlenmesinde en önemli lenfoid organ kılmaktadır (20). Yine dalakta bulunan dendritik hücreler, ve lenfositleri tarafından sentezlenen integrin, selektin ve kemokin molekülleri, kan dolaşımındaki hücrelerin dalağına geçişini sağlamaktadır (159). Biz de çalışmamızda hem daha fazla lenfosit barındırdığı için hem de konumu nedeni ile farelerin karın boşluğundan elde etmek daha kolay olduğu için farklılaşmamış T hücreleri ile dendritik hücreleri dalaktan izole etmeyi tercih ettik.

Dendritik hücreler fonksiyon ve fenotiplerine göre farelerde ve insanlarda plasmacytoid (pDC) ve konvansiyonel (cDC) dendritik hücreler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Cd11c yüzey reseptörünü çok az sentezleyen veya hiç sentezleyemeyen pDC kan dolaşımında aktif formda bulunup salgıladıkları IFN γ ile alerjik reaksiyonlardan sorumludurlar (237). Bakteriyel ve viral antijenleritaniyıp enflamatuvar reaksiyonlarda rol alan cDC ise kan dolaşımında, lenfoid organlarda, bağ dokuda, epitel dokuda veya deride dağılmış olarak bulunmaktadır. Konumlarına göre farklı alt gruplara da ayrılan bu hücrelerin ortak özellikleri hepsinin Cd11c reseptörü sentezlemeleridir (89). Biz de bu yüzden dalaktan izole ettiğimiz CD11creseptörü sentezleyen dendritik hücreleri kullanarak T hücrelerini stimüle etmeyi tercih ettik. Periodontitiste dendritik hücre ve T hücre ilişkisini inceleyen çalışmalar da bizim

çalışmamızda olduğu gibi CD11c sentezi yapan hücrelerin kullanımı tercih edilmiştir (54, 98,206).

Dendritik hücrelerin yukarıda anlattığımızdan farklı sınıflandırma seçenekleri de mevcuttur; öncü hücrelerine göre de myeloid veya lenfoid temelli olarak iki kategoride incelenebilirler. *İn vitro* yapılan araştırmalarda daha çok tercih edilen dendritik hücreler myeloid kökenlidir ve gelişimde kandan veya kemik iliğinden elde edilen CD1a⁺ monositlerin *in vitro* ortamda GM-CSF/IL-4 veya GM-CSF/TNF α ile ortalama beş ile yedi gün arası kültüre edilmesi sonucu dendritik hücrelere dönüşmektedirler (300). Timus, dalak veya kandaki öncü hücrelerden köken alan dendritik hücrelerin ise lenfoid kökenli olduğu kabul edilmektedirler. İki grup arasındaki en temel ayırt edici unsur lenfoid kökenli olanların CD8 α sentezlerken myeloid kökenli olanların sentezleyememesidir. Bunun dışında fenotip, fonksiyon ve lokalizasyon olarak farklılıkları olsa da her iki grup hücre de antijen sunma özelliğine sahiptirler ve pDC haricindekiler CD11c, CD80, CD40, MHC II ve insanlarda CD83, farelerde CD86 olan olgunlaşma belirteçlerine sahiptirler (34). Her iki yöntem de dendritik hücre elde etmek için kullanılmaktadır, araştırmalarda monositlerden farklılaşan dendritik hücrelerin kullanılmasının en büyük nedeni sayı olarak daha fazla miktarda bulunmalarındır; normalde kandan elde edilen mononükleer hücrelerin 10-30%'unu monositler oluştururken dendritik hücreler için bu oran 1-2% arasında sınırlı kalmaktadır. Buna karşın monositlerin kültür edilmesi esnasında enfekte olmaları veya ölmeleri gibi riskleri bulunmaktadır bu nedenle biz çalışmamızda daha az sayıda olmalarına rağmen direkt dalaktan elde edilen CD11c⁺ dendritik hücreler ile çalışmayı tercih ettik.

Farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin Th17 hücrelerine proliferasyonunu uyarmak için öncelikle hücrelerini aktive etmek gereklidir. Sadece T hücrelerinin değil tüm hücrelerin aktivasyonu kostimülasyon olarak da isimlendirilen ve hücre yüzeyinde bulunan reseptör ve onu uyaran farklı bir hücrenin birleşimi sonucu gerçekleşmektedir; T hücre aktivasyonu da temelde hücre yüzeyinde bulunan TCR reseptörleri aracılığı ile gerçekleşse de *in vitro* olarak sadece bu reseptörlerin aktive olması yeterli değildir; hücrelerin apoptozu, yeterli miktarda sitokin üretilmemesi veya anerjik hücrelerin oluşumu gibi problemlerle karşılaşmamak için *in vitro* sürdürülen deneylerde TCR'ye

destek olarak kostimulatör molekül olarak isimlendirilen CD3/CD28 antikorları kullanılmaktadır. Kullanılan CD3/CD28 antikorlarının T hücrelerinde poliklonal aktivasyon yarattığı bilinmektedir. (71). Bu moleküller hücre kültürlerinde çözülebilir şekilde medyum içerisinde veya kuyucukların tabanına yapışacak şekilde olmak üzere iki farklı yolla kullanılabilir; her iki yöntemin kendi içerisinde avantajları ve dezavantajları vardır. Çözülebilir olarak medyum içerisinden kullanmak etkilerini daha uzun süre göstermelerini sağlamaktadır fakat kuyucukların tabanına adapte olacak şekilde kullanmanın etkisini daha iyi gösterdiğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (264). İlk olarak CD3 molekülü aktive olup TCR ile kompleks oluşturmaktadır daha sonra aktifleşen CD28 dendritik hücreler üzerinde bulunan CD80 ve CD86 molekülleri ile birleşerek T hücre aktifleşmesinin tam olarak gerçekleştiğini göstermektedir (30). Biz çalışmamızda CD3 antikorunu hücreleri eklemekten 4 saat önce kuyucuklara ekleyerek adapte olmasını sağladık, CD28 antikorunu ise hücreler ile birlikte medyum içerisinde kullanmayı tercih ettik.

Farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin IL-6 ve TGF β ile uyarılması sonucunda Th17 hücrelerine farklılaştığı konusunda bir görüş birliği vardır(7). *In vitro* Th17 farklılaşması sırasında çalışmaların bazılarında bu iki sitokine ek olarak farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin diğer yardımcı T hücrelerine dönüşmesini önlemek amacı ile anti-IL4 (Th2'ye dönüşmesini önlemek için) ve anti-IFN γ (Th1 hücrelerine dönüşmesini önlemek için) aynı zamanda Th17 hücrelerinin stabilizasyonunu artırmak için IL-23 kullanılmaktadır (120). Sadece TGF β ile IL-6 kullanılmasının Th17 hücrelerini uyarmak için yeterli olduğunu düşünen araştırmacılar da vardır (27). Araştırmalar neticesinde IL-23'ün saf T hücrelerinden Th17 oluşumunu uyarmadığı, aktif/hafıza hücrelerinde etkili olan bu sitokinin Th17 oluşumunu artırdığı, yaşamlarını sürdürmelerine yardım ettiği ve fenotipini stabilize ettiği; üretim kaynaklarından birinin de aktifleşmiş T hücreleri olduğu belirlenmiştir (29) biz de bu yüzden hücre kültürlerini tasarlarken T hücrelerinin kendi ürettikleri IL-23'ün feed-back mekanizması ile etkisini göstererek Th17 oluşumunu uyarmasını sağlaması amacı ile medyuma sadece IL-6 ve TGF β ilave ederek beş gün boyunca inkübe ettik.

Dendritik hücrelerin farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerini uyardığı *in vitro* çalışmalarda her iki hücre grubu birlikte kültüre edilmektedir. Bu tarz kültür ortamlarında T hücreleri her zaman sayı olarak dendritik hücrelerden daha üstündür fakat en iyi sonucu almak için deneyin dizaynını iyi ayarlamak kullanılan hücrelerin sayısı ve birbirine oranını iyi hesaplamak gereklidir. Bu konuda farklı araştırmacılar farklı oranlar belirlemişlerdir; bir dendritik hücre / beş T hücresi (98), bir dendritik hücre / yirmi T hücresi (222) veya bir dendritik hücre / elli T hücresi (110) olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır. Biz çalışmamızda bir dendritik hücre / elli T hücresi oranını kullanıp 1000 dendritik hücreyi 50,000 T hücresi ile birlikte 5 gün boyunca kültüre ettik.

Dendritik hücrelerin üzerinde bulunan TLR'ler antijeni tanıyıp dendritik hücrelerin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını başlatan sinyalleri salgılayarak doğal bağışıklığın başlamasını sağlamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda TLR2 aktivasyonunun farklılaşmamış T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşmesini sağladığı (204) ve PAM3CSK4 antijeninin de TLR2'yi aktive ettiği (288) bulunmuştur. Bu nedenle biz de çalışmamızda dendritik hücreler ile T hücrelerini PAM3CSK4 varlığında beş gün süresince inkübe ederek Th17 farklılaşmasını değerlendirdik.

Diyabetin yan etkilerinin ve nedeninin araştırılmasında hem genetik hem de fonksiyonel olarak temsili bir model oluşturabilmeleri nedeni ile hayvan modelleri kritik önem taşımaktadırlar. Temelde diyabetik hayvan modelleri kimyasal maddeler verilerek ve genetik olarak oluşturulanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Genetik olarak, diyabetin her iki türünü de taklit eden farklı modeller bulunmaktadır (8). T2D'i taklit eden hayvan modelleri, bir veya daha fazla genetik mutasyon geçiren diyabetik olmayan farelerin sürekli beslenmesi ve birkaç jenerasyon üremesi sonucu elde edilmektedirler. Değişik yollarda elde edilen farklı modeller olsa da leptin reseptöründeki dördüncü kromozomun otozomal resesif mutasyonu sonucu oluşan db/db fareler hiperglisemi, yüksek insülin direnci ve obeziteyi taklit eden özellikleriyle T2D çalışıldığı araştırmalara en uygun modeli oluşturmaktadır (35). Biz de bu nedenle çalışmamızda bu fare modelinin kullanılmasını tercih ettik.

Diyabet gibi periodontitis de sıklıkla hayvan modelleri ile çalışılmaktadır. Hayvanlarda deneysel periodontitis; büyü azı dişin etrafına bağlanan ipek dikiş malzemesi, diş etine LPS enjekte edilmesi veya spesifik periodontopatojen mikroorganizmaların büyük azı dişin etrafına uygulanması ile olmak üzere üç farklı yöntemle oluşturulabilir (271). Ligatür ile oluşturulan deneysel periodontitis, yerleştirilen ligatürün etrafında besin birikimine bağlı olarak bakteriyel kaynaklı enflamatuvar reaksiyonların başlaması ve kaçınılmaz son olarak kemik kaybı ile birlikte periodontitisin gelişmesi temeline dayanmaktadır. Birçok yönden insanda oluşan periodontitise en yakın olan bu yöntemde topikal dezenfektanların veya antibiyotiklerin mevcut kemik kaybını azalttığı, konak savunmasında yapılan birtakım değişikliklerin de mevcut durumu şiddetlendirdiği veya hafiflettiği görülmektedir (82). Kemik kaybının farelerde öngörülebilir olması ve birkaç gün içerisinde başlaması aynı zamanda ligatür çıkarıldığı zaman enflamasyonun çözünmesine ve iyileşmeye olanak sağlaması gibi avantajları bu modeli yaygın kılmaktadır (260). Biz de çalışmamızda avantajları nedeni ile bu modeli kullanmayı tercih ettik.

5.3. Bulguların Tartışılması

5.3.1. *İn Vitro* Bulguların Tartışılması

Resolvinin IL-17 üretimine etkisinin doğrudan değil, IL-17'ye bağlı kemik rezorpsiyonu aracılığı ile incelendiği bir çalışmada öncelikle *in vitro* olarak IL-17 ilavesinin RANKL oranını azaltıp OPG oranını artırarak kemik yıkımına uygun ortam hazırladığını dolayısı ile periodontitis, romatoid artrit gibi hastalıklarda görülen kemik rezorpsiyonunun IL-17 tarafından da uyarıldığı gösterilmiştir. RvE1 uygulandıktan sonra ise anlamlı iyileşme görülmüş; RANKL oranı azalırken, OPG oranı artmıştır, bu da azalan IL-17 üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda RvE1'in yine IL-17'ye bağlı PGE₂ üretimini azalttığı bulunmuştur (74).

Psoriasis, derideki T hücresi (Th1, Th17 ve sitotoksik T hücreleri) ve dendritik hücre birikiminin artması ile karakterize patogenezinde doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki denge ile derideki keratinositler tarafından salgılanan faktörlerin sorumlu olduğu bir deri hastalığıdır (143). Resolvinin psoriazise etkisinin incelendiği bir hayvan çalışması hasta farelerden elde edilen deri örneklerinde sağlıklılara kıyasla daha fazla il23 ve il17a genine rastlamıştır ve RvE1 tedavisinin bu oranları düşürdüğü gözlemlenmiştir fakat etkisi sadece gen sentezi ile sınırlı kalmıştır; yine aynı farelerde $\gamma\delta$ T hücre sayısı azalmış olsa da sentezledikleri IL-17A seviyesi üzerinde resolvinin herhangi bir etkisi bulunamamıştır. Dendritik hücreler tarafından salgılanan IL-23p19 üretimi hem *in vitro* hem *in vivo* olarak resolvin ile baskılanmıştır. (221). Yukarıdaki çalışmada da resolvinin IL-17 üzerinde etkili olduğu bulunmuş fakat IL-17 geninin sentezi ile salgılanan IL-17 antijeni Th17 hücreleri devre dışı bırakılarak doğrudan $\gamma\delta$ T hücreleri ile ilişkilendirilmiştir. IL-17, esas Th17 hücreleri tarafından salgılanıyor olsa da yapılan çalışmalar IL-1 ve IL-23 tarafından uyarılan $\gamma\delta$ T hücrelerinin IFN γ ve IL-17 üreterek enflamatuvar hastalıklarda rol oynadıkları sonucuna ulaşmıştır (245).

Resolvin ile T hücreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada RvD2, RvD1 ve MaR1'nin, CD4⁺ T hücreleri tarafından salgılanan IL-17, TNF α ve IFN γ miktarlarını aynı zamanda RORC ve T-bet gen sentezini de azaltmaları bu mediatörlerin Th17 ve Th1 farklılaşmasını inhibe ettiğini göstermektedir (45).

Bizim sonuçlarımızda da RvE1'in Th17 hücreleri üzerinde benzer etkisi olduğu görülmektedir; resolvinin Th17 proliferasyonunu baskıladığı azalan IL-17, ROR γ t reseptör sentezi ve IL-17 sitokin salgısı ile görülmektedir.

RvE1, Th17 hücrelerinin sadece proliferasyon kapasitelerini değil aynı zamanda enflamasyon bölgesinde toplanmalarını sağlayan kemoattraktivitelerini de azaltmaktadır. CCR6⁺ hücre popülasyonunun büyük kısmı IL-17 üretilen IFN γ üretmiyor olsa da her iki sitokini de salgılayan küçük bir hücre grubu bulunmaktadır; bu da bize CCR6⁺ hücrelerinin saf Th17 hücre sayısını değil Th17 ve Th1 hücre sayısını (büyük çoğunluğu Th17 olmak üzere) verdiğini göstermektedir (4) fakat ligandı CCL20 farklı olarak Th17 hücre grubunda aktif iken Th1 hücre grubunda aktif değildir (12). Treg hücrelerinin Th17'ye dönüşmesi sonucu oluşan IL-17⁺FoxP3⁺ hücreler fenotip olarak

orjinal Th17 hücreleri ile benzer özellikler göstermektedirler; her iki hücre grubu CCR6 reseptörü sentezlemesine rağmen CCR'nin bilinen tek ligandı olan CCL20 sadece orjinal Th17 hücreleri tarafından salgılanmaktadır (6).

Bizim sonuçlarımız resolvinin CCR6 ve CCL20'nin Th17 hücrelerinin üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışmadır, farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin aktive edilmesi ve Th17'ye farklılaştırılması her iki molekülün sentezini artırmış daha sonradan ilave edilen RvE1 ise anlamlı derecede azaltmıştır. Birbirlerinden farklı olarak resolvin CCL20 üzerinde daha fazla etki göstermiştir ve sentezini neredeyse sıfırlamıştır buna karşılık CCR6 üzerinde bu kadar güçlü bir etki görülmemiştir, bunun nedeni olarak CCL20'nin tek kaynağının Th17 hücreleri olması fakat CCR6'nın Th1 tarafından da üretilmesi gösterilebilir.

RvE1'in hücrelerin enflamasyon bölgesine doğru akışına olan etkisi incelendiği zaman ise resolvin sonucunda ortamda daha az dendritik hücre ve Th17 bulunduğu saptanarak kemoatraktivitenin baskılandığı sonucuna ulaşılmıştır fakat ortamdaki CCL20 seviyelerine bakıldığında zaman anlamlı bir fark görülmemiştir (221). Bizim çalışmamıza yakın olarak lipid mediyatörlerinin CCR5 üzerine etkisi araştırılmış ve geç apoptik hücreler üzerinde yüksek oranda olan CCR5 sentezinin lipid mediyatörleri eklendikten sonra düştüğü görülmüştür (16).

In vivo ve *in vitro* pek çok çalışma T hücre farklılaşması için IL-2'nin önemini göstermiştir. IL-2 reseptörünün yüksek affiniteli yapısının üçüncü halkasını oluşturan CD25, IL-2'nin belki de en önemli yapısıdır. Sinyal alırken veya iletirken herhangi bir fonksiyon göstermeyen bu molekülün en önemli görevi reseptörün ligandı (IL-2) ile olan çekim gücünü 10 ile 100 kat arasında artırmasıdır. CD25 molekülü, CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreleri tarafından hücrenin özel reseptörü ile aktivasyonundan sonra sentezlenmektedir yani CD25 bize ortamdaki aktif T hücre miktarı ile ilgili de bilgi vermektedir. Akut enfeksiyonu takiben T hücreleri IL-2'nin ortama gelip etki göstermesi için CD25 reseptör sentezini artırmaktadır. Aynı zamanda üretilen IL-2 de pozitif feedback mekanizması ve STAT5 sinyalini kullanarak cd25 gen odaklarına bağlanarak CD25 sentezine katkı sağlamaktadır (31, 151). Bizim sonuçlarımızda RvE1'nin en büyük etkisini CD25 sentezi üzerinde göstermiştir ve RvE1'e bağlı olarak

azalan hücre aktivitesi, CD25 reseptörünün sentezinde de azalmaya neden olmuştur. Bununla benzer sonuç göstermesi beklenen IL-2 salgısı da RvE1 verildikten sonra hem dendritik hücrelerden hem de T hücrelerinden anlamlı olarak daha az oranda salgılanmıştır.

Doğal baskılayıcı hücreler olarak da adlandırılan $CD4^+CD25^+$ hücrelerini diğer düzenleyici T hücrelerinden ayıran özellikleri timus tarafından sentezlenmelerinin yanı sıra enflamasyon olmadığı durumlar da dahil olmak üzere her zaman vücutta bulunmalarıdır. Herhangi bir antijenle uyarılmadıkları sürece anerjik karakter göstermeleri baskılayıcı özellik göstermelerinin temel nedenidir (213). $CD4^+CD25^+$ hücreleri etkilerini TCR aracılığı ile IL-2'nin transkripsiyonunu inhibe ederek gösterirler fakat bu özellikleri *in vitro* çalışmalarda dışarıdan IL-2 ilave edildiğinde veya hücre kültüründe IL-2 sentezinin uyarılması ile bozulabilir. IL-2 sentezinin uyarılması da hücre kültürlerine yukarıda kostimulasyon adı ile ayrıntılı olarak anlatılan CD28 ilave edilmesi ile veya antijen sunan hücrelerde bulunan CD80/CD86 moleküllerinin T hücrelerinde bulunan CD28 ile etkileşime girmesi sonucu mümkün olmaktadır (232). Aslında gerçekleşen her iki olay da hücrelerin aktivasyonunu sağlamaya yöneliktir, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre resolvin CD25 sentezini anlamlı ölçüde azaltmaktadır bu da hücrelerin aktifleşmesini önleyerek tekrar anerjik ve baskılayıcı formlarına geri dönmelerini sağlamaktadır. *In vitro* çalışmamızda farklılaşmamış $CD4^+$ T hücrelerinin CD3/CD28 ile uyarılmaları sonucu açığa çıkan IL-2 hücrelerin $CD4^+CD25^+$ hücrelerinin baskılayıcı özelliğini kaldırmış olabilir, Çalışmamızda uygulanan RvE1 ile $CD4^+CD25^+$ hücrelerinin sayısı anlamlı olarak azalmıştır. Buna ek olarak bu hücreler tarafından sentezlenen IL-17 ($CD4^+CD25^+IL-17^+$) ve ROR γ t ($CD4^+CD25^+ROR\gamma^+$) hücre sayıları da RvE1 ile sayıca anlamlı bir düşüş göstermektedir. Hatta resolvinin $CD4^+CD25^+$ hücrelerinde gösterdiği etki sadece $CD4^+$ hücrelerde gösterdiği etkiden daha güçlü bulunmuştur.

$CD4^+CD25^+$ hücreler daha sonra FoxP3 sentezini sağlayarak daha stabil fonksiyon gösteren $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg hücrelerinin sentezlenmesini sağlamaktadır (213). Yaptığımız çalışma sonucunda RvE1 ilave edilmesi sonucu FoxP3 sentezinde de azalma görülmüştür. Dolayısı ile RvE1'in ortamda bulunan Treg hücre

populasyonunu azalttığını söyleyebiliriz. IL-2 ve CD25 miktarının azaldığı bir ortamda onlara bağlı olarak sentezlenen FoxP3`ün de azalması beklenen bir sonuçtur. Bizim sonuçlarımızdan daha bulguların elde edildiği bir çalışmada RvD1, RvD2 ile MaR1`in FoxP3 reseptör sentezi ile Treg hücre miktarını ise artırdığı gözlemlenmiştir (45). Bizim çalışmamız ile bu çalışma arasında yöntem açısından önemli bir farklılık bulunmaktadır; ilgili çalışmada FoxP3 ve IL-10 , Treg hücrelerinin farklılaşma koşulları altında yani ortamda sadece TGF β ve IL-2 varken değerlendirilmektedir (45). Bu farklılaşma koşulları altında ortamda Th17 hücrelerinin sentezlenmesi mümkün değildir, bizim çalışmamızda ise resolvinin Th17 hücre sentezine etkisinin yanı sıra Th17 ve Treg hücre arasındaki dengeyi incelemek amacı ile her iki hücre populasyonunun aynı anda ortamda bulunmasına olanak sağlayacak şekilde TGF β ile IL-6 varlığında değerlendirme yapılmıştır.

Treg ve Th17 hücreleri fonksiyonel ve farklılaşma yolu olarak tamamen zıt özellikler göstermektedirler; birinin sentezinin artmasının diğerinin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda IL-2`nin, ROR $\gamma$ t`ye bağlanarak Th17 sentezlenmesini inhibe ettiği ve CD4⁺ T hücrelerinin Treg hücrelerine proliferasyonu sağladığı(132), FoxP3`ün ise ROR $\gamma$ t aktivitesini baskılayarak Th17 farklılaşmasını önlediği (299) bulunmuştur. Aktif T hücreleri tarafından da üretilen ve otokrin özellik gösteren sitokin olan IL-2`nin esas kaynağının dendritik hücreler olduğu bilinmektedir (81). Ortamda IL-2 olmaması durumunda IL-2`yi kendileri üretemeyip çevreden alan Treg hücre sayısı azalırken, IL-2`nin inhibitör özelliği ortadan kalktığı için Th17 hücre sayısı artış göstermektedir (140). T hücrelerini baskılayıcı karakteri ile lipid mediyatörlerine benzer etki gösteren Lysophosphatidylserine de ilave edildiği hücre kültürü ortamında salgılanan IL-2 miktarını azaltmıştır (233). Bizim sonuçlarımızda da RvE1 hem dendritik hücreler tarafından hem de farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinden Th17 sentezlendiği sırada T hücreleri tarafından salgılanan IL-2 miktarında anlamlı şekilde düşüş göstermiştir, azalan IL-2 miktarı da Treg hücrelerinin sentezlenememesine neden olmuş olabilir. Fakat yine resolveine bağlı olarak bu durumda artış göstermesi gereken Th17 hücrelerinin sentezi de anlamlı şekilde baskılanmıştır. Bu görüşün tersini yani Treg ve Th17 hücre sayısının aynı anda arttığını savunan çalışmalar

da mevcuttur; yapılan bir çalışmada Treg hücrelerinin dolaylı olarak farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüştürülmesini sağladığı belirtilmiştir. Bu da ortamdaki IL-2'yi kullanarak sayılarını azaltması ve daha önce de belirttiğimiz gibi IL-2'nin Th17 üzerindeki baskılayıcı özelliğinin ortadan kalkmasına bağlanmıştır (191). Bu görüşü destekleyen *in vivo*(43) ve *in vitro* çalışmalar (127) bulunmaktadır. IL-2, Treg-Th17 dengesinin sağlanmasında yani ortamın anti-enflamatuvar karakterde mi pro-enflamatuvar karakterde mi olacağı konusunda kilit rolü oynamaktadır (140).

RvD2'nin deneysel periodontitisi taklit eden diş eti hastalığı oluşturulan farelerin karın bölgesine günlük uygulanmasının sonucunda diş eti dokularından alınan örneklerde IL-1 β , TNF α ile IFN γ 'nın daha az sentezlenmesine bağlı olarak Th1 hücrelerinin sentezini ve bizim sonuçlarımızla benzerlik göstererek diş etinde sentezlenen Treg hücre topluluğunu miktar olarak azalttığı görülmüştür. Lenf nodundan elde edilen örneklerde ise bizim sonuçlarımızdan farklı olarak RvD2'nin IL-17 sentezini artırdığı sonucu bulunmuştur (168).

Baskılayıcı karakterde bir sitokin olan IL-10, doğal ve kazanılmış bağışıklık tarafından salgılanan pro-enflamatuvar yanıtları baskılayarak, neden oldukları doku hasarlarını önlemektedir. Bu özelliği de IL-10'u enflamasyonun çözünme safhasındaki en önemli sitokin yapmaktadır (189). IL-10, bağışıklığın sağlanmasında görevli tüm hücreler tarafından sentezlenebilmektedir, öyle ki makrofajlar, natural killer hücreler, dendritik hücreler, B ve T hücreleri kaynakları arasında gösterilmektedir (170) fakat sentezi pek çok farklı sitokinler tarafından modifiye edilmektedir; IL-10 üreten hücreler arasında Treg hücreleri önemli bir yer tutmaktadır, *in vitro* olarak IL-2 ve IL-4, *in vivo* olarak ise TGF β Treg hücrelerinin IL-10 salgılamasını uyarmaktadır (25, 155). Yapılan çalışmalar resolvin ilave edildikten sonra IL-10 üretiminin arttığını göstermektedir (45, 168). Bizim sonuçlarımızda ise sürpriz bir şekilde RvE1 farklılaşmış T hücrelerinden sentezlenen IL-10 miktarını azaltmıştır. IL-17 ile IL-10 arasında pek çok farklı faktörden etkilenen karmaşık bir denge bulunmaktadır; Th17 farklılaşmasında önemli rol oynayan IL-1 β 'nin IL-12'nin Th17'yi baskılayan özelliğini inhibe ederek IL-17⁺IFN γ ⁺ hücrelerin üretimini artırdığını aynı zamanda IL-10 sentezlemesini ise baskıladığını gösteren çalışmalar vardır (303). IL-27'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak Th17

farklılaşmasını inhibe ettiği fakat Th17 hücrelerinden sentezlenen IL-10 üretimini artırdığı da savunulmaktadır (40,240). Bizim Th17 sentezini incelediğimiz kültür ortamında sadece CD4⁺ T hücreleri bulunmaktaydı bu yüzden IL-10 miktarında görülen bu düşüş iki nedenden dolayı olabilir birincisi; ortamda yeterli miktarda IL-23 bulunmamasından kaynaklı Th17 hücrelerinin patojen olmayan alt grubunun sentezi ve ilave edilen resolvinin bu hücre popülasyonunu ve onlar tarafından salgılanan IL-10 miktarını azaltması (253) ikincisi ise bizim sonuçlarımıza göre RvE1, IL-10 için önemli bir rezervuar olan Treg hücre sayısında da azalmaya neden olmuştur bu da salgılanan IL-10 miktarının azalmasına neden olmuş olabilir.

Dendritik hücrelerin bağışık yanıtı başlatma ve yönlendirme konusunda rolünü gösteren pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır fakat enflamasyonun çözünmesi aşamasında dendritik hücrelerin fonksiyonunu gösteren çok az araştırma bulunmaktadır (272). Biz bu çalışmada resolvin ve dendritik hücre ilişkisini iki farklı noktada ele alarak RvE1'in; hem T hücrelerinden bağımsız olarak dendritik hücrelerin olgunlaşmasına ve aktivasyonuna nasıl etki gösterdiğini hem de dendritik hücrelerin farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin de bulunduğu bir kültür ortamında Th17 farklılaşmasına olan etkisini araştırdık. Yaptığımız çalışma sonucunda resolvinin dendritik hücrelerin yukarıda ayrıntılı olarak anlatılan olgunlaşma basamaklarının en sonuncusunda etkili olduğu ve IL-6, IL-2 gibi güçlü pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını anlamlı ölçüde azalttığı aynı zamanda TGF β gibi anti-enflamatuvar görev üstlenen mediyatörün daha fazla salgılanmasını sağladığı bulunmuştur. Sepsis, vücutta görülen enfeksiyona karşı gelişen kontrolsüz enflamatuvar yanıttır; resolvinin deneysel sepsis oluşturulmuş fare modeli üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada RvD1 uygulanması sonucu önemli enflamatuvar markerlar arasında olan IL-6, TNF α , IL-1 β ve IFN γ oranı anlamlı derecede azalmıştır fakat buna ek olarak normalde artış göstermesi beklenen IL-10 seviyesi de bizim T hücre çalışmamızla paralel olacak şekilde anlamlı düşüş göstermiştir (44).

Çalışmamızda resolvinin salgılanan enflamatuvar sitokinleri baskılayan güçlü özelliğine karşı olgunlaşma ve aktifleşme sürecini başlatan farklılaşma faktörleri üzerine (CD80, CD84, CD40 ve MHC II) herhangi bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bu markerların PAM3CSK4 ile uyarılma sonucu artan seviyeleri RvE1 verilmesi

sonrasında çok az miktarda azalmıştır. RvD2'nin dendritik hücre olgunlaşması üzerine etkisinin incelendiği benzer bir çalışmada, elde edilen hücreler LPS ile uyarılmış ve RvD1 uygulanmıştır; sonucunda ise CD80 ve CD86 sentezinde anlamlı bir fark görülmezken MHC II sentezi bizim sonuçlarımızdan farklı olarak anlamlı derecede baskılanmıştır (99).

Bizim sonuçlarımızdan farklı bulguların bulunduğu bir çalışmada ise kanda bulunan monositlerden üretilen dendritik hücreler öncelikle EPA ve DHA varlığında 24 saat inkübe edilmiş daha sonra LPS ile 2 gün uyarılmıştır, sonucunda ise EPA ve DPA'nın dendritik hücrelerin olgunlaşmasını baskılayarak fenotipini değiştirdiği ve CD80, CD86 sentezlenmesini anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür(276). Kemik iliğinden elde edilen öncü dendritik hücrelerin kullanıldığı başka bir çalışmada; bir grup öncü hücre RvE1 varlığında dendritik hücreye farklılaştırılmış daha sonra resolvin bulunduğu/bulunmadığı ortamda LPS ile aktive edilmiştir, diğer grup ise RvE1 olmadan üretilmiş ve yine resolvin varlığında/yokluğunda LPS ile uyarılmıştır. Elde edilen sonuçlar; RvE1 varlığında üretilen hücrelere yine LPS ve RvE1 verilmesi sonucunda CD80,CD86 ve CD40 üretimi ile TNF_{α} ile IL-12p70 salgılanmasının azaldığını IL-10 üretiminin ise arttığını göstermektedir. Buna karşılık farklılaşması tamamlanan dendritik hücreler üzerinde resolvinin herhangi bir etkisine rastlanılmamıştır. Bu sonuçlar da bize öncü hücrelerden dendritik hücreler gelişirken uygulanan resolvinin etkili olduğu, farklılaşması tamamlandıktan sonra uygulanan RvE1'in ise etkili olmadığını göstermiştir (272). Bu da bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir çünkü dalaktan bizim elde ettiğimiz ve çalışmamızda kullandığımız dendritik hücreler kemik iliğindeki öncü hücrelerden gelişimini tamamlayan hücrelerdir ve anlatılan çalışmanın ikinci grubu ile benzerlik göstermektedirler. Yine benzer şekilde kandan elde edilen monositlerin doymamış yağ asitleri varlığında dendritik hücrelere farklılaştığı ortamda CD40, CD80, CD86 ve CD83 sentezi ile salgılanan IL-12p40 ve TNF_{α} seviyeleri azalmıştır (295).

Doğal ve kazanılmış bağışık yanıtı geniş bir pencereden baktığımız zaman resolvinin iki farklı şekilde etki gösterebileceğini görüyoruz; bunlardan ilki dendritik hücrelerin aktive olmasını ve olgunlaşmasını inhibe ederek ikincisi de T hücrelerine

antijen sunup yıkıcı karakterde olan T hücrelerinin aktifleşmesini önleyip Treg gibi anti-enflamatuvar karakterde olanların sentezlenmesini sağlayarak mümkün olmaktadır. Biz de RvE1'in dendritik hücrelerin aktifleşmesi esnasında yarattığı etkiyi gördükten sonra T hücrelerine antigen sunup farklılaşmalarını sağladıkları sırada nasıl fonksiyon göstereceklerini araştırmayı hedefledik. Bu amaçla dendritik hücreler ile farklılaşmamış T hücrelerini aynı anda PAM3CSK4 ile uyararak RvE1 varlığında ve yokluğunda Th17 hücrelerine farklılaşmasını inceledik. Bizim çalışmamıza benzer sayılabilecek bir araştırmada RvE1 varlığında farklılaşan dendritik hücrelerin önceden aktifleştirilmiş T hücreleri ile birlikte kültüre edilip tekrar uyarılmaları sonucunda sentezlenen IL-4, IL-17 ve IFN γ miktarlarına ek olarak TGF β ve IL-10 seviyelerini de azalttığı görülmüştür. Bu da Th1, Th17 ve Th2 hücrelerinin yanı sıra Treg hücre sentezini de azalttığını göstermektedir (272). Bizim sonuçlarımızda da RvE1 salgılanan IL-17 miktarını ve sentezlenen FoxP3 sentezini azaltmaktadır, yani hem Th17 hem de Treg hücrelerinin farklılaşmasını inhibe etmektedir.

Bizim çalışmamızda öncelikle kontrol amacı ile farklılaşmamış CD4⁺ T hücreleri PAM3CSK4 ile uyarılarak Th17 farklılaşması değerlendirilmiştir ve sonucunda sentezlenen IL-17, CCR6 ve ROR γ t artış göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarla TLR2'yi aktive eden PAM3CSK4'ün Th17 hücrelerinin sentezlenmesini sağladığı bilinmektedir (288). Bizim sonuçlarımızda da spesifik olarak TLR2 bakılmamış olsa da artan Th17 belirteçleri bunu doğrulamakta aynı zamanda yoğun olarak dendritik hücreler üzerinde bulundukları kabul edilen toll-like reseptörlerin etki alanlarının daha geniş olduğunu ve T hücreleri üzerinde de bulunduğunu göstermektedir. Bizim sonuçlarımızı destekleyecek şekilde yapılan çalışmalar TLR2'nin sadece Th17 hücreleri tarafından değil IL-17 üretmekten sorumlu diğer T hücreleri tarafından da sentezlendiğini göstermiştir (205). Aynı şekilde antigen sunan hücrelerden bağımsız olarak PAM3CSK4-TLR2 işbirliği ile CD8⁺ T hücrelerinin de aktifleştiği görülmüştür (216). Çalışmamızda daha sonra dendritik hücrelerin de dahil edilmesi ile IL-17, ROR γ ve CCR6 reseptör miktarlarında artış görölse de istatistik olarak anlamsızdır. Bu durum proliferasyon kapasitelerine ulaşan Th17 hücrelerinin daha fazla sentezlenememesi ile açıklanabildiği gibi dendritik hücrelerin buradaki fonksiyonunu da sorgulatmaktadır. RvE1 tedavisi ise her üç reseptörün sentezinde azalmaya neden olmasına karşın fark

anlamsızdır. Bu sonuçlar çalışmamızın ilk ayağını oluşturan IL-6/TGF β ile farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin Th17 hücrelerine sentezlendiği bölümle karşılaştırıldığı zaman RvE1'in ilk aşamada daha etkili olduğunu görmekteyiz.

RvE1'in farklılaşmamış T hücrelerinin IL-6/TGF β tarafından uyarılıp Th17 'ye farklılaşması esnasında hücre aktivitesini baskılayarak sonucunda CD25 sentezini azaltması üzerine dendritik hücrelerin uyardığı Th17 hücreleri üzerinde de benzer etkiyi yapıp yapmadığını test etmek için CD25 miktarına bakılmıştır; önceki sonuçlarımızla paralellik göstererek CD25 sentezi ve oluşan CD4⁺CD25⁺ T hücreleri anlamlı şekilde azalmıştır bu da bize RvE1'in hem poliklonal aktivasyonda hem de antijen bazlı aktivasyonda CD25 sentezini azalttığını göstermektedir fakat resolvin bu hücrelerin sentezlediği IL-17 ve ROR γ t reseptörleri üzerinde anlamlı etki yaratmamıştır.

5.3.2. *İn Vivo* Bulguların Tartışılması

Diyabetin patogenezinin temelinde insülinin salgısında bozukluk ile birlikte insüline karşı gelişen direnç olsa da, yapılan pek çok araştırma sürekli düşük dozda devam eden kronik enflamasyonun ve aktif doğal bağışıklığın da diyabet ile yakından ilişkilendirildiğini göstermektedir; bu da diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler pek çok komplikasyonunun açıklanmasına yardımcı olmaktadır. Enflamasyonun süreklilik göstermesi enflammatuvar markerların da artışını beraberinde getirmektedir; bu konuda en çok serum TNF α , IL-6 ve CRP gibi akut faz proteinler üzerinde durulmuş ve hepsinin diyabetli bireylerde sağlıklı olanlara kıyasla artış gösterdiği bulunmuştur (198). Obez veya T2D'i olan bireyler sağlıklı olanlara kıyasla sadece IL-6 seviyesindeki artış anlamlıdır buna karşın TNF α ve IL-10 düzeylerinin arasındaki farkın anlamsız olduğu vurgulanmıştır (207). Morbid obezite boyutunda olan kadınların adipoz dokularında normal kiloya sahip olanlara göre IL-6 ve IL-17'nin daha çok sentezlendiği görülmüştür (292). Diyabete bağlı nefropatisi olan bireyler olmayan diyabetiklere göre daha fazla CCL2, IL-18, IL-6 ve TNF salgılamaktadır (279). Burada diyabetin plazmadaki mevcut enflamatuvar mediyatörleri artırması, periodontal hastalığa yol açması veya mevcut

durumu şiddetlendirmesi arasındaki ilişkide kritik nokta diyabetli kişide glisemik kontrolün var olup olmadığıdır (158). Bunun dikkate alınmaması çalışmalarda farklı sonuçların çıkmasına neden olabilir.

Bizim sonuçlarımızda kontrol grupları içerisinde db/db olanlar ile db/db olmayanlar arasında IL-6 ve IL-1 β ile birlikte TGF β açısından fark anlamsızken IL-17A, IL-17F ile birlikte CCL20 en fazla db/db farelerin kontrol gruplarında sentezlenmiştir. Bu da bize diyabette Th17 hücrelerinin hem daha fazla sentezlendiğini hem de enflamatuvar bölgeye daha fazla göç ettiklerini göstermektedir fakat bu sentezlenme IL-6 veya IL-23 ile ilişkili değildir çünkü IL-6 gibi IL-23 de dört farklı tipteki farelerin kontrol grupları arasında arada anlamlı fark olmayacak şekilde hemen hemen aynı oranlarda sentezlenmiştir. Serumdan elde edilen plazmada daha fazla bulunan IL-17, db/db farelerin üst çene kesitlerinde daha fazla sentezlenmemiştir.

Bizim sonuçlarımıza paralel olarak diyabet ile yardımcı T17 hücrelerinin ilişkisinin incelendiği bir çalışmada diyabetin sonucu olarak gelişen nefropatinin şiddetlenmesi ile Th17 hücrelerinin arttığı, Treg hücrelerinin ise azaldığı bulunmuştur (296). Diyete bağlı obezite gelişen farelerde normal diyetle beslenenlere kıyasla üç kat daha fazla CD4⁺IL-17⁺ hücre sentezlendiği görülmüştür fakat bu etki sadece Th17 hücreleri ile sınırlı kalmıştır; FoxP3 (Treg), IFN γ (Th1) ve GATA-3 (Th2) sentezlerinde iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (278). Diyabeti olan bireylerden ileri yaşlarda olanlarda (>51) daha fazla IL-17 ve IL-21 sentezlendiği, daha genç yaştakilerde ise anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (179).

Diyabet ile artık altıncı komplikasyonu olarak kabul edilen periodontitis arasındaki ilişkinin temelinde enflamasyon bulunmaktadır. Diyabetli bireylerin bağışık sisteminde görülen değişiklikler periodontitisin görülme şiddetini ve yaygınlığını artırırken; periodontitisli bireylerde diş eti oluşu içerisinde bulunan bakteri ve ürünleri ile periodontitisin yol açtığı yüksek enflamatuvar mediatör salınımı diyabette görülen insulin direncinin nedenlerindendir. (187) Bizim çalışmamızda db/ERV1 ve db/db fare gruplarında oluşturulan deneysel periodontitis salgılanan IL-6 ile IL-1 β 'yı artırırken, TGF β 'yı azaltmıştır fakat IL-17F, IL-23, IL-17A ve CCL20 seviyeleri üzerinde etki göstermemiştir. Diyabeti kontrol altında olmayan bireylerin, kontrol altında olanlarla

kıyaslandığı zaman diş eti oluğu sıvısındaki IL-17 seviyesinin daha yüksek olsa da IL-23 ve TNF α seviyesinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (275). Başka bir çalışma plazmadaki IL-17 seviyesinin artmasının bireyin periodontal durumunun şiddetlenmesi, HbA1c seviyesi ve açlık kan şekerinin yükselmesi ile ilgili olduğu; cerrahi olmayan periodontal tedavinin de hem sistemik olarak sağlıklı hem de kontrol altında diyabeti olan bireylerin plazmadaki IL-17 seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (243). Buna karşılık kontrolsüz diyabetin şiddetlendirdiği periodontitis tükrükteki IL-17 salgısı üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı da görülmüştür (111). Bununla birlikte hem periodontitisi hem de diyabeti olan bireylerde yapılan cerrahi olmayan periodontal tedavinin periodontitisin klinik tablosunda iyileşme sağlasa da serumdaki enflamatuvar markerlar üzerinde etkisi olmadığı bulunmuştur (115).

Yaraların iyileşmesinde görülen gecikme de diyabette sık karşılaşılan problemler arasındadır, yara iyileşmesinin başarıya ulaşması için enflamasyonun kendi içerisinde tam olarak çözünmesi gerekmektedir ve biz artık enflamasyonun çözünmesinde gerekli olan lipid mediatörleri hakkında geniş bilgiye sahibiz. Diyabette yara iyileşmesinde görülen bu sorun lipid mediatörlerinin fonksiyonlarında bozukluk olabileceğini düşündürmektedir, bu amaçla yapılan bir hayvan çalışması diyabette görülen makrofajlardaki fonksiyon bozukluklarının yara bölgesindeki ölü hücrelerin temizlenmesini geciktirdiğini bunun da enflamasyonun uzamasına ve çözünme sürecinin başlayamamasına neden olduğunu göstermiştir (119). Glikokortikoidler tarafından düzenlenen bir protein olan ve anti-enflamatuvar özelliklerinin yanı sıra lipid mediatörleri ile benzer şekilde enflamasyonun çözünmesine katkı sağlayan Annexin A1'in enflamasyonun çözünmesindeki rolünü araştıran bir çalışmada, obez bireylerde seviyelerinin arttığını fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman enflamasyonun çözünmesinde yeterli etki gösteremedikleri bulunmuştur (199). RvE1'in diyabetteki nötrofil fagositozuna etkisinin bizim çalışmamızla benzer fare modellerinin kullanılarak incelendiği bir çalışmada, deneysel olarak RvE1 reseptörünün ekstra olarak sentezlendiği farelerde nötrofillerin *P. gingivalis* fagositoz yapma ve öldürme kapasitelerinin arttığı bulunmuştur. *In vivo* olarak da önceden karın bölgesine enjekte edilen RvE1'in *P. gingivalis*in bölgeye akışını önlediği bulunmuştur(92). *P. gingivalis*, en önemli periodontopatojenler arasında kabul edilmektedir, RvE1'in bu bakteri

üzerindeki etkisi diyabet ve periodontitis arasındaki karşılıklı ilişkide RvE1'nin nötrofiller üzerinden etkili olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamız RvE1'in diyabet ve periodontitis üzerindeki etkisini Th17 hücreleri üzerinden inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda RvE1 uygulanan transjenik ve double transgenic farelerde IL-6 ve IL-1 β sentezinde azalma görülen azalma IL-17A, IL-23, CCL20 ve IL-17F gibi Th17 ailesi elemanları üzerinde görülmemiştir.

5.3.3. Hücreler Üzerinde RvE1 Reseptörü ChemR23 Sentezi

RvE1, hücre yüzeyinde bulunan reseptör aracılığı ile fonksiyon göstermektedir, dendritik hücreler ile monositlerin üzerinde bulunduğu bilinen chemR23 ve nötrofillerin üzerindeki BLT1, RvE1 reseptörü olarak görev yapmaktadır (17). *In vivo* olarak RvE1'in Th17 ailesindeki sitokin düzeyleri üzerine etki etmemesi bize hücreler üzerinde spesifik resolvin reseptörü olup olmadığını sorgulatmıştır. Her iki reseptörün spesifik olarak T hücreleri üzerinde sentezlenip sentezlenmediğine dair literatürde kesin bir bilgi olmasa da *in vitro* olarak bunu test etmek amacı ile yaptığımız çalışma sonunda farklılaşmamış T hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaştığı, dendritik hücrelerin aktive edildiği ve son olarak da T hücrelerini uyardığı üç farklı kültür ortamında da ayrı ayrı olarak chemR23 sentezi gerçekleştiğini görüyoruz. Aynı zamanda bu hücreler antijenle veya proliferatif ajanlarla uyarıldığı ve RvE1 ilave edildiği zaman chemR23 seviyesi artış göstermektedir. Sadece T hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında reseptörün sentezi artış gösterse de dendritik hücrelerin tek başına veya T hücreleri ile birlikte olduğu durumlarda görülen artış daha fazladır, bu da bize dendritik hücrelerde chemR23 reseptörünün daha fazla sentezlendiğini düşündürmektedir. Aynı şekilde *in vivo* çalışmamızın sonuçlarında RvE1, miktarlarını azalttığı IL-6 ve IL-1 β 'nin esas kaynağı dendritik hücrelerdir. D grubu resolvin reseptörleri GPR32 ve ALX/FPR2'nin T hücreleri üzerinde sentezinin incelendiği bir çalışma, GPR32'nin Th1, iTreg ve Th17 hücreleri üzerinde sentezlendiğini fakat Th2 üzerinde sentezlenmediğini göstermiştir. ALX/FPR2 için ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (45).

SONUÇLAR

1. RvE1, CD25 reseptör sentezini azaltarak T hücre aktivitesini baskılamaktadır.
2. RvE1, IL-17 ve ROR γ t sentezini azaltarak farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşümünü azaltmaktadır.
3. RvE1, CCR6 sentezi ve CCL20 salgısını azaltarak Th17 hücrelerinin kemoattraktivitesini önlemektedir.
4. Farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerinin IL-6/TGF β varlığında Th17'ye farklılaşması esnasında uygulanan RvE1; IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-10 ve IL-2 salgısını azaltmaktadır.
5. Dendritik hücrelerin aktivasyonu sırasında uygulanan RvE1, sentezlenen CD86, CD80, MHC II ve CD40 reseptörleri üzerine etkisi bulunmamaktadır.
6. Dendritik hücrelerin aktivasyonu sırasında uygulanan RvE1, hücrelerin salgıladığı IL-6, IL-2 seviyelerini azaltmış, TGF β seviyelerini artırmıştır.
7. Farklılaşmamış CD4⁺ T hücreleri CD11c⁺ dendritik hücreleri ile PAM3CSK4 varlığında uyarıldığı zaman Th17 hücrelerine farklılaşmaktadır.
8. Dendritik hücreler tarafından uyarılıp farklılaşan Th17 hücrelerine uygulanan RvE1 T hücrelerinin daha az CD25 reseptörü sentezlemelerine ve aktivitelerinin azalmasına neden olmuştur.
9. RvE1 dendritik hücrelerin farklılaşmamış CD4⁺ T hücrelerini uyarması ve Th17'ye dönüştürmesi esnasında daha az IL-17A salgılanmasını sağlamıştır.
10. Th17 hücrelerine ek olarak RvE1, IL-2 sitokin salınımı ile birlikte FoxP3 sentezini de azaltmaktadır, Treg hücre popülasyonunun da resolvin tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir.
11. Diyabetik fareler diyabetik olmayan farelere kontrol grubunda daha fazla pro-enflamatuvar sitokin sentezlemektedir.
12. Ligatürle deneysel periodontitis oluşturulduğu zaman salgılanan pro-enflamatuvar sitokin düzeylerinde anlamlı bir artış olmamıştır.

13. RvE1, diyabetik farelerde salgılanan IL-6 ve IL-1 β seviyelerini azaltmıştır fakat elde edilen üst çene kesitlerinin histolojik analizinde IL-2 ve IL-17 hücreleri üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.



KAYNAKLAR

- 1) Abbas, A.K. 2003. The control of T cell activation vs. tolerance. *Auto- immun. Rev.* 2, 115–118.
- 2) Abbas, A.K., Trotta, E., R. Simeonov, D., Marson, A., Bluestone, J.A., 2018. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.* 3, eaat1482. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>
- 3) Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996 Oct; 383 (6603); 787-93
- 4) Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2007. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 8, 942–949. <https://doi.org/10.1038/ni1496>
- 5) Adibrad, M., Deyhimi, P., Ganjalikhani Hakemi, M., Behfarnia, P., Shahabuei, M., Rafiee, L., 2012. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J. Periodontal Res.* 47, 525–531. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01464.x>
- 6) Afzali, B., Mitchell, P., Lechler, R.I., John, S., Lombardi, G., 2010. Translational mini-review series on Th17 cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 159, 120–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04038.x>
- 7) Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., De Sauvage, F.J., Gurney, A.L., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910–1914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207577200>
- 8) Al-awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., Varga, C., 2016. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res.* 2016;2016: 9051426 <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>

- 9) American Academy of Periodontology task force report on the up-date to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol.* 2015;86:835–838.
- 10) Anderson, P., Delgado, M., 2008. Endogenous anti-inflammatory neuropeptides and pro-resolving lipid mediators: A new therapeutic approach for immune disorders. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1830–1847. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00387.x>
- 11) Andriankaja, S.P. Barros, K. Moss, F.S. Panagakos, F.S., DeVizio, W., Beck J., Offenbacher, S., 2009. Levels of serum interleukin (IL)-6 and gingival crevicular fluid of IL-1 β and Prostaglandin E₂ among non-smoking subjects with gingivitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2009; 80; 307–316. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080385>
- 12) Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., et al. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204:1849-1861.
- 13) Anderton, S.M. and Fillatreau, S., 2008. Activated B cells in autoimmune diseases : the case for a regulatory role. *Nature Clinical Practice* December 2008, Vol; 4, No; 12 <https://doi.org/10.1038/ncprheum0950>
- 14) Aoyagi, T., Yamazaki, K., Nakajima, T., Yamashita, N., Yoshie, H., 2000. Elevated CTLA-4 expression on CD4 T cells from periodontitis patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 280–286.
- 15) Aren, G., Sepet, E., Ozdemir, D., Dinççag, N., Guvener, B., Firatli, E., 2003. Periodontal health, salivary status and metabolic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Periodontol* 2003;74:1789- 1795.
- 16) Ariel, L.P., Wang, W., Tang, W.X., Fredman, G., Hong, S., Gotlinger, K.H., Serhan, C.N., 2005. The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering. *The Journal of biological chemistry.* 2005; 280:43079–43086. [PubMed: 16216871]

- 17) Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N.A., Serhan, C.N., 2005. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 201, 713–722. <https://doi.org/10.1084/jem.20042031>
- 18) Armitage, G., 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
- 19) Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood Monocytes : Development , Heterogeneity , and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27; 669-92 <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- 20) Bajenoff, M., Glaichenhaus, N., Germain, R. N., 2008. Fibroblastic Reticular Cells Guide T Lymphocyte Entry Into and Migration Within the Splenic T Cell Zone. *J Immunol* 2008 Sep 15;181(6):3947-54
- 21) Banchereau, J. and Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 Mar 19;392(6673):245-52
- 22) Bandyopadhyay, D., Marlow, N.M., Fernandes, J.K., Leite, R.S., 2010. Periodontal disease progression and glycaemic control among Gullah African Americans with type-2 diabetes. *J. Clin. Periodontol.* 37, 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01564.x>
- 23) Bannenberg, G., Moussignac, R.L., Gronert, K., Devchand, P.R., Schmidt, B.A., Guilford, W.J. et al., 2004. Lipoxins and novel 15-epi-lipoxin analogs display potent anti-inflammatory actions after oral administration. *Br. J. Pharmacol.* 143, 43–52. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705912>
- 24) Bannenberg, G., Serhan, C.N., 2010. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 1260–1273. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.08.002>
- 25) Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C.J., Christensen, J., O'Garra, A., Stockinger, B., 2005. CD25+CD4+T cells compete with naive CD4+T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int. Immunol.* 17, 279–288. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh207>

- 26) Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., Ghilardi, N., 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* 7, 929–936. <https://doi.org/10.1038/ni1375>
- 27) Bedoya, S.K., Wilson, T.D., Collins, E.L., Lau, K., Larkin, J., 2013. Isolation and Th17 Differentiation of Native CD4 T Lymphocytes. *J. Vis. Exp.* 2013 Sep 26;(79):e50765. <https://doi.org/10.3791/50765>
- 28) Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., Hafler, D.A., 2009. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113, 4240–4249. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-183251>
- 29) Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- 30) Beyersdorf, N., Kerkau, T., Hünig, T., 2015. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets Ther.* 4, 111–22. <https://doi.org/10.2147/ITT.S61647>
- 31) Boyman, O. and Sprent, J., 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- 32) Brett, J., et al. 1993. Tissue distribution of the receptor for advanced glycation end products (RAGE): expression in smooth muscle, cardiac myocytes, and neural tissue in addition to the vasculature. *Am. J. Pathol.* 143:1699–1712
- 33) Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A., Hofer, T., 2010. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3058–3063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812851107>

- 34) Cao, W., Lee, S.H., Lu, J., 2005. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem. J.* 385, 85–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20040741>
- 35) Cao, Y., Afroz, R., Kamato, D., Gray, S., Little, P.J., 2017. ScienceDirect Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 89, 1242–1251. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.010>
- 36) Cardoso, C.R., Garlet, G.P., Moreira, A.P., Junior, W.M., Rossi, M.A., Silva, J.S., 2008. Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J. Leukoc. Biol.* 84, 311–318. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108014>
- 37) Cardoso, C.R., Garlet, G.P., Crippa, G.E., Rosa, A.L., Júnior, W.M., Rossi, M.A., Silva, J.S., 2009. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* 24, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00463.x>
- 38) Carrion, J., Scisci, E., Miles, B., Gregory, J., Zeituni, A.E., Gu, Y., Bear, A., Caroline, A., Brown, D.L., Cutler, C.W., Gu, Y., Bear, A., Genco, C.A., Brown, D.L., 2015. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J Immunol.* 2012 Sep 15;189(6):3178-87 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
- 39) Chabaud, M., Lubberts, E., Joosten, L., Van Den Berg, W., Miossec, P., 2001. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 3, 168–177. <https://doi.org/10.1186/ar294>
- 40) Chang, K.K., Liu, L.B., Jin, L.P., Zhang, B., Mei, J., Li, H., Wei, C.Y., Zhou, W.J., Zhu, X.Y., Shao, J., Li, D.J., Li, M.Q., 2017. IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR α /Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. *Cell Death Dis.* 2017 Mar 16;8(3):e2666. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.95>

- 41) Chapple, I.L.C., Mealey, B.L., Van Dyke, T.E., Bartold, P.M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M.L., Genco, R.J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T.J., Holmstrup, P., Johnson, G.K., Kapila, Y., Lang, N.P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G.A., Shapira, L., Tatakis, D.N., Teughels, W., Trombelli, L., Walter, C., Wimmer, G., Xenoudi, P., Yoshie, H., 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* 45, S68–S77. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>
- 42) Chavvay, N.G., Vettore, M.,V., Sansone, C., Shelham, A., 2009. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease; a meta-analsis. *Oral Health Prev Dent.* 2009;7(2);107-27
- 43) Chen, Y., Haines, C.J., Gutter, I., Hochweller, K., Blumenschein, W.M., McClanahan, T., Hämmerling, G., Li, M.O., Cua, D.J., McGeachy, M.J., 2011. Foxp3+ regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. *Immunity* 34, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.011>
- 44) Chen, F., Fan, X.H., Wu, Y.P., Zhu, J.L., Wang, F., Bo, L.L., Li, J.B., Bao, R., Deng, X.M., 2014. Resolvin D1 improves survival in experimental sepsis through reducing bacterial load and preventing excessive activation of inflammatory response. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 457–464. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1978-6>
- 45) Chiurchiù, V., Leuti, A.,Dalli, J., Jacobsson, A.,Battistini, L., Maccarrone, M. and Serhan, C., 2016. Pro-resolving lipid mediators Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med.* 2016 August 24; 8(353): 353ra111. doi:10.1126/scitranslmed.aaf7483.
- 46) Chiurchiù, V., Leuti, A., Saracini, S., Fontana, D., Finamore, P., Giua, R., Padovini, L., Incalzi, R.A., Maccarrone, M., 2018. Resolution of inflammation is altered in chronic heart failure and entails a dysfunctional responsiveness of T lymphocytes. *FASEB J.* fj201801017R. <https://doi.org/10.1096/fj.201801017R>

- 47) Christen, U., Von Herrath, M.G., 2004. Manipulating the type 1 vs type 2 balance in type 1 diabetes. *Immunol. Res.* 30, 309–325. <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:309>
- 48) Chung, Y., Chang, S.H., Martinez, G.J., Yang, X.O., Nurieva, R., Kang, H.S., Ma, L., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., Dong, C., 2009. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 30, 576–587. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>
- 49) Collin, M., 2018. Human dendritic cell subsets : an update *Immunology* 2018 May;154(1):3-20. doi: 10.1111/imm.12888.
- 50) Coventry, B., Heinzel, S., 2004. CD1a in human cancers : a new role for an old molecule *TRENDS in Immunology* Vol; 25 No:5. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.002>
- 51) Cua, D.J., Stohlman, S.A., 1997. In vivo effects of T helper cell type 2 cytokines on macrophage antigen-presenting cell induction of T helper subsets. *J Immunol* 1997: 159: 5834– 5840.
- 52) Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744–748. <https://doi.org/10.1038/nature01355>
- 53) Cua, D.J., Tato, C.M., 2010. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479–489. <https://doi.org/10.1038/nri2800>
- 54) Cury, P.R., Carmo, J.P., Horewicz, V. V., Santos, J.N., Barbuto, J.A., 2013. Altered phenotype and function of dendritic cells in individuals with chronic periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 58, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.03.013>
- 55) Curtsinger, J. M., Schmidt, C. S., Mondino, A., Lins, D. C., Kedl, R. M., Jenkins, M. K., et al., 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 162, 3256–3262.

- 56) Cutler, C.W. and Tang, Y. A., 2007. Oral mucosal dendritic cells and periodontitis: Many sides of the same coin with new twist. *Periodontol 2000*. 2007; 45: 35–50. doi:10.1111/j.1600-0757.2007.00222.x
- 57) de Pommereau, V., Dargent-Pare, C., Robert, J.J., Brion, M., 1992. Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. *J Clin Periodontol* 1992;19:628-632.
- 58) Danilova, N., 2012. Chapter 13: The evolution of adaptive immunity. *Self Nonself* 218–235.
- 59) Darveau, R.P., 2010. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat.Rev. Microbiol.* 8, 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- 60) Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D., Ayyoub, M., 2009. IL-1 β and IL-2 convert human Treg into TH17 cells. *Clin. Immunol.* 131, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.12.008>
- 61) Doğan, B., Antinheimo, J., Cetiner, D., Bodur, A., Emingil, G., Buduneli, E., Uygur, C., Firatli, E., Lakio, L., Asikainen, S., 2003. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74:803-814.
- 62) Dzink, J.L., Socransky, S.S., Haffajee, A.D., 1988. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J CLin Periodontol* 1988;15:316-323
- 63) Ebersole, J.L., Taubman, M.A., 1994. The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5: 112–141.
- 64) El-Awady, A., R., Arce, R., 2015. Dendritic cells: microbial clearance via autophagy and potential immunobiological consequences for periodontal disease. *Periodontology 2000*, Vol. 69, 2015, 160–180.
- 65) Engebretson, S.P., Hey-hadavi, J., Ehrhardt, F.J., Hsu, D., Celenti, R.S., Grbic, J.T., Lamster, I.B., 2004. of Interleukin-1 β and Glycemic Control and Type 2 Diabetes 1203–1208.

- 66) Firatli, E., Unal, T., Saka, N., Onan, U., Sivas, A., Oz, H., 1994. Serum fructosamine correlates with gingival index in children with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *J Clin Periodontol* 1994 Sep;21(8):565-8.
- 67) Firatli, E., Yilmaz, O., Onan, U., 1996. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. *J CLinPeriodontol* 1996 Apr;23(4):362-6.
- 68) Firatli, E., 1997. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol* 1997; 68; 136-140
- 69) Forlow, S.B., Schurr, J.R., Kolls, J.K., Bagby, G.J., Schwarzenberger, P.O., Ley, K., 2001. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood*. 2001; 98:3309–3314. [PubMed: 11719368]
- 70) Fossiez, F., Djossou, O., Chornarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, et al, 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996 Jun 1; 183(6); 2593-603
- 71) Frauwirth, K. a, Thompson, C.B., 2002. Lymphocyte signal transduction Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Cancer Res*. 109, 295–299. <https://doi.org/10.1172/JCI200214941>. Mounting
- 72) Fujihashi, K., Yamamoto, M., Hiroi, T., Bamberg, T. V, McGhee, J.R., Kiyono, H., 1996. Selected Th1 and Th2 cytokine mRNA expression by CD4(+) T cells isolated from inflamed human gingival tissues. *Clin. Exp. Immunol*. 103, 422–8.
- 73) Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., Steinman, R.M., 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med*. 199, 1607–1618. <https://doi.org/10.1084/jem.20040317>

- 74) Funaki, Y., Hasegawa, Y., Okazaki, R., Yamasaki, A., Sueda, Y., Yamamoto, A., Yanai, M., Fukushima, T., Harada, T., Makino, H., Shimizu, E., 2018. Resolvin E1 inhibits osteoclastogenesis and bone resorption by suppressing IL-17-induced RANKL expression in osteoblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation. *Yonago Acta Med.* 61, 8–18.
- 75) Gallin, J.I., Snyderman, R., Fearon, D.T., Haynes, B.F. & Nathan, C. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999).
- 76) Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D.H., 1998. THE INTERLEUKIN-12/INTERLEUKIN-12-RECEPTOR SYSTEM: Role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 495–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.495>
- 77) Gemmell, E. and Seymour, G.J., 2004. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol.* 2000 35, 21–41. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6713.2004.003557.x>
- 78) Genco, R.J., Grossi, S.G., Ho, A., Nishimura, F., Murayama, Y., 2005. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infection. *J Periodontol* 2005;76:2075-2084.
- 79) Gomes, T., Lourenço, B., Heller, D., Silva-boghossian, C.M., Cotton, S.L., Paster, B.J., Colombo, A., 2015. Microbial Signature Profiles of Periodontally Healthy and Diseased Patients. *J Clin Periodontol.* 2014 November; 41(11): 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>.Microbial
- 80) Gonzales, J.R., 2015. T- and B-cell subsets in periodontitis. *Periodontol.* 2000 69, 181–200. <https://doi.org/10.1111/prd.12090>
- 81) Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2, 882–888. <https://doi.org/10.1038/ni0901-882>

- 82) Graves, D., 2008. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J. Periodontol.* 79, 1585–1591. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080183>
- 83) Hajishengallis, G. and Chavakis, T., 2013. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. *Trends Immunol.* 34, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.003>
- 84) Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4+effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123–1132. <https://doi.org/10.1038/ni1254>
- 85) Hasturk, H., Kantarci, A., Goguet-Surmenian, E., Blackwood, A., Andry, C., Serhan, C.N., Van Dyke, T.E., 2007. Resolvin E1 Regulates Inflammation at the Cellular and Tissue Level and Restores Tissue Homeostasis In Vivo. *J. Immunol.* 179, 7021–7029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7021>
- 86) Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., Petasis, N.A., Levy, B.D., Serhan, C.N., Van Dyke, T.E., 2006. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J.* 20, 401–403. <https://doi.org/10.1109/PROC.1968.6665>
- 87) Hasturk, H., Kantarci, A., 2015. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontol 2000.* 2015 October; 69(1): 255–273. doi:10.1111/prd.12105.
- 88) He, H., Liu, R., Desta, T., Leone, C., Gerstenfeld, L.C., Graves, D.T., 2004. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 145, 447–452. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1239>
- 89) Hemont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., Josien, R., 2013. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol* 2013: 93: 599–609.

- 90) Hennes, S., Johnson, C.K., Ge, Q., Armour, C.L., Hughes, J.M., Ammit, A.J., 2004. IL-17A augments TNF- α -induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.06.023>
- 91) Herder, C., Zierer, A., Koenig, W., Roden, M., Meisinger, C., Thorand, B., 2009. Transforming Growth Factor- β 1 and incident Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 32:1921–1923, 2009
- 92) Herrera, B.S., Hasturk, H., Kantarci, A., Freire, M.O., Nguyen, O., Kansal, S., van Dyke, T.E., 2015. Impact of resolvin E1 on murine neutrophil phagocytosis in type 2 diabetes. *Infect. Immun.* 83, 792–801. <https://doi.org/10.1128/IAI.02444-14>
- 93) Herrera, B.S., Ohira, T., Gao, L., Omori, K., Yang, R., Zhu, M., Muscara, M.N., Serhan, C.N., Van Dyke, T.E., Gyurko, R., 2008. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br. J. Pharmacol.* 155, 1214–1223. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.367>
- 94) Hilly, O., Rath-wolfson, L., Koren, R., Mizrachi, A., Hamzany, Y., Bachar, G., Shpitzer, T., 2015. Pathology – Research and Practice CD1a-positive dendritic cell density predicts disease-free survival in papillary thyroid carcinoma. *Pathol. -- Res. Pract.* 211, 652–656. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.05.009>
- 95) Honorati, M.C., Neri, S., Cattini, L., Facchini, A., 2006. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.10.004>
- 96) Hsiao, H.M., Thatcher, T.H., Colas, R.A., Serhan, C.N., Phipps, R.P., Sime, P.J., 2015. Resolvin D1 reduces emphysema and chronic inflammation. *Am. J. Pathol.* 185, 3189–3201. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.008>
- 97) Hsu, H.C., Yang, P.A., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., et al, 2008. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat. Immunol.* 9, 166–175. <https://doi.org/10.1038/ni1552>

- 98) Hu, W., Jain, A., Gao, Y., Dozmorov, I.M., Mandraju, R., Wakeland, E.K., Pasare, C., 2015. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 13994–13999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510760112>
- 99) Hua, J., Jin, Y., Chen, Y., Inomata, T., Lee, H.S., Chauhan, S.K., Petasis, N.A., Serhan, C.N., Dana, R., 2014. The resolvin D1 analogue controls maturation of dendritic cells and suppresses alloimmunity in corneal transplantation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 5944–5951. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14356>
- 100) Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., Jonuleit, H., 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front. Immunol.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00082>
- 101) Hunter, C.A., 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 521–531. <https://doi.org/10.1038/nri1648>
- 102) Ikeda, K., Nakajima, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Suto, A., De, W., Saito, Y., Iwamoto, I., 2011. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc ϵ RI-mediated activation Brief report Mast cells produce interleukin-25 upon Fc ϵ RI-mediated activation. *Blood*. 2003; 101, 3594–3596. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2817>
- 103) Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165:6107–6115.
- 104) Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., Littman, D.R., 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+T helper cells. *Cell* 126, 1121–1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- 105) Iwakura, Y. and Ishigame, H., 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116:1218–1222 (2006). doi:10.1172/JCI28508
- 106) Iwasaki, B.A. and Kelsall, B.L., 1999. Cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 190.

- 107) Jagannathan-Bogdan, M., McDonnell, M.E., Shin, H., Rehman, Q., Hasturk, H., Apovian, C., M., Nikolajczyk, B.,S., 2011. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol.* 2011 Jan 15;186(2):1162-72. doi: 10.4049/jimmunol.1002615
- 108) Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2005. The components of the immune system. *Immunobiol. immune Syst. Heal. Dis.* 1–35. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511575266.001>
- 109) Janket, S.J., Wightman, A., Baird, A.E., Van Dyke, T.E., Jones, J.A., 2005. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J. Dent. Res.* 84, 1154–1159. <https://doi.org/10.1177/154405910508401212>
- 110) Jotwani, R., Palucka, A.K., Al-quotub, M., Nouri-shirazi, M., Kim, J., Bell, D., et al., 2017. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: In Situ, In Vivo, and In Vitro Studies. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8); 4693-7000<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4693>
- 111) Kahraman, U., Yildiz, S., An, D.O.G., 2015. Salivary interleukin-17 and tumor necrosis factor- α in relation to periodontitis and glycemic status in type 2 diabetes mellitus *J Diabetes* 2015 Sep;7(5); 681–688. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12228>
- 112) Kamali, A.N., Noorbakhsh, S.M., Hamedifar, H., Jadidi-Niaragh, F., Yazdani, R., Bautista, J.M., Azizi, G., 2019. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Mol. Immunol.* 105, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.11.015>
- 113) Kandyala, R., Raghavendra, S.P., Rajasekharan, S.T. 2010. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2010 Jan-Jun; 14(1): 1-5.
- 114) Kantarci, A., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., 2006. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 40, 144–163. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00145.x>

- 115) Kara, G., Cifcibasi, E., Karsidag, K., Cintan, S., 2015. Short term effects of periodontal therapy on inflammatory markers in patients with type-2 diabetes. *Saudi Med J.* 2015 Apr; 36(4); 36(4), 469–476. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.4.10380>
- 116) Katsikis, P.D., Cohen, S.B., Londei, M., Feldmann, M. 1995. Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immunol* 1995: 7: 1287–1294.
- 117) Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N.Y., et al., 2006. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol.* 169, 987–998. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060180>
- 118) Kebschull, M., Demmer, R.T., Papapanou, P.N., 2010. “Gum bug, leave my heart alone!”-epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J. Dent. Res.* 89, 879–902. <https://doi.org/10.1177/0022034510375281>
- 119) Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., et al., 2010. *PLOS One.* 2010 Mar 4;5(3);e9539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009539>
- 120) Kim, H.S., Jang, S.W., Lee, W., Kim, K., Sohn, H., Hwang, S.S., Lee, G.R., 2017. PTEN drives Th17 cell differentiation by preventing IL-2 production. *J. Exp. Med.* 2017 Nov 6;214(11):3381-3398. <https://doi.org/10.1084/jem.20170523>
- 121) Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., Papapanou, P.N., 2017. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 1–14. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- 122) Kiran, M., Arpak, N., Ünsal, E., Erdoğan, M.F., 2005. The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Periodontol.* 32, 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00658.x>

- 123) Koenders, M.I., Lubberts, E., Oppers-Walgreen, B., Van Den Bersselaar, L., Helsen, M.M., Di Padova, F.E., Boots, A.M.H., Gram, H., Joosten, L.A.B., Van Den Berg, W.B., 2005. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am. J. Pathol.* 167, 141–149. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62961-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62961-6)
- 124) Koenen, H.J.P.M., Smeets, R. L., Vink, P.M. Rijssen, E. Boots, A.M.H., Joosten, I. 2008. Human CD25^{high} Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17–producing cells. *Blood*, 2008 Volume 112, Number 6
- 125) Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S., 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000. 1997;14:33–53
- 126) Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-su, K., et al., 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest.* 2002 Jan; 109, 131–140. <https://doi.org/10.1172/JCI200213605>. Introduction
- 127) Kryczek, I., Wei, S., Vatan, L., Escara-Wilke, J., Szeliga, W., Keller, E.T., Zou. W., 2007. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17⁺ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol* 2007;179:1423–1426. [PubMed: 17641006]
- 128) Lalla, E., Lamster, I.B., Feit, M., Huang, L., Spessot, A., Qu, W., Kislinger, T., Lu, Y., Stern, D.M., Schmidt, A.M., 2000. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1117–1124. <https://doi.org/10.1172/JCI8942>
- 129) Lappin, D.F., Macleod, C.P., Kerr, A., Mitchell, T., Kinane, D.F., 2001. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 294–300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01448.x>

- 130) Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., et al., 2007. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 26, 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
- 131) Leal Rojas, I.M., Mok, W.H., Pearson, F.E., Minoda, Y., Kenna, T.J., Barnard, R.T., Radford, K.J., 2017. Human blood cD1c+dendritic cells promote Th1 and Th17 effector function in memory cD4+T cells. *Front. Immunol.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00971>
- 132) Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., Boyman, O., 2009. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.011>
- 133) Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., Serhan, C.N., 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2, 612–619. <https://doi.org/10.1038/89759>
- 134) Li, J., Chen, S., Xiao, X., Zhao, Y., Ding, W., Li, X.C., 2017. IL-9 and Th9 cells in health and diseases-From tolerance to immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017 Oct; 37; 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.07.004>.IL-9
- 135) Li, M.O., Sanjabi, S., Flavell, R.A., 2006. Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms. *Immunity* 25, 455–471. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.01>
- 136) Liang, S.C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L.A., 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203, 2271–2279. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>
- 137) Liao, F., Rabin, L.R., Smith, C.S. Sharma, G., Nutman, T.B., Farber, J., 1999.CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 α . *J. Immunol.* 162, 186–194

- 138) Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Li, P., Leonard, W.J., 2011. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat. Immunol.* 12, 551–559. <https://doi.org/10.1038/ni.2030>
- 139) Lim, T.S., Goh, J.K.H., Mortellaro, A., Lim, C.T., Hämmerling, G.J., Ricciardi-Castagnoli, P., 2012. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-Cells. *PLoS One* 7, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045185>
- 140) Littman, D.R., Rudensky, A.Y., 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845–858. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.021>
- 141) Liu, R., Desta, T., He, H., Graves, D.T., 2004. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology* 145, 2997–3003. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1601>
- 142) Liu, Y.J., 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259–262. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00456-1)
- 143) Lowes, M.A., Bowcock, A.M., Krueger, J.G., 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866–873. <https://doi.org/10.1038/nature05663>
- 144) Loe, H., 1993. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1993 Jan; 16(1); 329-34
- 145) Lu, H., Kraut, D., Gerstenfeld, L.C., Graves, D.T., 2003. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 144, 346–352. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220072>
- 146) Lubberts, E., 2008. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 41, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.014>

- 147) Chabaud, M., Miossec, P., 2001. The combination of tumor necrosis factor α blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model. *Arthritis Rheum.* 44, 1293–1303. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1293::AID-ART221>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1293::AID-ART221>3.0.CO;2-T)
- 148) MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N.J., 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512–4520. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-11-0097>
- 149) Maekawa, T., Hosur, K., Abe, T., Kantarci, A., Ziogas, A., Wang, B., Van Dyke, T.E., Chavakis, T., Hajishengallis, G., 2015. Antagonistic effects of IL-17 and D-resolvins on endothelial Del-1 expression through a GSK-3 β -CEBP β pathway. *Nat. Commun.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9272>
- 150) Malek, T.R., 2003. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 961–965.
- 151) Malek, T.R., 2008. The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 453–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357>
- 152) Manhart, S.S., Reinhardt, R., Payne, J.B., Gemmell, E., Dyer, J.K., Petro, T.M., Seymour, G.J., 1994. Gingival cell IL-2 and IL-4 in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65;807-813.
- 153) Manouchehr-Pour, M., Spagnuolo, P.J., Rodman, H.M., Bissada, N.F., 1981. Comparison of Neutrophil Chemotactic Response in Diabetic Patients With Mild and Severe Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 52, 410–415. <https://doi.org/10.1902/jop.1981.52.8.410>
- 154) Marie, J.C., Liggitt, D., Rudensky, A.Y., 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor. *Immunity* 25, 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.012>

- 155) Maynard, C.L., Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y., Weaver, C.T., 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat. Immunol.* 8, 931–941. <https://doi.org/10.1038/ni1504>
- 156) McAleer, J.P., Kolls, J.K., 2011. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J. Leukoc. Biol.* 90, 263–270. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211099>
- 157) McMullen, J.A., Dyke, T.E. Van, Horoszewicz, H.U., Genco, R.J., 1981. Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. *J. Periodontol.* 52, 167–173. <https://doi.org/10.1902/jop.1981.52.4.167>
- 158) Mealey, B.L. and Oates, T.W., 2006. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289- 1303.
- 159) Mebius, R.E. and Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- 160) Mellman, I., Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells; Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, Vol. 106, 255–258. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00449-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00449-4)
- 161) Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage : ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed Setting. *Annu Rev Immunol.* 2012; 31;563-604 <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- 162) Meyle, J. and Chapple, I., 2015. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.* 2000 69, 7–17. <https://doi.org/10.1111/prd.12104>
- 163) Michel, M.-L., Keller, A.C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P.B., Wong, C.-H., Schneider, E., Dy, M., Leite-de-Moraes, M.C., 2007. Identification of an IL-17–producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 204, 995–1001. <https://doi.org/10.1084/jem.20061551>

- 164) Miossec, P. and Kolls, J.K., 2012. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 763–776. <https://doi.org/10.1038/nrd3794>
- 165) Mirshafiey, P.A., 2016. The potential role of T Helper Cell 22 and IL-22 Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Innov Clin Neurosci.* 2016; 13(7-8): 30–36.
- 166) Mitchell, T.J., John, S., 2005. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* 114, 301–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02091.x>
- 167) Miyasaka, M., Tanaka, T., 2004. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: Dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 360–370. <https://doi.org/10.1038/nri1354>
- 168) Mizraji, G., Heyman, O., Van Dyke, T.E., Wilensky, A., 2018. Resolvin D2 restrains Th1 immunity and prevents alveolar bone loss in murine periodontitis. *Front. Immunol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00785>
- 169) Moore, W.E. and Moore, L.V., 1994. The bacteria of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1994 Jun;5:66-77.
- 170) Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin -10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.68>
- 171) Moran, E.M., Heydrich, R., Ng, C.T., Saber, T.P., McCormick, J., Sieper, J., Appel, H., Fearon, U., Veale, D.J., 2011. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024048>
- 172) Mosmann, T.R. and Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 Cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>

- 173) Moutsopoulos, N.M., Kling, H.M., Angelov, N., Jin, W., Palmer, R.J., Nares, S., Osorio, M., Wahl, S.M., 2012. Porphyromonas gingivalis promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. J. Autoimmun. 39, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.03.003>
- 174) Mrabet-Dahbi, S., Metz, M., Dudeck, A., Zuberbier, T., Maure, M., 2009. Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands. Exp Dermatol 18: 437–444.
- 175) Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., Cua, D.J., 2003. Divergent Pro- and antiinflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J. Exp. Med. 198, 1951–1957. <https://doi.org/10.1084/jem.20030896>
- 176) Nakajima, T., Ueki-Maruyama, K., Oda, T., Ohsawa, Y., Ito, H., Seymour, G.J., Yamazaki, K., 2005. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. J Dent Res 2005; 84: 639–643.
- 177) Naguib, G., Al-Mashat, H., Desta, T., Graves, D.T., 2004. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. J. Invest. Dermatol. 123, 87–92. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22711.x>
- 178) Napolitani, G., Rinaldi, A., Berton, F., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 2005. Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a Th1 polarizing program in dendritic cells. Nat Immunol. 2005 August; 6(8); 769-776
- 179) Naureen, F., Faisal, S.M., Zubair, S., Siddiqui, S.S., Moin, S., Owais, M., 2017. Emerging role of Interleukins IL-23/IL-17 axis and biochemical markers in the pathogenesis of Type 2 Diabetes: association with age and gender in human subjects. Int. J. Biol. Macromol. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.155>
- 180) Nishimura, F., Takahashi, K., Kurihara, M., Takashiba, S., Murayama, Y., 1998. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. Ann Periodontol 1998;3:20-29.

- 181) Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., et al., 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483. <https://doi.org/10.1038/nature05969>
- 182) O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T- lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 458–466.
- 183) Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Kuhara, A., Nishimura, F., Nakasho, K., Yamanegi, K., Yamada, N., Hata, M., Yamane, J., Terada, N., 2009. The involvement of IL-23 and the Th 17 pathway in periodontitis. *J. Dent. Res.* 88, 633–638. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.188>
- 184) Okui, T., Aoki, Y., Ito, H., Honda, T., Yamazaki, K., 2012. The presence of IL-17+/FOXP3+ double-positive cells in periodontitis. *J. Dent. Res.* 91, 574–579. <https://doi.org/10.1177/0022034512446341>
- 185) Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M.E., Belkaid, Y., 2009. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal Infection. *Immunity* 31, 772–786. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.001>
- 186) Osborn, O., Brownell, S.E., Sanchez-Alavez, M., Salomon, D., Gram, H., Barfai, T., 2008. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet induced obesity. *Cytokine*. 2008 October; 44(1): 141–148. [doi:10.1016/j.cyto.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.004)
- 187) Otávio, L., Cota, M., Silva, T.A., Cortelli, S.C., Cortelli, J.R., Costa, F.O., 2017. Periodontitis and type 2 diabetes among women with previous gestational diabetes : epidemiological and immunological aspects in a follow-up of three years. *J Appl Oral Sci.* 2017 Mar-Apr; 25(2); 130–139.
- 188) Ouyang, W., Ranganath, S.H., Windel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., Murphy, K.M., 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998 Nov;9 (5);745-55.

- 189) Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., Hymowitz, S. G. 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokine in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29:71–109.
- 190) Page, R.C. and Schroeder, H.E., 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976;34:235–249.
- 191) Pandiyan, P., Conti, H.R., Zheng, L., Peterson, A.C., 2011. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity* 34, 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.002>
- 192) Pandiyan, P. and Lenardo, M.J., 2008. The control of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell survival. *Biol. Direct* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-6>
- 193) Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M.J., 2007. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1353–1362. <https://doi.org/10.1038/ni1536>
- 194) Papapanou, P.N., 1996. Periodontal Diseases: *Ann Periodontol* 1, 1–36. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0755-7.00305-5>
- 195) Park, Y.D., Kim, Y.S., Jung, Y.M., Lee, S.I., Lee, Y.M., Bang, J.B., Kim, E.C., 2012. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide regulates interleukin (IL)-17 and IL-23 expression via SIRT1 modulation in human periodontal ligament cells. *Cytokine* 60, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.021>
- 196) Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Cassatella, M.A., 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115, 10. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216085>
- 197) Phillipson, M., Kubes, P., 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* 17, 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/nm.2514>
- 198) Pickup, J.C., 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Mar; 27(3);813-23.

- 199) Pietrani, N.T., Ferreira, C.N., Rodrigues, K.F., Perucci, L.O., Carneiro, F.S., Bosco, A.A., et al., 2018. Biomedicine & Pharmacotherapy Proresolving protein Annexin A1 : The role in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Biomed. Pharmacother.* 103, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.024>
- 200) Prabhu, A., Michalowicz, B.S., Mathur, A., 1996. Detection of Local and Systemic Cytokines in Adult Periodontitis. *J. Periodontol.* 67, 515–522. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.5.515>
- 201) Powrie, F. and Coffmann, R.L., 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today.* 1993 Jun;14(6);270-4.
- 202) Refaeli, Y., and Abbas, A.K. 1998. Role of cytokines in autoimmunity. *Eur. Cytokine Netw.* 9, 81–82.
- 203) Reinhardt, R. A., Bolton, R.W., McDonald, T.L., DuBois, L.M., Kaldahl, W.B., 1988. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J. Periodontol.* 59, 656–670. <https://doi.org/10.1902/jop.1988.59.10.656>
- 204) Reynolds, J.M., Pappu, B.P., Peng, J., Martinez, G.J., Zhang, Y., Chung, Y., Ma, L., Yang, X.O., Nurieva, R.I., Tian, Q., Dong, C., 2010. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity.* 32:692–702. [PubMed: 20434372]
- 205) Reynolds, J.M., Pappu, B.P., Peng, J., Martinez, G.J., Chung, Y., Ma, L., et al., 2011. Autoimmune Disease 32, 692–702. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.010>.Toll-like
- 206) Ribeiro Souto, G., Queiroz, C.M., Nogueira Guimarães De Abreu, M.H., Oliveira Costa, F., Alves Mesquita, R., 2014. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: A cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091636>
- 207) Rodrigues, K.F., Pietrani, N.T., Bosco, A.A., Magalhães, F., Campos, F., Sandrim, V.C., Gomes, K.B., 2017. IL-6, TNF- α and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61(5):438-46 <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000254>

- 208) Rodríguez-Perea, A.L., Arcia, E.D., Rueda, C.M., Velilla, P.A., 2016. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. Clin. Exp. Immunol. 185, 281–291. <https://doi.org/10.1111/cei.12804>
- 209) Rouvier, E., M.-F. Luciani, M.-G. Mattei, F. Denizot, P. Golstein. 1993. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequence, and homologous to a *Herpesvirus saimiri* gene. J. Immunol. 150;5445-5456.
- 210) Ryan, M., Ramamurthy, N.S., Sorsa, T., Golub, L.M., 1999. MMP- mediated events in diabetes. Ann N Y Acad Sci 1999;878:311-334.
- 211) Ryba-Stanislawowska, M., Skrzypkowska, M., Mysliwska, J., Mysliwiec, M., 2013. The Serum IL-6 Profile and Treg / Th17 Peripheral Cell Populations in Patients with Type 1 Diabetes. Mediators of Inflammation 2013, 3–9.
- 212) Ryba-stanisławowska, M., Skrzypkowska, M., Mysliwiec, M., Mysliwska, J., 2013. Loss of the balance between CD4 + Foxp3 + regulatory T cells and CD4 + IL17A + Th17 cells in patients with type 1 diabetes. Hum Immunol. 2013 Jun;74 (6);701-7 <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.01.024>
- 213) Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2001. Immunologic tolerance maintained their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Immunol. Rev. 182, 18–32.
- 214) Sakallioğlu, E.E., Ayas, B., Lutfioğlu, M., Keles, G.C., Acikgoz, G., Firatli, E., 2007. Osmotic pressure and vasculature of gingiva in experimental diabetes mellitus. J Periodontol. 2007 Apr;78(4):757-63.
- 215) Sakallioğlu, E.E., Ayas, B., Lutfioğlu, M., Keles, G.C., Acikgoz, G., Firatli, E., 2008. Gingival levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in diabetes mellitus and periodontitis; an experimental study in rats Clin Oral Investig. 2008 Mar;12(1):83-9.
- 216) Salerno, F., Guislain, A., Cansever, D., Wolkers, M.C., 2016. TLR-Mediated Innate Production of IFN- γ by CD8 + T Cells Is Independent of Glycolysis. J Immunol. 2016 May 1; 196(9); 3695-706. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501997>

- 217) Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, Offenbacher S., 1998. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res* 1998; 33: 212±225.
- 218) Sastrowijoto, S. H., Hilleman, P., van Steenberg, T. J., Abraham-Inpijn, L. & de Graff, J. 1989. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. *Journal of Clinical Periodontology* 16, 316–322.
- 219) Samuelsson, B., Dahlén, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., Serhan, C.N. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237:1171-1176.
- 220) Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., Haslett, C., 2002. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 965–975. <https://doi.org/10.1038/nri957>
- 221) Sawada, Y., Honda, T., Nakamizo, S., Otsuka, A., Ogawa, N., Kobayashi, Y., Nakamura, M., Kabashima, K., 2018. Resolvin E1 attenuates murine psoriatic dermatitis. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30373-1>
- 222) Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., et al., 2013. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38, 970–983. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011>
- 223) Schwarzenberger, P., Huang, W., Ye, P., Oliver, P., Manuel, M., Zhang, Z., Bagby, G., Nelson, S., Kolls, J.K., 2000. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17 mediated granulopoiesis. *J Immunol* 2000 May 1;164(9):4783-9
- 224) Segura, E., 2016. Review of mouse and human dendritic cell subsets. *Dendritic Cell Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1423, DOI 10.1007/978-1-4939-3606-9_1

- 225) Serhan, C., Chiang N., VanDyke, T., 2008. Resolution Lipid Mediators. *Nat Rev Immuno* 8, 349–361. <https://doi.org/10.1038/nri2294>.Resolving
- 226) Serhan, C.N., 2014. Novel Pro-resolving lipid mediators in inflammation are leads for Resolution Physiology. *Nature*. 2014 June 5; 510, 92–101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>.Novel
- 227) Serhan, C.N., Chiang, N., 2002. Lipid-Derived Mediators in Endogenous Anti-Inflammation and Resolution: Lipoxins and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxins, *The Scientific World JOURNAL*. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.81>
- 228) Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.-L., 2002. Resolvins. *J. Exp. Med.* 196, 1025–1037. <https://doi.org/10.1084/jem.20020760>
- 229) Serhan, C.N. and Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>
- 230) Shaker, O.G. and Ghallab, N.A., 2012. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: Relation to PCR bacterial detection. *Mediators Inflamm.* 2012;2012; 174764 <https://doi.org/10.1155/2012/174764>
- 231) Shen, F., 2004. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-induced genes in bone cells. *J. Leukoc. Biol.* 77, 388–399. <https://doi.org/10.1189/jlb.0904490>
- 232) Shevach, E.M., 2002. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389–400. <https://doi.org/10.1038/nri821>
- 233) Shinjo, Y., Makide, K., Satoh, K., Fukami, F., Inoue, A., Kano, K., Otani, Y., Ohwada, T., Aoki, J., 2017. Lysophosphatidylserine suppresses IL-2 production in CD4 T cells through LPS3/GPR174. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 494, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.028>
- 234) Shinohara, M., Mirakaj, V., Serhan, C.N., 2012. Functional metabolomics reveals novel active products in the DHA metabolome. *Front. Immunol.* 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00081>

- 235) Singh, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Hedrick, M.N., Farber, J.M., 2008. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 2008; 180:214–21.
- 236) Slots J., 1979. Subgingival Microflora and Periodontal Disease. *J Clin Periodontol* 1979 Oct;6(5):351-82.
- 237) Song, L., Dong, G., Guo, L., Graves, D.T., 2018. The function of dendritic cells in modulating the host response. *Mol. Oral Microbiol.* 33, 13–21. <https://doi.org/10.1111/omi.12195>
- 238) Stanko, P. and Holla, L.I., 2014. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed. Pap.* 158, 35–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2014.005>
- 239) Stevanovic, D., Ljubic, A., Jorga, J., Simic, M., Starcevic, V., Trajkovic, V., Micic, D., 2009. Increased activity of interleukin-23 / interleukin-17 proinflammatory axis in obese women 151–156. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.216>
- 240) Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A. V., et al., 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7, 937–945. <https://doi.org/10.1038/ni1376>
- 241) Stumhofer, J.S., Silver, J.S., Laurence, A., Porrett, P.M., Harris, T.H., Turka, L.A. et al., 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* 8, 1363–1371. <https://doi.org/10.1038/ni1537>
- 242) Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;2:3–17.
- 243) Sunandhakumari, V.J., Sadasivan, A., Koshi, E., Krishna, A., Alim, A., Sebastian, A., 2018. Effect of non surgical periodontal Therapy on plasma levels of IL-17 in chronic periodontitis patients with well controlled Type-II diabetes. *Dent J (Basel)*. 2018 Jun 13;6(2) <https://doi.org/10.3390/dj6020019>

- 244) Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H.G., Lavelle, E.C., 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 203, 1685–1691. <https://doi.org/10.1084/jem.20060285>
- 245) Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., Mills, K.H.G., 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.001>
- 246) Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
- 247) Takahashi, K., Azuma, T., Motohira, H., Kinane, D.F., Kitetsu, S., 2005. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 32, 369–374. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00676.x>
- 248) Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>
- 249) Takeda, M., Ojima, M., Yoshioka, H., Inaba, H., Kogo, M., Shizukuishi, S., Nomura, M., Amano, A., 2006. Relationship of Serum Advanced Glycation End Products With Deterioration of Periodontitis in Type 2 Diabetes Patients. *J. Periodontol.* 77, 15–20. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.77.1.15>
- 250) Takeda, K. and Akira, S., 2015. Toll-Like Receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 109: 14.12.1-14.12.10.
- 251) Takeichi, O., Haber, J., Kawai, T., Smith, D.J., Moro, I., Taubman, M.A., 2000. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J. Dent. Res.* 79, 1548–1555. <https://doi.org/10.1177/00220345000790080401>
- 252) Tanaka, A., Sakaguchi, S., 2016. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Nat. Publ. Gr.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>

- 253) Tang, L., Yang, X., Liang, Y., Xie, H., Dai, Z., Zheng, G., 2018. Transcription factor retinoid-related orphan receptor γ : A promising target for the treatment of psoriasis. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01210>
- 254) Tang, Q. and Bluestone, J.A., 2008. The Foxp3+regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* 9, 239–244. <https://doi.org/10.1038/ni1572>
- 255) Taylor, G.W., Burt, B.A., Becker, M.P., Genco, R.J., Shlossman, M., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., 1998. Non-Insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J. Periodontol.* 69, 76–83. <https://doi.org/10.1902/jop.1998.69.1.76>
- 256) Taylor, G.W., Burt, B.A., Becker, M.P., Genco, R.J., Shlossman, M., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., 1996. Severe Periodontitis and Risk for Poor Glycemic Control in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *J. Periodontol.* 67, 1085–1093. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.10s.1085>
- 257) Tervonen, T., Karjalainen, K., Knuuttila, M., Huuonen, S., 2000. Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2000;27:567-571.
- 258) Tokoro, Y., Matsuki, Y., Yamamoto, T., Suzuki, T., Hara, K., Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 107;166-174.
- 259) Tonetti, M.S., Greenwell, H., Kornman, K.S., 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Clin. Periodontol.* 45, S149–S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>
- 260) Toshiharu, A. and Hajishenghallis, G., 2013. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013 August 30; 394(0): 49–54. [doi:10.1016/j.jim.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002)
- 261) Thomas Korn, Estelle Bettelli, Wenda Gao, Amit Awasthi, Anneli Jäger, Terry B. Strom, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T_H17 cells. *Nature.* 2007 July 26; 448(7152): 484–487. [doi:10.1038/nature05970](https://doi.org/10.1038/nature05970)

- 262) Thorstensson, H., Kuylenstierna, J., Hugoson, A., 1996. Medical status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J. Clin. Periodontol.* 23, 194–202 (1996).
- 263) Trembleau, S., Germann, T., Gately, M.K., Adorini, L., 1994. The role of IL-12 in the induction of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today* vol. 16, No; 8 1995.
- 264) Trickett, A. and Kwan, Y.L., 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275, 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00010-3)
- 265) Tsai, C., Hayes, C., Taylor, G.W., 2002. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 30:182-192.
- 266) Unal, T., Firatli, E., Sivas, A., Meric, H., Oz, H., 1993. Fructosamine as a possible monitoring parameter in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:191-194.
- 267) Van Dyke, T.E., 2007. Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontol.* 2000 45, 10–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00228.x>
- 268) Van Dyke, T.E., 2017. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol. Aspects Med.* 58, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.04.006>
- 269) Van Dyke, T.E., Serhan, C.N., 2003. Resolution of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Dent. Res.* 82, 82–90. <https://doi.org/10.1177/154405910308200202>

- 270) Van Hamburg, J.P., Asmawidjaja, P.S., Davelaar, N., Mus, A.M.C., Colin, E.M., Hazes, J.M.W., Dolhain, R.J.E.M., Lubberts, E., 2011. Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum.* 63, 73–83. <https://doi.org/10.1002/art.30093>
- 271) Vargas-sanchez, P.K., Moro, M.G., Kusiak, C., 2017. Agreement , correlation , and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(5), 490–497.
- 272) Vassiliou, E.K., Kesler, O.M., Tadros, J.H., Ganea, D., 2008. Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Generated in the Presence of Resolvin E1 Induce Apoptosis of Activated CD4+ T Cells. *J. Immunol.* 181, 4534–4544. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4534>
- 273) Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B., 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.001>
- 274) Vestweber, D., 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 692–704. <https://doi.org/10.1038/nri3908>
- 275) Santos, V.R., Ribeiro, F.V., Lima, J.A., Napimoga, M.H., Bastos, M.F., Duarte, P.M., 2010. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol.* 2010 37(12); 1049–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01624.x>
- 276) Wang, H., Hao, Q., Li, Q.R., Yan, X.W., Ye, S., Li, Y.S., Li, N., Li, J.S., 2007. ω -3 Polyunsaturated fatty acids affect lipopolysaccharide-induced maturation of dendritic cells through mitogen-activated protein kinases p38. *Nutrition* 23, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.04.002>
- 277) Weiner, H.L., 2001. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and TR1 and TH3 regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2, 671–672. <https://doi.org/10.1038/90604>

- 278) Winer, S., Patser, G., Chan, Y., Tsui, H., Engleman, E., Winer, D., Dosch, H.M., 2009. Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur. J. Immunol.* 2009. 39: 2629–2635. <https://doi.org/10.1002/eji.200838893>
- 279) Wong, C.K., Ho, A.W.Y., Tong, P.C.Y., Yeung, C.Y., Kong, A.P.S., Lun, S.W.M., Chan, J.C.N., Lam, C.W.K., 2007. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jul; 149(1); 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03389.x>
- 280) World Health Organization. Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference. Official Records of the World Health Organization 1948; 19456 No. 2:1.
- 281) Yamamoto, M., Fujihashi, K., Hiroi, T., McGhee, J.R., Van Dyke, T.E., Kiyono, H., 1997. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res* 1997; 32: 115–119.
- 282) Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Seon, H.C., Wang, D., Watowich, S.S., Dong, C., 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 9358–9363. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600321200>
- 283) Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y. et al., 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>
- 284) Yang, X.P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S.M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J.R., Hirahara, K., Sun, H.W., Wei, L., Vahedi, G., Kanno, Y., O'Shea, J.J., Laurence, A., 2011. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.* 12, 247–254. <https://doi.org/10.1038/ni.1995>
- 285) Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V., Silvennoinen, O., O'Shea, J.J. 2004. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology* 2004, 5:253.

- 286) Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B. et al., 2008. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008; 181:8391–401.
- 287) Yates, C.M., Calder, P.C., Ed Rainger, G., 2014. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* 141, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.010>
- 288) Ye, J., Wang, Y., Liu, X., Li, L., Opejin, A., Hsueh, E.C., Luo, H., Wang, T., Hawiger, D., Peng, G., 2017. TLR7 Signaling Regulates Th17 Cells and Autoimmunity: Novel Potential for Autoimmune Therapy. *J. Immunol.* 199, 941–954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601890>
- 289) Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B. et al., 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* 116, 1310–1316. <https://doi.org/10.1172/JCI21404>
- 290) Yu, J.J., Ruddy, M., Wong, G., Sfintescu, C., Baker, P., Smith, J. 2007. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 2007; 109:3794–3802. [PubMed: 17202320]
- 291) Yuan, N., Zhang, H.F., Wei, Q., Wang, P., Guo, W.Y., 2018. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells, Interleukin 10 and Transforming Growth Factor β in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 126, 96–101. <https://doi.org/10.1055/s-0043-113454>
- 292) Zapata-gonzalez, F., Auguet, T., Aragonès, G., Guiu-jurado, E., et al, 2015. Interleukin-17A Gene Expression in Morbidly Obese Women. *Int J Mol Sci.* 201530;16(8); 17469–17481. <https://doi.org/10.3390/ijms160817469>
- 293) Zenobia, C., Hajishengallis, G., 2016. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation *Periodontol* 2000. 2015; 69(1), 142–159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>.

- 294) Zenobia, C., Luo, X.L., Hashim, A., Abe, T., Jin, L., Chang, Y., Jin, Z.C., Sun, J.X., Hajishengallis, G., Curtis, M.A., Darveau, R.P., 2013. Commensal bacteria-dependent select expression of CXCL2 contributes to periodontal tissue homeostasis. *Cell. Microbiol.* 15, 1419–1426. <https://doi.org/10.1111/cmi.12127>
- 295) Zeyda, M., Säemann, M.D., Stuhlmeier, K.M., Mascher, D.G., Nowotny, P.N., Zlabinger, G.J., Waldhäusl, W., Stulnig, T.M., 2005. Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independently of NF- κ activation. *J. Biol. Chem.* 280, 14293–14301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410000200>
- 296) Zhang, C., Xiao, C., Wang, P., Xu, W., Zhang, A., Li, Q., Xu, X., 2014. The alteration of Th1 / Th2 / Th17 / Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus : Relationship with diabetic nephropathy. *Hum. Immunol.* 75, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.02.007>
- 297) Zhao, L., Zhou, Y., Xu, Y., Sun, Y., Li, L., Chen, W., 2011. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.* 38, 509–516. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01712.x>
- 298) Zheng W, Flavell RA: The transcription factor GATA- 3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587–596.
- 299) Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I.I., Min, R., Victora, G.D. et al., 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 453, 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature06878>
- 300) Zhou, L.J. and Tedder, T.F., 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2588–2592. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2588>
- 301) Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T. Levy, D., Leonard, W., Littman, D., 2007. IL-6 programs Th-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* volume 8, pages 967–974 (2007).

- 302) Zhou, X., Zhang, W., Liu, X., Zhang, W., Li, Y., 2015. Interrelationship between diabetes and periodontitis: Role of hyperlipidemia. *Arch. Oral Biol.* 60, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.11.008>
- 303) Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature* 484, 514–518. <https://doi.org/10.1038/nature10957>
- 304) Qiao, Y.C., Shen, J., He, L. et al. 2016. Changes of regulatory T cells and of proinflammatory and immunosuppressive cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 3694957.
- 305) Gao, L., Faibish, D., Fredman, G., Herrera, B.S., Chiang, N., Serhan, C.N. et al., 2013. Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation. *J Immunol.* 2013 Jan 15; 190(2); 689-94.

ETİK KURUL KARARI



Date: June 1, 2017

To: Thomas Van Dyke

From: Susan Rittling, Chair *SR*

Re: Animal Amendment Application # 14-027
Protocol: Neutrophils and Periodontitis in Diabetes

The following amendment has been reviewed and given FULL APPROVAL by the Forsyth Institute's Animal Care and Use Committee:

Entitled: The role of RAGE in Diabetic Periodontitis

Submitted: 3/8/2017

Protocol Approval Date: 11/19/2014

Amendment Approval Date: 6/1/2017

Animal Assurance Number: A3051-01/D16-00029

Protocol Integrity

As Principal Investigator of this Protocol, you are required to abide by all of the terms and conditions you have included in the protocol and/or developed in collaboration with the IACUC. Should you find it necessary to deviate from the protocol, you must file an "Amendment" form with the IACUC detailing the changes you propose. You may not undertake any such changes until approval is given by IACUC, unless the change involves the immediate life and/or welfare of the animals. Failure to abide by this policy can result in administrative action, including termination of the study.

A signed copy of the amendment is attached for your records.

SRR:jlt

cc: Animal Facility

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DIYABETİN PERİODONTAL HASTALIKLA
İLİŞKİSİNDE YARDIMCI T HÜCRELERİNİN ROLÜ
VE RESOLVİNİN İLTIHAPSAL PATOGENEZ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ ORIJINALLIK RAPORU

%**2** %**2** %**1** %**0**

BENZERLİK ENDEKSİ İNTERNET YAYINLAR ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
KAYNAKLARI
BİRİNCİL KAYNAKLAR

Submitted to Facultad Latinoamericana de
Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador

Öğrenci Ödevi

tel.archives-ouvertes.fr <%1

İnternet Kaynağı

theses.gla.ac.uk <%1

İnternet Kaynağı

doras.dcu.ie <%1

İnternet Kaynağı

www.doria.fi <%1

İnternet Kaynağı

d-nb.info <%1

İnternet Kaynağı

acikarsiv.ankara.edu.tr <%1

İnternet Kaynağı

jdr.sagepub.com <%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma	Soyadı	Öner
Doğ.Yeri	Güzelyurt/K.K.T.C.	Doğ.Tar.	05.08.1990
Email	fatmaoner90@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Istanbul Üniversitesi	2019
Yük.Lis.	Istanbul Üniversitesi	2012
Lisans		
Lise	Türk Maarif Koleji	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	91,25 (ÜDS)	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	80,089	77,64	72,9
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Oner F*, Saraç M, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı'na başvuran hastaların klinik profillerinin İncelenmesi
Bitirme Tezi,2012

Oner F*, Saraç M, Ortodonti hastalarında kız ve erkek büyüme farklılıklarının değerlendirilmesi (poster sunumu)

13. Türk Ortodonti Derneği Kongresi 2012, Antalya

Oner F, Soytürk M, Kasnak G, Fıratlı E,. Treatment of Unusual Periodontitis Case (poster sunumu)

23. European Association of Osseointegration(EAO), 2014, Roma

Ozercan T, Fıratlı S, Kasnak G, Oner F, Iskefli B, Fıratlı E,. Accelerated Tooth Movement with Corticotomy and Piezocision (poster sunumu)

8th Europerio, London

Oner, F., Nguyen, D., Stephens, D., Hasturk, H., Fıratlı, E., Kantarci, A. Resolvin E1 reduces T helper cell activation and IL-17 production (poster sunumu)

IADR 2018, London









