



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**PERİODONTAL OLARAK SAĞLIKLI BİREYLERDE GÜNLÜK
İÇİLEN SİGARA MİKTARINA BAĞLI HİPOKSİYLE
İNDÜKLENEN FAKTÖR (HİF) SİNYAL YOLAĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat TAŞKAN

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Özkan KARATAŞ

TOKAT-2020



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**PERİODONTAL OLARAK SAĞLIKLI BİREYLERDE GÜNLÜK
İÇİLEN SİGARA MİKTARINA BAĞLI HİPOKSİYLE
İNDÜKLENEN FAKTÖR (HİF) SİNYAL YOLAĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA

Periodontoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat TAŞKAN

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Özkan KARATAŞ

TOKAT-2020

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

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

(02/10/2020)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Özge YÜKSEKKAYA

İmzası



TEŞEKKÜR

Öncelikle uzmanlık eğitimim süresince ve bu uzmanlık tezinin yazılması sırasında bilgilerini benden esirgemeyen, tecrübe önerilerini her zaman içtenlikle benimle paylaşan, üzerimde büyük emekleri olan, her zaman bir abi gibi destek olan değerli danışman hocam Mehmet Murat TAŞKAN'a;

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

Tezimin bilimsel araştırmalar projesi kısmında büyük katkıları olan ve istatistik analizlerimizde bize yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Hatice BALCI YÜCE'ye;

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

Tezimin klinik aşamalarında bana büyük yardımları olan diğer bölümlerdeki asistan arkadaşlarıma; labaratuvar aşamalarında bana yardımcı olan Arş. Gör. Aslı KESKİN'e, Arş. Gör. Sultan TAŞTAN'a ve Gözde IŞIKER KARA' ya; ayrıca desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen bu fakülte sayesinde sahip olduğum kardeşlerim Arş. Gör. Melike ÇELT'e, Arş. Gör. Hayrunnisa KASAP'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasında büyük emekleri olup, sabırla bana yardımcı olan varlıklarıyla bana güç veren değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Gülşah TONGA'ya ve Arş. Gör. Şahin KILINÇKAYA'ya

Asistanlığım boyunca her zaman yanımda olan, her türlü desteklerini benden esirgemeyen Endodonti ve Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalındaki tüm asistan arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi, fedakarlıklarını her zaman hissedeceğim emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım annem Harika ÖZDEMİR'e ve canım babam Ali ÖZDEMİR'e;

Varlığı ile destek veren canım kardeşlerim Merve ÖZDEMİR'e ve Özlem ÖZDEMİR'e;

Sevgisiyle, desteğiyle her zaman yanımda olan hem eşim hem arkadaşım İrfan YÜKSEKKAYA'ya ve biricğim, herşeyim tüm asistanlığım boyunca fark etmeden bütün fedakarlığı gösteren küçük can'ım kızım Zeynep Buket YÜKSEKKAYA'ya

İyi ki hayatımdasınız sizleri çok seviyorum, hepinize sonsuz teşekkürler...

ÖZET*

Periodontal Olarak Sağlıklı Bireylerde Günlük İçilen Sigara Miktarına Bağlı Hipoksiyle İndüklenen Faktör (Hif) Sinyal Yolağının Araştırılması

Amaç: Periodontal olarak sağlıklı bireylerde günlük içilen sigara miktarı ile oluşan hipoksik ortamın hipoksiyle indüklenabilen sinyal yolağı biyobelirteçleri ve periodontopatojenlerin miktar ve içeriğine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma kontrol grubu (n=20): Sigara kullanmayan ve hayatı boyunca hiç sigara kullanmamış bireyler, 1. grup (n=20): Günlük 5 veya daha az sayıda sigara tüketen bireyler 2. grup (n=20): Günlük 6-10 sigara tüketen bireyler, 3. grup (n=20): Günlük 11-19 sigara tüketen bireyler ve 4. grup (n=20): Günlük 20 veya daha fazla sigara tüketen bireylerden oluşmak üzere toplamda 100 bireyden oluşan 5 grupta yapılmıştır. Hastaların mevcut dişlerinin hepsinden periodontal klinik parametreler ölçülmüş, sağ maksilla 16 nolu dişten eğer yoksa 15 veya 17 nolu dişlerinden diş eti oluşu sıvısı (DOS) alınmıştır. Bakteri varlığının tespiti için için her bireyde belirlenmiş olan gingival sulkustan 2 adet kağıt şerit ile subgingival plak örneği alınmıştır. Diş eti örnekleri gingivektomi veya kron boyu uzatma operasyonu endikasyonu olan kişilerden alınmıştır. Diş eti ve dental plak örneklerine Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DOS örneklerine ise Enzime Bağlı İmmünosorban Deneyi (ELISA) yöntemiyle bakılmıştır. DOS içindeki HIF-1 α , HIF-1 β , PHD 1 diş etinde HIF-1 α , VEGF seviyelerine bakılmıştır. Subgingival dental plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. nodatum*, *E. corrodens* ve *C. gingivalis/ochracea/sputigena* periodontopatojenlerine bakılmıştır.

Bulgular: Yaşa bağılı dağılımlarda gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p>0,05$). Gruplar arası plak indeksleri, gingival indeksler ve gingival sulkus derinliği değerlendirildiğinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. ($p>0,05$). Sigara sayısı bütün gruplar arasında istatistiksel olarak farklıdır ($p<0,05$). ELISA sonuçlarına göre ise HIF-1 α değerlerine bakıldığında grup 1, grup 2 ve grup 4'ten anlamlı derece yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Grup 5 ise grup 1, grup 2 ve grup 4'ten anlamlı derecede yüksek bulunurken grup 3'ten anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$). HIF-1 β değerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Grup 5'in PHD-1 değerlerine bakıldığında grup 1, grup 2 ve grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). HIF-1 α 'nın PZR sonuçları ise kontrol geni (GAPDH) sabit tutularak değerlendirildiğinde sigara içen gruplar arasında fark yokken, sigara içenlerde içmeyenlere göre yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. VEGF'nin PZR sonuçları ise sigara içenler arasında 20 adet üstü sigara içen grupta artış varken diğer sigara içen gruplar arasında fark yoktur. Sigara içenlerde içmeyenlere göre ise yaklaşık 2 kat artış vardır. Bütün gruplarda *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. corrodens*, *C. gingivalis/ochracea/sputigena* tespit edilmiştir. 0-5 arası sigara içen grupta *E. nodatum* tespit edilmemiştir. 20 üstü sigara içen grupta ise *A. actinomycetemcomitans* ve sigara içmeyen grupta *P. gingivalis* tespit edilmemiştir.

Sonuç: Klinik parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılıklar yoktur. Günlük tüketilen sigara miktarına bağılı olarak hipoksinin artacağı öngörülse de, çalışmamızda hipoksinin günlük tüketilen sigara miktarından bağımsız olarak değişebileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Sigara; HIF-1 α ; HIF-1 β ; VEGF; PHD-1; Periodontopatojen

Özge YÜKSEKKAYA, Uzmanlık Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Tokat, 2020



ABSTRACT*

Investigation of the Hypoxia Induced Factor (Hif) Signal Pathway Associated with Daily Smoking Amounts in Periodontal Healthy Individuals

Objective: It was aimed to investigate whether the hypoxic environment caused by the amount of cigarettes smoked daily in periodontal healthy individuals affects the amount and content of signal pathway biomarkers and periodontopathogen bacteria that can be induced by hypoxia.

Method: This study was conducted on 100 individuals in 5 groups as Control Group (n = 20): Individuals who do not smoke and have never smoked during their lifetime, Group 1 (n = 20): Individuals who consumed 5 or fewer cigarettes daily Group 2 (n = 20): Individuals who consumed 6 -10 cigarettes daily, Group 3 (n = 20): Individuals who consumed 11-19 cigarettes daily, and Group 4 (n = 20): Individuals who consumed 20 or more cigarettes daily. Periodontal clinical parameters were measured from all existing teeth of the patients and gingival crevicular fluid (GCF) was taken from the right maxilla teeth 16, if they were not present in the oral cavity, from teeth 15 or 17. For the determination of bacterial presence, subgingival plaque samples were collected from the gingival sulcus for each individual with paper strips 2 times. Gingival samples were collected from subjects with an indication for gingivectomy or a crown lengthening operation. Gingiva and dental plaque samples were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR), and GCF samples by Enzyme Linked

Immunosorbent Assay (ELISA) method. HIF-1 α , HIF-1 β , PHD-1 in GCF were examined and HIF-1 α , VEGF amounts were examined in the gingiva. In subgingival dental plaque samples, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. nodatum*, *E. corrodens* and *C. gingivalis* / *ochracea* / *sputigena* periodontopathogens were examined.

Results: There was no statistical difference between groups at age ($p>0.05$). When plaque indexes, gingival indexes and gingival sulcus depth evaluated, there was no statistically significant difference between groups ($p>0.05$). The number of cigarettes is statistically different among all groups ($p<0.05$). According to ELISA results, when the HIF-1 α values are analyzed, it was found significantly higher than group 1, group 2 and group 4 ($p<0.05$). Group 5 was found significantly higher than group 1, group 2 and group 4, but significantly lower than group 3 ($p<0.05$). There was no statistical difference between the groups in HIF-1 β value ($p>0.05$). Considering PHD 1 values, it was found that Group 5 was statistically higher than group 1, group 2 and group 3 ($p<0.05$). When the PZR results of HIF-1 α were evaluated by keeping the control gene (GAPDH) constant, there was no difference among smokers and smokers showed 2 times increase compared to non-smokers. PZR results of VEGF showed an increase among smokers in the group with over 20 smokers, but there was no difference between other smoker groups. There was a 2 times increase in smokers compared to non-smokers. *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. corrodens*, *C. gingivalis* / *ochracea* / *sputigena* were detected in all groups. *E. nodatum* was not detected

in the 0-5 smoker group. *A. actinomycetemcomitans* was not detected in the group of smokers more than 20 and *P. gingivalis* in the non-smoker group.

Conclusion: There were no significant differences in clinical parameters between groups. Although it was hypothesised that hypoxia will increase depending on the amount of cigarettes consumed daily, it was detected in our study that hypoxia may change regardless of the amount of cigarettes consumed daily.

Keywords: Cigarette, HIF-1 α , HIF-1 β , VEGF, PHD-1, Periodontopathogen

Özge YÜKSEKKAYA, Thesis

Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Dentistry

Tokat, 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET*	iv
ABSTRACT*	vii
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. SİGARA VE PERİODONTAL HASTALIK.....	6
2.2. SİGARA TÜKETİMİ VE NİKOTİNİN ETKİSİ.....	8
2.2.1. Nikotinin İmmün Sistem ve Enflamasyon Üzerine Etkisi	9
2.3. SİGARA İLE İLİŞKİLİ SİSTEMİK HASTALIKLAR	12
2.4. SİGARA VE HİPOKSİ.....	13
2.4.1. HIF-1 Protein Yapısı	17
2.4.2. HIF-1'in Hipoksi ile Aktivasyonu	19
2.4.3. HIF-1'in Hipoksik Olmayan Uyarıcılar ile Aktivasyonu	21
2.4.4. HIF-1'in Biyolojik Fonksiyonları	22

2.5. PROLİL HİDROKSİLAZLAR.....	22
2.6. VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ	26
2.7. SİĞARA VE PERİODONTAL MİKROFLORA	30
2.8. KOAGREGASYON MODELİ.....	32
2.9. Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans).....	33
2.10. Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis).....	35
2.11. Tannerella forsythia (T. forsythia).....	36
2.12. Treponema denticola (T. denticola).....	37
2.13. Prevotella intermedia (P. intermedia)	38
2.14. Peptostreptococcus micros (P. micros)	39
2.15. Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum).....	40
2.16. Campylobacter recta (C. recta)	41
2.17. Eubacterium nodatum (E. nodatum)	41
2.18. Eikenella corrodens (E. corrodens).....	42
2.19. Capnocytophaga türleri: (gingivalis/ochracea/sputigena).....	43
2.20. PERİODONTOPATOJEN MİKROORGANİZMA TESPİT ETME YÖNTEMLERİ VE DİŞETİ BİYOBELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	44
2.20.1. PZR Yöntemi.....	44
2.21. HİPOTEZ	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. HASTA SEÇİM KRİTERLERİ.....	49
3.2. DAHİL EDİLME KRİTERLERİ:.....	49
3.3. ÇIKARILMA KRİTERLERİ:.....	50

3.4. KLİNİK PERİODONTAL PARAMETRELERİN ÖLÇÜMÜ:.....	50
3.2. 1. Plak indeksi (PI):.....	50
3.2.2. Gingival indeks (GI):.....	51
3.2.3. Gingival sulkus derinliği (GSD):.....	52
3.5. SUBGİNGİVAL MİKROBİYAL DENTAL PLAK ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI:	52
3.6. DOS TOPLANMASI VE ELİSA ANALİZİ	54
3.6.1. Diş eti Örneklerinin Toplanması ve RT-PZR analizi	55
3.6.1.1. RT-PZR yöntemi.....	56
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	58
4. BULGULAR.....	60
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ	82
7. KAYNAKLAR	84
EKLER	123
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 13.1: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler	60
Tablo 13.2: Çalışma grupları sigara sayısı verileri	60
Tablo 13.3: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler	61
Tablo 13.4: Bakterilerin Micro-IDentPlus® testi sonuçları.....	68



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.4.1: HIF-1 α 'nın prolin hidroksilasyon tarafından düzenlenmesi (Storti, 2013).	16
Şekil 2.4.1.1: Hipoksik koşullarda HIF-1 α 'nın stabilizasyonu (Demirel ve Çetinkaya, 2014).....	18
Şekil 2.4.1.2: HIF-1 α 'nın normoksik koşullardaki proteozomal degradasyonu (Demirel ve Çetinkaya, 2014).....	19
Şekil 2.20.1.1: Polimeraz zincir reaksiyonunu gösteren şekil (Prof. Dr. Mustafa ÖZDOĞAN internet sitesinden alınmıştır)	47
Şekil 3.5.1: Micro-IDent Plus® örnek toplama malzemeleri.....	54
Şekil 4.1: Çalışma grupları yaş ve sigara sayısı ELISA sonuçları	62
Şekil 4.2: Çalışma grupları plak ve gingival indeks ELISA sonuçları.....	63
Şekil 4.3: Çalışma grupları bukkal ve lingual gingival sulkus derinliği ELISA sonuçları	63
Şekil 4.4: Çalışma grupları HIF-1 α ELİSA sonuçları	64
Şekil 4.5: Çalışma grupları HIF-1 α PZR sonuçları	65
Şekil 4.6: Çalışma grupları HIF-1 β ELISA sonuçları	65
Şekil 4.7: Çalışma grupları PHD-1 ELISA sonuçları.....	66
Şekil 4.8: Çalışma grupları VEGF PZR sonuçları	67

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Celsius

A. actinomycetemcomitans: *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*

ARNT: Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator

bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü

bHLH: Sarmal-ilmek-sarmal motifi

C. recta: *Campylobacter recta*

Capnocytophaga spec. (gingivalis, ochracea, sputigena): *Capnocytophaga gingivalis*,

Capnocytophaga ochracea, *Capnocytophaga sputigena*

DOS: Diş eti oluşu sıvısı

E. corrodens: *Eikenella corrodens*

E. nodatum: *Eubacterium nodatum*

ELISA: Enzime bağlı immünosorban deneyi

EPO: Eritropoetin

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

GBM: Glioblastoma

Gİ: Gingival indeks

GLUT-1: Glukoz transporter-1

HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenabilir faktör-1 alfa

HIF-1 β : Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 beta

HRE: Hipoksi ile regüle olan element

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IgG2: Immunoglobulin G2

IL: İnterlökin

GSD: Gingival sulkus derinliği

MHCII: Sınıf II majör doku uygunluk kompleksi

MMP: Matriks metalloproteinaz

μ L: Mikrolitre

nAChR: Nikotinik nöronal asetilkolin reseptörleri

NO: Nitrik oksit

ODD: Oksijene bağımlı bozunma alanı

PAI: Plazminojen aktivatör inhibitör

PBS: Fosfat tampon solüsyonu

PDGF: Trombosit türevli büyüme faktörü

PGE2: Prostoglandin E2

P. micros: *Peptostreptococcus micros*

PIGF: Plasenta benzeri büyüme faktörünü içeren bir büyüme faktörü

PI: Plak indeksi

P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

P. intermedia: *Prevotella intermedia*

PHD: Prolil hidroksilazlar

ROS: Reaktif oksijen türevleri

T. forsythia: *Tannerella forsythia*

T. denticola: *Treponema denticola*

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR-1: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-1

VHL: Von Hippel-Lindau

1. GİRİŞ

Dünyada yaklaşık 1 milyar insanın (800 milyon erkek ve 200 milyon kadın) sigara bağımlısı olduğu bildirilmiştir (Organization, 2015). Tütün kullanımı dünya genelinde her yıl 7 milyondan fazla ölüme neden olmakta ve bu ölümlerin yaklaşık % 80'i düşük gelirli ülkelerde meydana gelmektedir (Gandomani, Tarazoj ve Salehiniya, 2017). 1980 ve 2012 yılları arasında, dünya genelinde içilen sigara sayısı 4.96 trilyondan (% 95 UI, 4.78 trilyon – 5.16 trilyon) 6.25 trilyona (% 95 UI, 6.07 trilyon – 6.44 trilyon; $p < .001$) yükseldiği bildirilmiştir (M. Ng ve ark., 2014).

Sigara 6000'den fazla gaz veya partiküler fazda sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik madde içermektedir (Abuse, 2006; Alkan, Dikilitaş, Alkan ve Parlar, 2013). Her sigara içilişinde ortalama 20-30 ml karbonmonoksit ve 2-3 mg nikotinin inhale edildiği rapor edilmiştir (Abuse, 2006).

Nikotinin vazokonstriktif etkisi mikrodolaşıma sahip dokularda beslenme yetersizliğine sebep olmaktadır. Bu vazokonstriktif etkisini kan akımına karışıp adrenal bezlerden epinefrin salınımına yol açarak oluşturmaktadır. Sigaranın vazokonstriksiyon etkisine bağlı olarak gingival dokularda kan akımını azalttığı ve bırakılmasını takiben 3-5 gün sonra gingival kan akımının arttığı rapor edilmiştir (Mavropoulos, Aars ve Brodin, 2003).

Periferal kan damarlarındaki vazokonstriksiyon, periodontal dokuları da etkilemekte ve azalmış kan akımına bağlı olarak sigara içenlerde, içmeyenlere göre diş eti hastalığı belirtilerinin klinik olarak daha az görünür hale geldiği bulunmuştur (Alkan ve ark., 2013). Ayrıca bu vazokonstriksiyon tüm dokulara gelen kan ve oksijen seviyelerinin azalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2013).

Hücresel oksijen konsantrasyonundaki değişimleri algılama ve cevaplama sorumlu bu pleotropik olayların çoğunun hipoksi ile indüklenabilir faktör (HIF-1) tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Berra ve ark., 2003). HIF-1 proteinlerinin hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyonda, hücre canlılığı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glikoz alımı ve demir metabolizması gibi olaylara bağlı birçok genin hipoksiye karşı oluşan cevapta rol oynadığı bildirilmiştir (Demirel ve Çetinkaya, 2014).

Pek çok O₂-regüle edilmiş genin aktivasyonuna, çoğu hücrede HIF-1 α ve HIF-1 β 'dan (aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator [ARNT] oluşan bir heterodimer) oluşan HIF aracılık eder (Keith, Adelman ve Simon, 2001; Wang ve Semenza, 1993, 1995). HIF-1 β , HIF-1 α 'nın aksine, oksijen konsantrasyonundan etkilenmemektedir (Kallio, Pongratz, Gradin, McGuire ve Poellinger, 1997).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ailesi, endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (Yancopoulos ve ark., 2000). Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferansiyasyona sebep olur (Bikfalvi, 2004). VEGF; hem gelişim sırasında, hem de yetişkinlerde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (Shalaby ve ark., 1995).

Prolil hidroksilazlar (PHD), moleküler oksijeni kofaktör olarak kullanan, oksijen varlığında HIF-1 α alt birimini degrade eden enzim yapılı moleküllerdir. Hücresel oksijen homeostazında ve hipoksiye verilen HIF cevabında önemli bir yere sahiptirler. Hipoksik koşullarda PHD enzimi inaktif hale gelir ve degradasyondan kurtulan

HIF-1 α , β alt birimi ile birleşerek HIF-1 molekülünü oluşturur. Bu olaya “HIF stabilizasyonu” adı verilmektedir (Akat ve Fıçıcılar, 2017).

Sigara tüketimi sırasında, ağız içi oksidatif potansiyelin azalmasına bağlı olarak anaerobik bakterilerin sayısında artış olabileceği ileri sürülmektedir (Grossi ve ark., 2007). Sigara içen ve içmeyenlerde subgingival bölgedeki bakteri kolonizasyonunu değerlendiren çalışmalara göre sigara içen bireylerde subgingival bölgedeki *Tannerella forsythia*, *Camphylobacter recta*, *Treponema denticola* (Shchipkova, Nagaraja ve Kumar, 2010) ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* oranlarının yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2013; Grossi ve ark., 2007).

Bu bilgilerin ışığında bu ‘Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi’ çalışmasında periodontal olarak sağlıklı bireylerde günlük içilen sigara miktarı ile oluşan hipoksik ortamın hipoksiyle indüklenebilen sinyal yolağı biyobelirteçleri ve periodontopatojen bakterilerin miktar ve içeriğine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Sigaranın hidrojen siyanür, azotoksitler, amonyak, katekol, formik asit gibi zehirler; arsenik, krom, nikel, benzopiren, nitrosaminaz, kadmiyum, formaldehit, aetaldehit gibi kanserojen maddeler içerdği ve bunlara ek olarak sigaranın içeriğindeki nikotinin inhale edildiği rapor edilmiştir (Abuse, 2006).

Nikotin periferik kan damarlarında vazokonstrüksiyona neden olabilir ve bu nedenle diş eti hastalıklarının klinik belirtilerini azaltabilir (Clarke ve ark. 1981). Bergstrom ve ark'ları 24'ü sigara içen 54 hastada sigara tüketiminin cerrahi tedavi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Cerrahi olmayan tedaviden sonra özellikle orta ve şiddetli periodontitisli hastalarda, rezidüel periodontal ceplerin olduğu görülmüştür. Başlangıçta 4-6 mm olan ceplere modifiye widman flep operasyonu yapılmış ve post operatif 12. ay sonunda hastalar tekrar muayene edilmiştir. Her iki grupta da plak indeksi azalmış ve plak indeksindeki benzerliğe rağmen, diş eti kanaması sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar sigara içenlerde plağa bağlı diş eti hastalıklarının klinik belirtilerinin baskılandığını göstermektedir (Kinane ve Chestnutt, 2000).

Danielsen ve arkadaşları benzer bulgulara sahip bir çalışmayı 33 denek üzerinde yürütmüşlerdir (Danielsen, Manji, Nagelkerke, Fejerskov ve Baelum, 1990). Plak indeksi 0.20'den az olan 28 kişiyle çalışmaya devam edilmiştir. Periodontal parametreleri kaydedilerek, dişlere politür uygulanmış ve sonraki 21 gün boyunca tüm ağız hijyeni önlemlerinden kaçınmaları istenmiştir. 21. günde yapılan muayeneden sonra yeniden politür uygulanmış ve ağız hijyeni sağlanmıştır. 2 haftalık gözetimli ağız hijyeni sonrasında plak ve diş eti sağlık durumuna ilişkin parametreler kayıt altına

alınmıştır. Gruplar arasındaki plak indeksleri benzer olmasına rağmen, sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre daha az gingival enflamasyon görülmüştür (Danielsen ve ark., 1990).

Sigara içen hastalar arasında yetersiz enflamatuvar yanıt eğilimi ilk kez 1980'lerin başında bildirilmiştir (Jan Bergström ve Floderus-Myrhed, 1983; Jan Bergström ve Preber, 1986; Preber ve Bergström, 1985). Hemorajik duyarlılığın baskılanması, sigaranın periodontal dokular üzerindeki en erken ve muhtemelen en az fark edilen etkisi olmakla birlikte, genellikle klinik muayenede farkedilmeyerek, sağlıklı bir durum olarak bile görülebilir (Jan Bergström ve Preber, 1986).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bu gözlemleri doğrulamış ve gingival enflamatuvar yanıtın sigara ile değişebildiğine dair birçok kanıt bulunmuştur (Jan Bergström, Persson ve Preber, 1988; Danielsen ve ark., 1990; Grossi ve ark., 1996; Morozumi, Kubota, Sato, Okuda ve Yoshie, 2004).

Sigaranın antihemorajik ve antienflamatuvar etkileri sonucunda; kızarıklık, kanama ve ödem gibi tipik enflamasyon bulguları, sigara içen bireylerde hastalık sürecinde nispeten daha geç görülür (Nair, Sutherland, Palmer, Wilson ve Scott, 2003). Sigarayı bırakma programlarına giren sigara içicilerinde, diş eti kanamasının yanı sıra DOS akışı, sigarayı bıraktıktan sonra sigara içmeyen bireylerdeki seviyelere yaklaştığı ve normalleştiği bildirilmiştir (Morozumi ve ark., 2004; Nair ve ark., 2003).

Holmes tarafından yapılan bir çalışmada, klinik açıdan periodontal olarak sağlıklı olan sigara içen ve içmeyenlerin fiziksel olarak sigaraya maruz kalan bölgelerindeki (maksiller lingual) ve fiziksel olarak sigaraya maruz bırakılmayan bölgelerdeki (maksiller bukkal) DOS akışı karşılaştırılmıştır (L. G. Holmes, 1990; Kinane ve Chestnutt, 2000). Sigara içenlerde, sigara içmeyenlere göre belirgin şekilde daha az

miktarda DOS'a sahip olduğu görölmesine rağmen; ilginç bir şekilde, sigara içenlerin maruz kalan lingual bölgeleri, daha az maruz bırakılan bukkal alanlardan önemli bir fark göstermemiştir. Bu durum nikotinin etkisinin yerel olamayacağını veya yerel olması durumunda tükürük ve dağılmış etkileri ile modifiye edilebileceğini göstermiştir. Araştırmacılar, tütün dumanının etkisinin klinik olarak sağlıklı diş etinde doğrudan fiziksel tahriş yerine vazokonstriksiyon ile olabileceğini düşünmüşlerdir (L. G. Holmes, 1990; Kinane ve Chestnutt, 2000).

2.1. Sigara ve Periodontal Hastalık

Sigara içmek periodontal dokuların aşırı tahribatı ile ilişkili olup, cep oluşumu, kemik kaybı ve erken diş kaybı ile sonuçlanır (J Bergström ve Ellasson, 1987). Literatürde kemik kaybının ve ataçman kaybının sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Jan Bergström, Eliasson, ve Preber, 1991; J Bergström ve Ellasson, 1987; Jan Bergström ve Floderus-Myrhed, 1983; Bolin, Eklund, Frithiof ve Lavstedt, 1993; R. E. Persson, Hollender ve Persson, 1998).

Yaş, ırk ve eğitim düzeylerinin standardizasyonunun sağlandığı klinik çalışmalarda sigara içenlerde içmeyenlere oranla periodontitis görülme olasılığının 3-4 kat daha fazla olduğu ve alveolar kemik yıkımının yıl içinde sigara sayısı ile arttığı bildirilmiştir (Mahanonda ve ark., 2009; Scabbia, Cho, Sigurdsson, Kim ve Trombelli, 2001; Williams ve ark., 2001).

Periodontal hastalık tespiti için sondlanabilen cep derinliği kullanan neredeyse tüm çalışmalar, sigara içmeyenlere göre sigara içenler arasında anlamlı derecede daha yüksek bir sondlanabilen cep derinliği bildirmiştir (Jan Bergström, 1989; Faddy,

Cullinan, Palmer, Westerman ve Seymour, 2000; Machuca, Rosales, Lacalle, Machuca, ve Bullón, 2000; Preber ve Bergström, 1986; Sheiham, 1971).

Bazı çalışmalar sigara içmeyenlere kıyasla, 19-30 yaş arasındaki genç erişkin sigara içenlerin benzer veya daha düşük plak seviyelerine rağmen, periodontitis prevalansının ve şiddetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Haber ve ark., 1993; Linden ve Mullally, 1994; Machuca ve ark., 2000).

Sigaranın periodontal dokuların rejeneratif fonksiyonlarını inhibe etmesi, yenilenme potansiyellerini düşürmesi muhtemeldir (Giannopoulou, Geinoz, ve Cimasoni, 1999; James, Sayers, Drucker ve Hull, 1999; Tanur, McQuade, McPherson, Al-Hashimi ve Rivera-Hidalgo, 2000). Bu nedenle nikotinin etkisi, cerrahi tedaviyi takiben bozulmuş iyileşmede rol oynayabileceği düşünülmektedir (Jan Bergström, 2004).

Böyle bir etki, sigara ile ilişkili iyileşme ve tedavi sonuçlarını açıklamaya yardımcı olabilir. Tütün dumanındaki nikotin haricinde karbon monoksit, akrolein ve aldehit gibi diğer maddelerin de iyileşme olaylarına etki edebileceği bildirilmiştir (Cattaneo ve ark., 2000; Poggi, Rota ve Boratto, 2002).

Sigara içenlerde, içmeyenlere kıyasla daha zayıf oral hijyen ve buna bağlı olarak plak miktarının daha fazla olduğu ve sigara tüketimi arttıkça plak miktarının arttığı ayrıca tükürükteki kalsiyum fosfataz oranının ve tükürük akış hızının artmasına bağlı olarak sigara içenlerde diş taşı birikiminin daha fazla olduğu da öne sürülmüştür (Khan, Mehmood ve Marwat, 2005; Shimazaki ve ark., 2006).

2.2. Sigara Tüketimi ve Nikotin Etkisi

Nikotin bağımlılığı, sigara içme davranışını koruyan psikofarmakolojik mekanizmalardan biri olarak tanımlanmıştır (Bergen ve Caporaso, 1999). Nikotin, beynin mezolimbik dopaminerjik ödül sistemini aktive eder ve ani bırakmada fiziksel ve nörobiyolojik yoksunluk belirtileri ile sonuçlanan bağımlılık yaratabilir (Epping-Jordan, Watkins, Koob ve Markou, 1998; Malin ve ark., 1992; Pidoplichko, DeBiasi, Williams, ve Dani, 1997; Pontieri, Tanda, Orzi ve Di Chiara, 1996).

Kronik nikotin tedavisinden sonra nöronal asetilkolin reseptörleri (nAChR nikotinik) sayılarının, özellikle de memeli beynindeki en yaygın nAChR tipi olan $\alpha 4\beta 2$ heteromerinin arttığı rapor edilmiştir (Flores, Dávila-García, Ulrich, ve Kellar, 1997; M. Marks, J. Burch ve A. Collins, 1983; M. J. Marks, J. B. Burch ve A. C. Collins, 1983; Schwartz ve Kellar, 1983; Whiting ve Lindstrom, 1988).

Kronik nikotin tedavisi üzerine artan nAChR sayıları, hayvan modellerinde nikotine karşı davranışsal tolerans gelişimi ile ilişkilidir ve insan postmortem beynindeki sigara içme yoğunluğu ve süresi ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili olduğu bilinmektedir (Breese ve ark., 1997; M. Marks ve ark., 1983).

Nikotin yalnızca, artan nAChR sayılarının nAChR haberci RNA'sındaki bir artış veya nikotin reseptöre bağlanma parametrelerindeki bir değişiklikle değil, aynı zamanda nAChR'de bir azalma ve nAChR'nin hücrede birikmesi ile ilişkili olduğu için bir antagonist görevi gördüğü bildirilmiştir (M. J. Marks ve ark., 1983; Peng, Gerzanich, Anand, Whiting ve Lindstrom, 1994; Schwartz ve Kellar, 1983).

Sigara başına nikotin emilimi, hem kan plazma ölçümlerinden elde edilen nikotin konsantrasyon eğrilerinden, grafiksel yöntemlerle; hem de yatılı infüzyon çalışmalarında elde edilen nikotin ve kotinin klirens değerlerine kadar stabil izotop

çalışmaları kullanılarak parametrik hesaplama ile ölçülmüştür (Benowitz ve Jacob III, 1994; Feyerabend, Ings ve Russel, 1985). Bu çalışmalar, sigara içenlerin sigara başına yaklaşık 1-2 mg nikotin aldığını göstermektedir (M. Djordjevic, Hoffmann, Thompson, ve Stellman, 1997; M. V. Djordjevic, Hoffmann ve Hoffmann, 1997).

Bununla birlikte, bu yöntemlerin hiçbiri, ödül, bağımlılık ve tolerans gelişimine aracılık eden ana farmakolojik faktör olarak kabul edilen en yüksek beyin nikotin konsantrasyonunu ölçemez. Hayvan modellerinde dozaj kinetiği çalışmaları, daha yüksek tepe konsantrasyonları ile daha yüksek tolerans seviyelerinin gelişimini gösterdiği bildirilmiştir (Marks, Stitzel ve Collins, 1986; Wakasa, Takada ve Yanagita, 1995).

Kotinin yarı ömrünün nikotininkinden daha büyük olması nedeniyle, sigara araştırmalarında, sigara bırakma denemelerinde ve çevresel sigara dumanına maruz kalmanın değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak yararlı olduğu düşünülmektedir (Benowitz, 1996a, 1996b). Plazma, idrar nikotini ve kotinin konsantrasyonlarının günlük içilen sigara sayısı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Muranaka, Higashi, Itani ve Shimizu, 1988; Swan, Habina, Means, Jobe ve Esposito, 1993).

2.2.1. Nikotinin İmmün Sistem ve Enflamasyon Üzerine Etkisi

Sigara, plak tarafından indüklenen bakteriyel istilada periodontal doku savunmasına zarar verebilir. Tütün dumanına maruz kalma, periodontal savunmada önemli bir rol oynayan polimorfonükleer lökositleri azaltır, değiştirir ve bozar. Bu hücrelerin fagositik fonksiyonlarını bozarak (adezyon, fagositoz ve taksis) periodontal patolojinin prognozunu daha da kötüleştirebileceği rapor edilmiştir (MacFarlane,

Herzberg, Wolff ve Hardie, 1992; Palmer, 1988; Pauletto, Liede, Nieminen, Larjava ve Uitto, 2000; Poore, Johnson, Reinhardt ve Organ, 1995).

Sigara içmenin doğuştan gelen ve bağışıklık sağlayan konak yanıtını farklı mekanizmalarla bozduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Oral veya periferik nötrofilin fonksiyonlarının, fagositoz, süperoksit ve hidrojen peroksit üretimi, integrin ekspresyonu ve proteaz inhibitör üretimi dahil olmak üzere sigara veya nikotin maruziyetinden olumsuz yönde etkilendiği rapor edilmiştir (Barbour ve ark., 1997; Kinane ve Chestnutt, 2000; Lena Persson, Bergström, Ito ve Gustafsson, 2001; Ryder, Fujitaki, Johnson ve Hyun, 1998).

Konak bağışıklık sisteminin bozulması, sigara içenler arasında yüksek oranda periodontitisin oluşumunu ve şiddetini açıklayan bir faktör olabilir. Aslında, kemotaksis, fagositoz ve oksidatif stres oluşumu gibi polimorfonükleer lökosit fonksiyonlarının, sigara dumanındaki maddeler tarafından azaldığı (McGuire ve ark., 1989; Sasagawa, Suzuki, Sakatani ve Fujikura, 1985), ancak tükürük nötrofillerinin aşırı uyarılmasının ise arttığı gösterilmiştir (Numabe ve ark., 1998).

Tütün ürünlerinin, T ve B lenfositlerinin proliferasyonunu ve koruyucu antikor üretimini azaltabileceği bildirilmiştir (Barbour ve ark., 1997). Ayrıca sigara içmenin; fibroblast fonksiyonu (Raulin, McPherson, McQuade ve Hanson, 1988), nötrofillerin kemotaksis, fagositoz (Kenney, Kraal, Saxe ve Jones, 1977; Kraal, Chancellor, Bridges, Bemis ve Hawke, 1977) ve immünoglobulin üretimi üzerinde olumsuz bir etkisi olabileceği düşünülmektedir (P. Holt, 1987; J. D. Johnson, Houchens, Kluwe, Craig ve Fisher, 1990).

Diş eti fibroblastları sigaradan 2 saat sonraki süreç boyunca nikotini emebilir ve serbest bırakabilir. Bazı raporlar; nikotinin fibroblast adezyonu, çoğalması, fibronektin

ve kollajen üretimi ve bunlara ek olarak artmış kollajenaz aktivitesini inhibe etmekle ilişkili olabileceğini bildirilmişlerdir (Raulin ve ark., 1988; Tipton ve Dabbous, 1995).

Sigaranın DOS'ta yüksek seviyelerdeki ICAM-1 ve elastaz gibi enzimler yoluyla doku yıkıcı etkisini gösterebileceği bildirilmiştir (Palmer ve ark., 1999; Rezavandi, Palmer, Odell, Scott ve Wilson, 2002). Böyle bir mekanizmanın olası etkisi, proteaz inhibitör moleküllerinin α -1 antitripsin ve α -2 makroglobülininin sigara içicilerinde baskılanabileceği, elastaz gibi bazı proteazların yıkıcı etkisinin ise artabileceği bildirilmiştir (Palmer ve ark., 1999; L Persson, Bergström, Gustafsson ve Asman, 1999; Lena Persson ve ark., 2001).

Ek olarak, bazı sitokinlerin DOS'taki seviyeleri sigara içicilerinde değişiklikler göstermektedir. Tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve İnterlökin (IL-8), sigara içenlerde artmış gibi görünmekte iken, IL-4 ve IL-1 seviyelerinin ise baskılandığı rapor edilmiştir (Boström, Linder ve Bergström, 1998, 1999; Giannopoulou, Cappuyns ve Mombelli, 2003; Giannopoulou, Kamma ve Mombelli, 2003).

Sigaranın Prostaglandin E2 (PGE2) ve IL-1 β gibi kemik rezorpsiyonu ile ilişkili medyatörlerin salınımını arttırarak kemik metabolizmasını etkilediği ve böylece periodontal hastalığa yatkınlığı arttırdığı rapor edilmiştir (Payne ve ark., 1996). Yine benzer çalışmalarda nikotinin IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 ve IL-15 salınımını arttırdığı bildirilmiştir (G. K. Johnson, Guthmiller, Joly, Organ ve Dawson, 2010; Mahanonda ve ark., 2009).

Makrofajlar hem hücre aracılı bağışıklık hem de humoral bağışıklıkta antijen sunan hücreler olarak önemli roller oynar. Bununla birlikte antijenler, sınıf II majör doku uygunluk kompleksi (MHCII) yüzey molekülleri olarak sunulmaktadır. Sigara içenlerde alveolar makrofajların, sınıf II MHC'nin azalmış ekspresyonunu gösterdiği

bildirilmiştir (Mancini ve ark., 1993; Pankow, Neumann, Rüschoff, Schröder ve von Wichert, 1991).

Sigara içilmesinin genel olarak serum IgG konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Andersen, Pedersen, Bach ve Bonde, 1982; Ferson, Edwards, Lind, Milton ve Hersey, 1979; Gulsvik ve Fagerhol, 1979; Hersey, Prendergast ve Edwards, 1983; Robertson, Boyd, Collins ve Davis, 1984). Sigara içmenin belirli IgG alt sınıflarının konsantrasyonlarını değiştirdiği bildirilmiştir (Gunsolley, Pandey, Quinn, Tew ve Schenkein, 1997).

Tew ve ark.'ları da sigara içenlerin periodontal patojenlere karşı immün yanıtlarda rol oynayan önemli bir immunoglobulin izotipi olan serum IgG2 seviyelerinin azalmış olduğunu rapor etmiştir (Tew ve ark., 1996; J. Zambon ve ark., 1996).

2.3. Sigara İle İlişkili Sistemik Hastalıklar

Sigaranın akciğer kanseri, diğer kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, hamilelik komplikasyonları ve osteoporöz gibi hastalıklar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2013).

Pasif içicilik solunum hastalıkları, akciğer kanseri, hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları ile ilişkilendirilmiş ve pasif içiciliğe maruz kalma oranı azaldıkça, akut myokardiyal enfarktüs oluşma olasılığının da azaldığı bildirilmiştir (Abuse, 2006; Moimaz, Zina, Saliba ve Garbin, 2009; Shea ve Steiner, 2008).

Hamilelik sırasında sigara kullanıldığında, sigaranın zararlı komponentlerinin direkt plasenta yoluyla fetuse geçtiği ve fetuste yüksek oranda kotinin biriktiği bunun

sonucunda da fetusun astım ve solunum yolu hastalıkları açısından risk altına girdiği tespit edilmiştir (Pietinalho, Pelkonen ve Rytälä, 2009).

Sigara içme ile akciğer hastalığı arasındaki nedensel ilişki 50 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir, ancak henüz mekanizması tanımlanmamıştır. Sigara içmek birçok seviyede etki edebileceğinden, çeşitli potansiyel mekanizmalar mümkündür. Sigara içmenin enflamatuvar yanıt ve semptomlarla etkileşiminin nikotin ile sağlandığı düşünülmektedir (Mavropoulos ve ark., 2003; Mosely, Finseth ve Goody, 1978).

2.4. SİGARA VE HİPOKSI

Sigara nedeniyle oluşan periferik kan damarlarındaki vazokonstriksiyon, periodontal dokuları da etkilemektedir. Azalmış kan akımına bağlı olarak sigara içenlerde, içmeyenlere göre diş eti hastalıklarının belirtilerinin daha az görünür hale geldiği bulunmuştur. Ayrıca bu vazokonstriksiyonun tüm dokulara gelen kan ve oksijen miktarının azalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2013).

Hipoksinin hücresel düzeydeki etkilerinin açığa çıkmasındaki temel aracı molekül HIF molekülüdür. İlk kez Semenza ve Wang'ın 1992 yılında yaptığı öncü çalışma ile Hep38 insan hepatoma hücrelerinin nükleuslarında bulunmuştur (Semenza ve Wang, 1992).

Hipoksi, düşük oksijen koşullarına hücresel ve doku adaptasyonunda önemli olan birkaç geni aktive eder. Hücreler bu stresli duruma cevap veremiyorsa, en sonunda apoptoza uğrarlar. Ne var ki, insanlar hipoksiye yanıtı hızlı ve etkin bir şekilde gerçekleştirir. Bu olumlu tepkiye esas olarak HIF-1 aracılık eder.

Bir heterodimerik transkripsiyon faktörü olan HIF-1'in, 1992'de hipoksik koşullarda eritropoetin ekspresyonundan sorumlu olduğu keşfedilmesinden bu yana, 60'tan fazla genin HIF-1 tarafından indüklendiği bulunmuştur (L. E. Huang, Arany, Livingston ve Bunn, 1996; Salceda ve Caro, 1997; Semenza, 2003).

Bu genler, hücre canlılığı, hücre çoğalması, apoptoz, glikoz metabolizması ve anjiyogenez gibi birçok farklı hücresel fonksiyonda rol oynar. Hipoksi, HIF-1'in aktive edildiği ana yol olsa bile, bazı hipoksik olmayan uyaranların da bu transkripsiyon faktörünü etkileyebildiğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (Feldser ve ark., 1999). Bu uyaranlara büyüme faktörleri, sitokinler, vasküler hormonlar ve viral proteinler dahildir. İlginç bir şekilde, HIF-1'in hipoksik ve hipoksik olmayan koşullarda aktifleştirilmesinde rol oynayan mekanizmaların farklı olduğu bulunmuştur (Déry, Michaud ve Richard, 2005; Feldser ve ark., 1999; Richard, Berra ve Pouyssegur, 2000).

HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β alt brimleri olan oksijene bağlı bir transkripsiyonel aktivatördür. İki alt ünitesinin de sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgeleri içerdiği bilinmektedir (Wang, Jiang, Rue ve Semenza, 1995). HIF molekülü, α (O_2 'ye bağımlı, O_2 'den bağımsız) ve β (O_2 'den bağımsız) alt birimlerinden oluşan heterodimer yapısında bir transkripsiyon faktörüdür (Akat ve Fıçıcılar).

HIF α 'nın üç adet izoformu bulunur. Bunlar HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α 'dır. HIF-1 β , hücrede hipoksiden bağımsız ve yoğun olarak eksprese edilirken HIF-1 α oksijen varlığında PHD'ler tarafından hızla degrade edilir, bu nedenle HIF molekülünün oluşumunda HIF-1 α miktarının hız kısıtlayıcı basamak olduğu bildirilmiştir (Jiang, Semenza, Bauer ve Marti, 1996).

Oksijen seviyeleri, HIF-1 α 'nın protein stabilizasyonunu, hücre içi lokalizasyonunu ve transkripsiyonunu etkilerken; β (ARNT) alt birimi yapısal olarak eksprese edilir ve oksijen seviyelerinden etkilenmediği rapor edilmiştir (H. Li, Ko ve Whitlock, 1996).

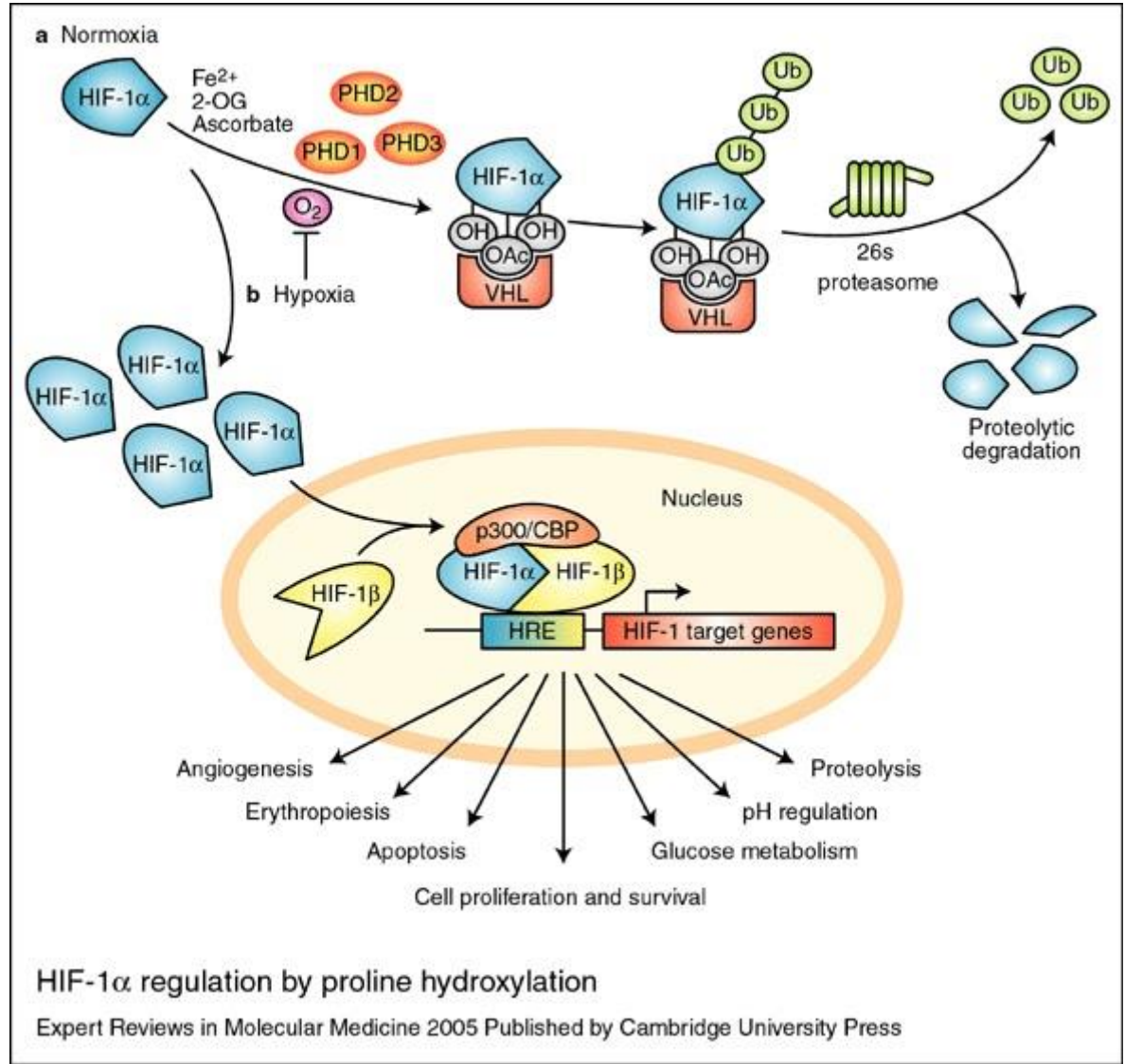
Hipoksik koşullarda oksijeni bir kofaktör olarak kullanan PHD enzimi inaktif hale gelir ve degradasyondan kurtulan HIF-1 α , β alt birimi ile birleşerek HIF-1 molekülünü oluşturur. Bu olaya “HIF stabilizasyonu” adı verilir. Stabilize olan HIF-1 molekülü genomda bulunan HRE (hipoksi ile regüle olan element) bölgeleri üzerinde etkili olarak hücredeki birçok proteinin transkripsiyonunu modifiye edeceği bildirilmiştir (Rabinowitz, 2013).

Semenza ve ark.'nın yaptıkları çalışmada oksijen konsantrasyonunun % 20'den % 0,5'e düşmesinin HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimlerinin bağlanma hızını arttırdığı rapor edilmiştir (Semenza ve ark., 1997).

HIF heterodimerinde HIF-1 α veya HIF-2 α 'daki prolin parçalarının PHD'ler tarafından oksijene bağlı hidroksilasyonu, E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan Von Hippel-Lindau (VHL) gen ürünü için bir bağlanma bölgesi oluşturur (Kaelin Jr, 2007).

pVHL-ODD bağlanması ve takip eden modifikasyonlar molekülün ubiquitin-ligaz kompleksi ile ilişki kurarak ubiquitinlenmesine yol açar. Çoklu ubiquitinlenmenin 26S ribozomlar için bir etiket oluşturarak HIF- α 'nın proteozomal degradasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Cockman ve ark., 2000; Tanimoto, Makino, Pereira ve Poellinger, 2000).

Ek olarak, HIF-1 α veya HIF-2 α 'nın oksijene bağımlı bir asparagin hidroksilaz ile hidroksilasyonu HIF'in transkripsiyonel aktivitesini azaltır (Coleman ve Ratcliffe, 2009).

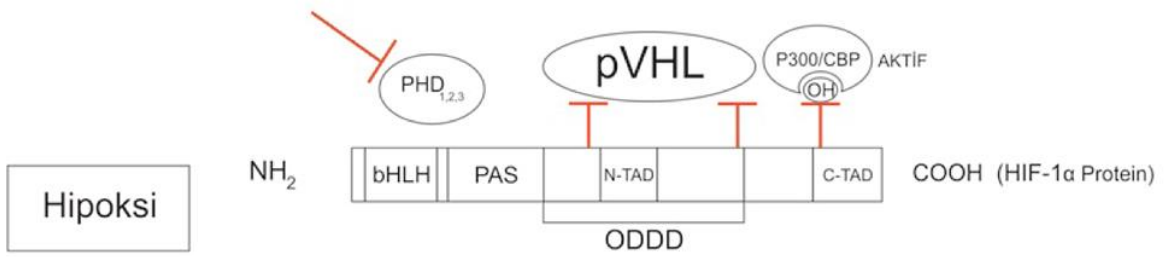


Şekil 2.4. 1:HIF-1 α 'nın prolin hidroksilasyonu tarafından düzenlenmesi (Storti, 2013)

2.4.1. HIF-1 Protein Yapısı

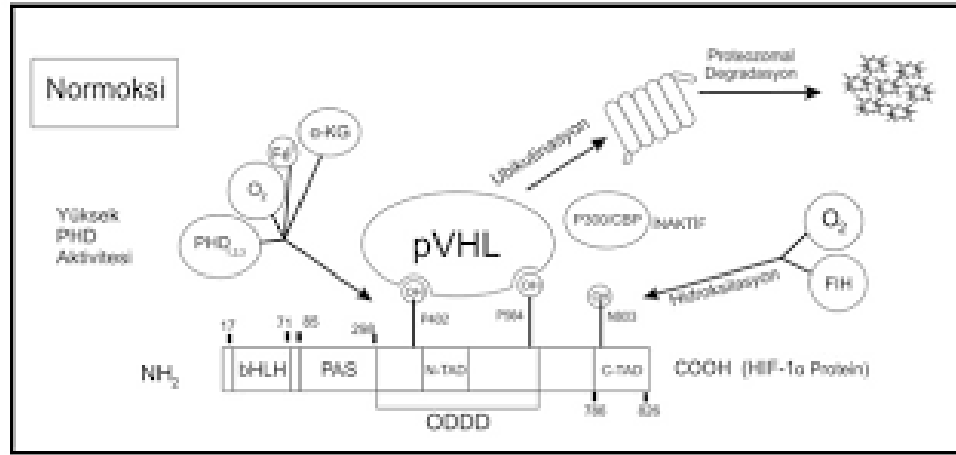
Sadece bir heterodimer olarak aktif olan HIF-1 iki alt birimden oluşur: HIF-1 α ve HIF-1 β . HIF-1 β , bütün oksijenize ortamdaki hücrelerde kolayca bulunurken, HIF-1 α normal oksijen koşullarında hemen hemen tespit edilemez. HIF-1 transkripsiyonel kompleksinin işlevsel olması için, HIF-1 α seviyelerinin indüklenmesi gerektiği bildirilmiştir (L. E. Huang, Gu, Schau ve Bunn, 1998).

İnsan HIF-1 α geni, kromozom 14 (14q21-q24) üzerinde bulunurken; HIF-1 β geni, kromozom 1 (1q21) üzerinde bulunur. Homoloji, HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimleri için nispeten iyi bir şekilde korunmuştur, insan ve sıçan arasında % 90'ın üzerinde bir benzerlik vardır. HIF-1 α ve HIF-1 β , sırasıyla 826 ve 789 aminoasitten oluşan, nispeten büyük proteinlerdir. Her iki protein de nükleer lokalizasyon sinyalleri ve temel bir sarmal-ilmek-sarmal motifini (bHLH) içerir. Temel bölge DNA bağlanması için esastır, HLH alanı ise alt birim dimerizasyonundan sorumludur. Her iki proteinin ortak bir özelliği, PER-ARNT-SİM (PAS) alanıdır. HIF-1 α , oksijene bağımlı bozunma alanı (ODD) dahil olmak üzere bazı ilginç benzersiz özelliklere sahiptir. 401-603 aminoasitleri arasında bulunan bu bölgenin yüksek oranda oksijene duyarlı olduğu bildirilmiştir (L. E. Huang ve ark., 1998)



Şekil 2.4.1. 1:Hipoksik koşullarda HIF-1 α 'nın stabilizasyonu (Demirel ve Çetinkaya, 2014)

Normal oksijen koşullarında yüksek derecede kararsız bir protein olan normokside HIF-1 α 'nın spesifik olarak bozunması bu alan üzerinden tetiklenir. HIF-1 α ayrıca HIF-1 hedef genlerinin transkripsiyonel düzenlemesinden sorumlu olan iki işlem alanı (TAD) içerir. HIF-1 α 'nın N-terminali TAD kalıntısı 531-575 aminoasitleri arasında bulunurken, bir C-terminali TAD kalıntısı 813-826 aminoasitleri arasında kalan proteinin en sonunda bulunur. Bu TAD'ler ayrıca HIF-1'in transkripsiyon aktivasyonu için gerekli olan p300 / CBP ve Ref-1 gibi koaktivatörlerin bağlanmasına da katılırlar. HIF-1 ayrıca bir TAD içerir, ancak bu etki alanının HIF-1'in transkripsiyonel aktivitesi için gereksiz olduğu gösterilmiştir. Her iki alt birim de benzer olsa bile, oksijen duyarlılığı ve işlem kabiliyetindeki çarpıcı farklılıklar ile HIF-1 α 'yı HIF-1 kompleksinin ana fonksiyonel proteini olarak açıkça tanımlanacağı bildirilmiştir (Déry ve ark., 2005).



Şekil 2.4.1. 2:HIF-1 α 'nın normoksik koşullardaki proteozomal degradasyonu (Demirel ve Çetinkaya, 2014)

2.4.2. HIF-1'in Hipoksi ile Aktivasyonu

Oksijen, aktif hücresel işlevlerin çoğunluğu için enerji kaynağı olan ATP'nin üretildiği, aerobik glikoz metabolizmasında son elektron alıcısıdır. HIF bu, transkripsiyonel regülatör oksijen desteğini artıran ve anaerobik ATP üretimini destekleyen birçok adaptif genin indüksiyonuna aracılık eder. Bu genlerin, glikoz transporter-1 (GLUT-1), glikolitik enzimler, VEGF ve eritropoetini (EPO) kodlayan genleri içerdiği bildirilmiştir (Chavez, Miranda, Pichiule ve Chavez, 2008; Kaelin Jr ve Ratcliffe, 2008; Taylor, 2008).

Birçok hipoksi ile indüklenen hedef gen ürünleri glikolizi düzenler. GLUT-1, beyin endotelial hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve MSS'ye glikoz girişinde kritiktir. Laktat dehidrogenaz-1 gibi enzimler, krebs siklusuna glikoliz yolu ile ATP üretimini artırır. HIF-1 α , ayrıca siklooksijenaz (COX 4-1) ünitesini daha etkin olan

COX 4-2 ünitesi ile değiştirerek, kompleks IV seviyesinde aerobik solunumu düzenlediği ve artmış mitokondriyal solunuma neden olduğu bildirilmiştir (Chavez ve ark., 2008; Kaelin Jr ve Ratcliffe, 2008; Taylor, 2008).

HIF-1 α geni temel olarak Sp1 transkripsiyon faktörünün etkisiyle yapısal olarak eksprese edilir. AP-1, AP-2, NF-1 ve NF-KB gibi transkripsiyon faktörleri için diğer bağlanma bölgeleri de HIF-1 α geninin promoter bölgesinde bulunur. Hipoksi sırasında, HIF-1 α 'nın etkili protein translasyonu, HIF-1 α geninin 5 'çevrilmemiş bölgesinde (5'-UTR) bulunan bir ribozom giriş bölgesinin (IRES) varlığı ile sağlanır (Lang, Kappel ve Goodall, 2002).

Bu nedenle, transkripsiyon ve translasyon normoksiden hipoksiye geçişle değişmeden kalır. HIF-1 α , yarı ömrü 5 dakikadan az olan normoksida son derece değişken bir proteindir. Oksijen mevcudiyeti azalırsa HIF-1 α 'nın hızlı ve sürekli bozulmasının etkili bir şekilde engellendiği bulunmuştur (Déry ve ark., 2005).

Hipoksi, proteazom tarafından hızlı bir şekilde bozulmasının inhibe edilmesi yoluyla HIF-1 α 'yı kuvvetli bir şekilde stabilize ederek hücrelerdeki HIF-1 seviyelerini artırır. Bu, aktif HIF-1 kompleksini oluşturmak için HIF-1 β ile dimerizasyona izin verir. Son birkaç yılda, hipoksidedeki HIF-1 α stabilizasyonundan sorumlu bir yol bulunmuştur. Oksijen mevcut olduğunda, HIF-1 α belirli artıklar üzerinde hidroksile edilir. Prolin 402 ve 564 üzerindeki hidroksilasyon, üç spesifik oksijene bağımlı prolin hidroksilaz (PHD)1-3 ile elde edilir. HIF-1 α 'nın PHD'ler tarafından tam enzimatik hidroksilasyonu için demir, oksijen ve 2-oksanoatrat varlığı gerekli olduğu bildirilmiştir (Schofield ve Ratcliffe, 2004).

Son zamanlarda yapılan bir çalışma da, normokside HIF-1 α bozulmasında PHD 2'nin oynadığı geri dönülmez rolü göstermiştir. Berra ve arkadaşlarının RNA çalışmaları, PHD2'nin hücrel yıkılmasının, normokside HIF-1 α stabilizasyonuna ve HIF-1 kompleks oluşumuna yol açtığını göstermiştir (Berra ve ark., 2003).

Hidroksillenmiş HIF-1 α , von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geninin ürünü ve E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir tanıma bileşeni olan pVHL ile tanınır. Bu, daha sonra proteazomal bozulma için hedeflenen HIF-1 α 'nın bulunmasını teşvik eder. Ek olarak, normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın lizin asetilasyonu ayrıca proteazomun parçalanması için HIF-1 α 'yı da hedefler. Hipoksik koşullar altında, HIF-1 α 'nın PHD'leri bloke edilir ve HIF-1 α protein stabilizasyonuna izin verilir. HIF-1 α , HIF-1 β ile bağlanmakta ve HIF-1 transkripsiyon kompleksi oluşturmakta serbesttir. Heterodimer daha sonra yukarıda belirtilen genlerde promotör bölgeleri içeren HRE'ye bağlanabileceği ve ekspresyonunu arttırabileceği rapor edilmiştir (Déry ve ark., 2005).

2.4.3. HIF-1'in Hipoksik Olmayan Uyarıcılar ile Aktivasyonu

Büyüme faktörleri (Feldser ve ark., 1999), sitokinler (Hellwig-Bürgel, Rutkowski, Metzen, Fandrey ve Jelkmann, 1999), vasküler hormonlar (Gorlach ve ark., 2001) ve viral proteinler ile farklı hücre tiplerinin uyarılmasının, HIF-1'in indüklenmesine ve aktivasyonuna yol açabileceği bulunmuştur (E.-J. Moon ve ark., 2004).

Hipoksinin aksine, HIF-1 α 'nın stabilizasyonu, HIF-1'in hipoksik olmayan indüksiyonunda rol oynamıyor gibi görünmektedir. Bu indüksiyonda yer alan ana mekanizma, HIF-1 α protein translasyonunda bir artıştır. HIF-1 α 'nın bozulmasının,

HIF-1'in hipoksik olmayan aktivasyonu altında inhibe edildiği düşünülmemektedir (Déry ve ark., 2005).

Ek olarak, pro-enflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β 'in, HIF-1'in normoksik koşullar altında aktivasyonunu arttırdığı da bildirilmiştir (Hellwig-Bürgel ve ark., 1999).

2.4.4. HIF-1'in Biyolojik Fonksiyonları

Trombin vasküler düz kas hücreleri de HIF-1'i aktive etmesi ve HIF-1'in anjiyogenezdeki etkisini göstermesinden ötürü, HIF-1'in bu koşullarda yara iyileşmesine ve doku tamirine katkıda bulunabileceğine inanılmaktadır. Son çalışmalar, iltihaplanma ile HIF-1 ekspresyonunun aktivasyonu arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Cramer ve ark., 2003).

Lipopolisakkaritlerin (LPS) makrofajlarda HIF-1'i güçlü bir şekilde indükleyebildiği gerçeği göz önüne alındığında, HIF-1'in LPS aracılı enflamasyonda bir rol oynadığını göstermektedir (Blouin, Pagé, Soucy ve Richard, 2004).

2.5. Prolil Hidroksilazlar

PHD'lar, demir ve 2-oksanotarat bağımlı dioksijenazlar grubunda yer alan, moleküler oksijeni kofaktör olarak kullanan, oksijen varlığında HIF- α alt birimini degrade eden enzim yapılı moleküllerdir. Hücrel oksijen homeostazında ve hipoksiye

verilen HIF cevabında önemli bir yere sahip oldukları bildirilmiştir (Berra, Ginouvès ve Pouysségur, 2006).

Bu enzimler, O₂-algılama fonksiyonları için moleküler temeli sağlayan bir ortak substrat olarak O₂'ye ihtiyaç duyarlar. Hidroksilasyon reaksiyonunda, bir oksijen atomu, hidroksiprolin oluşturmak için bir peptidil proline eklenirken, diğeri 2-oksanotarati süksine dönüştüren bir dekarboksilasyon reaksiyonunda kullanılır. Bu nedenle, PHD'lere aynı zamanda bir yardımcı madde olarak 2-oksanotarat gerekir (Berra ve ark., 2006). Aynı şekilde, PHD'ler de ortak faktörler olarak Fe⁺² ve askorbat kullanırlar. Fe⁺² O₂'nin aktive edilmesi ve reaktiflerin düzenli bağlanması için bir şablon olarak çok önemlidir. Askorbat, dekarboksilasyon reaksiyonundan sonra enzimin aktif bölgesine bağlanan Fe⁺³ iyonunu azaltarak etki gösterir ve bu nedenle tekrar aktive edilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Berra ve ark., 2006).

PHD'ler, HIF'lerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. PHD'ler, sitozolik oksijenin konsantrasyonunu algıladıkları sürece in vivo oksijen sensörleri olarak kabul edilir. Normoksi altında, PHD'ler, ubiquitin E3 ligaz tarafından tanınan ODD içinde yer alan ve yüksek oranda korunmuş iki prolin tortusunu hidroksiller ve bozunma için proteazomlara yönlendirir. Hipoksi altında, PHD aktivitesi, bir kosubstrat olarak moleküler oksijene olan ihtiyaçlarından dolayı azalır (Koivunen ve ark., 2007). PHD alt ailesinin üç izoformu (PHD1, PHD2 ve PHD3) olduğu düşünülmekteydi (Akat ve Fıçıcılar).

Ancak sonradan, PHD4 veya P4H-TM adlı bir transmembran alana sahip olan yakın zamanda karakterize edilmiş bir prolin 4-hidroksilazın, PHD alt ailesinin dördüncü üyesi olduğu bulunmuştur (Koivunen ve ark., 2007). Dördüncü PHD izoformu olarak

PHD ile ilişkili protein (PH-4) tanımlanmış olmakla birlikte fonksiyonu ile ilgili bilgiler henüz çok yeterli değildir (Oehme ve ark., 2002).

PHD1, PHD2 ve PHD3 tüm dokularda değişik seviyelerde bulunabilir (Berra ve ark., 2006). Hem PHD2, hem de PHD3 hipoksi ile indüklenebilir özelliktedir (Metzen ve ark., 2005; Stiehl ve ark., 2006). PHD2, çoğu hücre tipinde hem ekspresyon hem de katalitik aktivite açısından ana izoformdur (Berra ve ark., 2003). Özellikle normokside çok düşük seviyelerde eksprese edilen PHD3'ün, hipoksi ile birlikte katlanarak artmakta olduğu bildirilmiştir (Appelhoff ve ark., 2004).

PHD'ler hem nükleusta hem de sitoplazmada katalitik aktivite gösterebilirler (Berra, Roux, Richard ve Pouysségur, 2001). Willam ve ark.'nın çalışması ile kalpte her üç izoformun da varlığı gösterilmiştir (Willam ve ark., 2006). Kalpte en yoğun bulunan izoform PHD2'dir, onu sırayla PHD3 ve PHD1 izler. Yapılan çalışmalar PHD1'in büyük oranda nükleusta PHD2'nin ise sitoplazmada bulunduğunu göstermekte, ayrıca sitoplazma nükleus arasında geçişin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. PHD3'ün sitoplazma ve nükleusa dağılımının eşit olduğu kabul edilmektedir (Berra ve ark., 2003).

PHD3'ün de iki adet alternatif transkripsiyon varyantı bulunmaktadır (Cervera ve ark., 2006). PHD3'ün nöral gelişim, bağışıklık, hücre migrasyonu ve apoptoziste de etkili olduğu ve kas dokusu dışındaki aktin moleküllerinin prolin rezidülerini hidrosillemek suretiyle filamentöz aktin oluşumunu arttırarak hücre motilitesini etkilediği bilinmektedir (Luo ve ark., 2014; Place ve Domann, 2013).

Hidroksilaz aktivitesinin yanı sıra, PHD3 birçok sinyal yolağında iskele proteini (scaffolding protein) olarak görev yapmaktadır (Garvalov ve ark., 2014; Luo ve ark., 2011).

Hepsinin HIF- α 'nin özel prolin kalıntılarını hidroksilasyon kabiliyeti vardır, ancak substrat özelliklerinde ve doku ve hücrelerde dağılımlarında farklılık gösterir. PHD2'nin HIF-1 α 'da HIF-2 α 'ya göre daha aktif olduğu, PHD1 ve PHD3'ün HIF-2 α 'da daha aktif olduğu bildirilmiştir (Appelhoff ve ark., 2004).

PHD2'nin normokside HIF-1 α 'nın düşük kararlı durum seviyelerini belirleyen hız sınırlayıcı enzim olduğu için baskın bir rolü olduğu gösterilmiştir (Berra ve ark., 2003). İlginçtir ki, PHD'ler HIF- α protein stabilitesini düzenlerken, PHD2 ve PHD3 (PHD1 hariç) kendileri HIF'ler tarafından geri beslenme düzenlemelerine tabi tutulurlar. Çalışmalar, PHD2 geninin HIF-1 α tarafından tanınabilen bir HRE ve PHD3 geninin HIF-2 α tarafından tanınan bir HRE içerdiğini bildirmiştir (Metzen ve ark., 2005; Pescador ve ark., 2005).

Hipoksi altında, HIF- α birikimine bağlı olarak PHD2 ve PHD3'ün artacağı bildirilmiştir (D'Angelo, Duplan, Boyer, Vigne ve Frelon, 2003; Marxsen ve ark., 2004; Stiehl ve ark., 2006).

Aslında, PHD'lerin hipoksik indüksiyonu HIF-1'e bağımlıdır (del Peso ve diğerleri, 2003). HIF-1 α veya HIF-2 α 'nın susturulması, hipoksiye bağlı PHD3 ekspresyonunun azalmasına neden olur. Aksine, PHD2'nin HIF-2 α 'dan etkilenmediği bildirilmiştir (Aprelikova ve ark., 2004).

Özellikle normokside çok düşük seviyelerde eksprese edilen PHD3'ün, hipoksi ile birlikte katlanarak artacağı bildirilmiştir (Appelhoff ve ark., 2004).

İn vitro analize rağmen, memeli hücrelerinde yüksek oranda korunan üç PHD'nin varlığı, her bir PHD'nin in vivo olarak HIF düzenlemesine katkıda bulunup bulunmadığı konusunda önemli sorular doğurmuştur. Şimdi, her üç PHD proteininin HIF- α 'yı düzenlediği bilinmektedir (Appelhoff ve ark., 2004).

PHD enzimlerinin substratı, HIF molekülünün α alt birimidir. PHD2 diğer izoformlara göre çok yüksek katalitik aktiviteye sahiptir, onu PHD3 ve PHD1 izler. Ancak bazı çalışmalar PHD2 ve PHD3'ün eşit düzeyde aktiviteye sahip olduğunu PHD1'in ise bu iki izoforma göre düşük aktivite gösterdiğini bildirmektedir (J. Huang, Zhao, Mooney ve Lee, 2002; Tuckerman ve ark., 2004).

2.6. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan VEGF ailesi, endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir ve önemli etkileri vardır (Yazır, Gonca, Filiz ve Dalçık). VEGF, endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna aracılık eder (Bikfalvi, 2004). VEGF'nin, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinlerde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gerekli olduğu bildirilmiştir (Shalaby ve ark., 1995).

VEGF ailesi şu anda yedi üyeden oluşur: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF (plasenta benzeri büyüme faktörünü içeren bir büyüme faktörü). Bütün üyeler ortak bir VEGF homoloji alanına sahiptir (Hoeben ve ark., 2004). VEGF-A, 34 ila 42-kDa, dimerik, disülfür bağlı bir glikoproteindir. Normal dokularda en yüksek VEGF-A mRNA seviyeleri erişkin akciğer, böbrek, kalp ve böbreküstü bezlerinde bulunur. Karaciğer, dalak ve mide mukozasında VEGF-A düşük

seviyelerdedir ancak yine de kolayca saptanabilir. VEGF-A, en az yedi homodimerik izoformda bulunur. Monomerler 121, 145, 148, 165, 183, 189 veya 206 aminoasitten oluştuğu rapor edilmiştir (Hoeben ve ark., 2004).

VEGF-A, endotelial hücre spesifik mitojenik etkileri olduğu bulunan ilk salgılanan büyüme faktörüdür. Endotel hücre proliferasyonuna ek olarak, aynı zamanda anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre göçünü ve vasküler geçirgenliği teşvik eder. Farelerde hedeflenen gen bozulması deneyleri, tek bir VEGF alelinin (hemizigosit) kaybının bile vaskülojenizde VEGF için doz bağımlı bir gereklilik gösteren vasküler anomalileri olan bir embriyonik öldürücü fenotipe yol açtığını göstermiştir (Ferrara, 2004).

VEGF-B 1995 yılında keşfedilmiştir. Yetişkin miyokardiyum, iskelet kası ve pankreasında çok miktarda eksprese edilir. VEGF-B geni yedi ekzondan oluşur. Ekzon 3 ve 4, 2 disülfür köprülü bir sistein düğüm motifinden sorumlu olan, değişmeyen sistein kalıntılarını kodladığı rapor edilmiştir (Hoeben ve ark., 2004).

Yetişkin dokularda VEGF-C en çok kalp, plasenta, yumurtalık, ince bağırsak ve tiroid bezinde bulunur, embriyonal dokudaki ekspresyonu ise, lenfatik damarların, perimetaneфриk, aksiller, juguler bölgelerinde gerçekleşir. VEGF-C geni, 40 kb'den fazla DNA'ya yayılır ve yedi ekzondan oluşur. VEGF-C'nin VEGF homoloji zinciri, ekzon 3 ve 4 tarafından kodlanır, ekzon 5 ve 7 ise sistein bakımından zengin motifleri kodladığı bildirilmiştir (Hoeben ve ark., 2004).

VEGF-D, yetişkin dokularında, özellikle akciğer, kalp, iskelet kası, kolon ve ince bağırsakta bulunur. Embriyonal dokularda, gelişmekte olan akciğerde bol miktarda

bulunduğu bildirilmiştir (X. Li ve Eriksson, 2001; Ort ga, Hutchings ve Plou t, 1999; Yamada, Nezu, Shimane ve Hirata, 1997) .

 nsan dışı bir faktör olan "VEGF-E", Orf parapoxvir s  tarafından kodlanır. "VEGF-E", kemotaksisi, proliferasyonu ve kültür edilmiş vasküler endotel hücrelerinin türemesini ve in vivo anjiyogenezi stimüle eder. "VEGF-E", VEGFR2'ye yüksek afinite ile bağlanır, ancak VEGF reseptörü-1'e (VEGFR1) bağlanamaz. Bu faktör, parapoxvir s  ile enfekte olmuş lezyonlarla ilişkili anjiyogenezi destekler. "VEGF-E'nin" vasküler geçirgenlik aktivitesi "VEGF'nin" aktivitesine benzer olduğu rapor edilmiştir (Roskoski Jr, 2007).

PIGF insanda dört izoform halinde bulunur, ancak farelerde sadece bir tane (PIGF-2) bulunur. PIGF plasentada fazla miktarda; kalpte, akciğerlerde ve iskelet kaslarında ise daha düşük seviyelerde eksprese edilir. PIGF birçok açıdan VEGF-B'ye çok benzer olmakla birlikte, anjiyogenez ve arteriyogenez üzerindeki etkileri önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. PIGF, "VEGF'ye" benzer bir verimlilikte, iskemik kalp ve ekstremitelerdeki anjiyogenez ve kolateral damar büyümesini uyarabilmektedir. Aynı zamanda, damar geçirgenliğini ve inflamasyonu arttıcı etkisi bulunmaktadır (Bry, Kivel , Lepp nen ve Alitalo, 2014).

VEGF ekspresyonun, hipoksiye yanıt olarak artmasına iki mekanizma aracılık eder. İlk mekanizmaya göre; hipoksi, VEGF gen transkripsiyonunun aktivasyonunu, HIF bağımlı bir mekanizma vasıtasıyla HIF-1'in VEGF promotörü içindeki bir HRE'ye bağlanmasına aracılık edip indükleyerek, gen transkripsiyonunun artmasına neden olur (Forsythe ve ark., 1996).

İkinci mekanizmada ise; VEGF, mRNA stabilitesini düzenleyerek mRNA seviyelerini yükseltir. Bu etkiye VEGF mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesi aracılık edeceği bildirilmiştir (Onesto, Berra, Grépin ve Pagès, 2004).

VEGF'nin hipoksik indüksiyonunun, hem embriyojeniz hem de tümöral gelişimlerde yeni damar gelişiminin arkasındaki ana itici güç olduğu düşünülmektedir. VEGF'nin gliomalarındaki seviyesi, Glioblastoma (GBM) hastalarının kist serum sıvısındaki seviyelerine göre 200 ila 300 kat daha yüksek bulunmuştur (Takano ve ark., 1996).

Tümör dokusunun in situ hibridizasyonu VEGF'nin GBM'deki hipoksik / nekrotik odakları çevreleyen psödopalizading hücrelerinde lokalize olduğunu ve VEGF mRNA'nın muhtemelen hipoksik indüksiyondan kaynaklandığını göstermiştir. Psödopalizading nekroz alanları çevresinde üretilen yüksek VEGF seviyelerinin, GBM'nin karakteristik olan glomeruloid mikrovasküler proliferasyonundan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Brat ve Van Meir, 2001).

HIF-1'in VEGF ekspresyonundaki rolü iyi bilinmektedir. VEGF'nin anjiyojenik özellikleri önemlidir ancak çalışmalar, sadece VEGF'nin kan damarlarının tam ve normal olgunlaşmasını teşvik etmek için yeterli olmadığını göstermiştir. HIF-1 degradasyonunda yer alan mekanizmaları hedefleyen bazı ilaçların, VEGF, VEGFR2, Plazminojen Aktivatör İnhibitör (PAI-1), Matriks Metalloproteinazlar (MMP), EPO ve insüline benzer büyüme faktörü (IGF-2) gibi anjiyogenez ile ilgili birçok genin ekspresyonuna büyük bir yarar sağladığı bildirilmiştir (Shyu ve ark., 2002).

2.7. Sigara ve Periodontal Mikroflora

Sigara kullanımı ve subgingival mikroorganizmaların oluşumu arasındaki ilişkiyi araştıran ve artan çok sayıda araştırma vardır (Grossi ve ark., 1996; Renvert, Dahlén ve Wikström, 1998; Umeda ve ark., 1998; A. Van Winkelhoff, Bosch-Tijhof, Winkel ve Van der Reijden, 2001).

Sigara içenler ve içmeyenler arasında mikrobiyal kompozisyon açısından çeşitli sonuçların ortaya konduğu çalışmalarda; bazı araştırmacılar sigara içen ve içmeyenler arasında farklılık olduğunu belirtirken (A. Haffajee ve Socransky, 2001; Shiloah, Patters ve Waring, 2000; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001) diğerleri herhangi bir farklılık bulamamıştır (Apatzidou, Riggio ve Kinane, 2005; Buduneli, Baylas, Buduneli, Türkoğlu ve Dahlen, 2005; Natto, Baljoon, Dahlén, ve Bergström, 2005; Salvi ve ark., 2005).

Bu çalışmaların çoğu sigara içenlerin ve sigara içmeyenlerin benzer mikrofloralar barındırdığı sonucuna varmıştır. Bununla birlikte, birkaç çalışma, *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *P. gingivalis* ve *T. denticola* gibi bazı organizmaların sigara içenlerde daha yaygın olabileceğini öne süren sonuçlara ulaştığı rapor edilmiştir (Grossi ve ark., 1996; Shiloah ve ark., 2000; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001).

Sigara içmeyenlerde mevcut olmayan bazı organizmaları sigara içenlerin barındırdığı veya bunun tersi durumda, bazı organizmaların sigara içicilerinde tespit edilmediği gösterilmiştir. Bu periodontopatojenlerden *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia*'larından birinin veya daha fazlasının test edildiği çalışmalarda, 24 testin %62'sinde sigara içen ve içmeyen kişiler arasında

mikrobiyal kompozisyon bakımından bir fark olmadığı rapor edilmiştir (Grossi ve ark., 1996; A. Haffajee ve Socransky, 2001; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001).

Özellikle, bu mikroorganizmaların test edildiği farklı çalışmaların sonuçları karşılaştırılırken, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia*'nın dört testen üçünde sigara içenlerde farklı olmadığı, *T. Forsythia*'nın ise üç testten ikisinde sigara içenlerde daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir.

Kamma ve ark.'ları 60 başlangıç periodontitisli hastaların her birinden 2 plak örneğini incelemek için kültür tekniği kullanmışlar. *Peptostreptokok* mikroskop incelemesi, *Campylobacter concisus*, *B. forsythus*, *C. recta*, *Campylobacter gracilis*, *Selenomonas sputigena* ve *P. gingivalis* oranlarının sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (Kamma, Nakou ve Baehni, 1999).

Zambon ve ark.'ları, farklı sigara öyküsü olan 798 kişiden oluşan bir çalışmada, sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre *T. Forsythia* oranının anlamlı derecede yüksek olduğunu ve enfeksiyon riskinin de daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (J. Zambon ve ark., 1996).

Subgingival mikrobiyal flora incelendiğinde ise, sigara içenler ve içmeyenler arasında derin ceplerden elde edilen periodontopatojenlerin yüzdesi açısından farklılık olmadığı bildirilmiştir (Preber, Bergström ve Linder, 1992; Stoltenberg ve ark., 1993).

Preber ve ark.'ları *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia*'nın belirlenmesinde kültür tekniğini kullanarak yaptıkları bir araştırmada sigara kullanmanın herhangi bir etkisini gözlemlememişlerdir (Preber, Linder ve Bergström, 1995).

Bununla birlikte, Erie County çalışmasından elde edilen veriler, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. forsythensis* için pozitif olan bireylerin oranlarının sigara içenler arasında daha yüksek olduğunu ve sigara içenlerde bazı organizma prevalansının daha yüksek olduğunu gösteren başka çalışmalar da olduğunu göstermişlerdir (Umeda ve ark., 1998; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001; J. Zambon ve ark., 1996).

Periodontal enfeksiyonlarda, Grossi ve ark.'ları iki periodontal patojen olan *T. forsythia* ve *P. gingivalis*'in, sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre mekanik debridmandan sonra daha fazla kaldığını bildirilmiştir (Grossi ve ark., 1996).

Refraktör periodontitis sigara içme ile ilişkilendirilmiştir (MacFarlane ve ark., 1992; Tonetti, 1998). *P. gingivalis* ve *T. forsythia* gibi periodontopatojenlerin cebin derinine invaze olması ve ağız ortamından uzaklaştırılmasının zorlaşması da sebep olarak gösterilmiştir (Grossi ve ark., 1996)

Sigara tüketimi sırasında, ağız içi oksidatif potansiyelin azalmasına bağlı olarak anaerobik bakterilerin sayısında artış olabileceği düşünülmüştür. Sigara içen ve içmeyenlerde subgingival bölgedeki bakteri kolonizasyonunu değerlendiren çalışmalara göre sigara içen bireylerde subgingival bölgedeki *T. forsythia*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *C. recta*, *Bacteroides*, *T. denticola* (Shchipkova ve ark., 2010) ve *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *E. coli*, *C. albicans* oranları yüksek bulunduğu söylenmiştir (Alkan ve ark., 2013; Grossi ve ark., 2007).

2.8. Koagregasyon Modeli

Socransky tarafından 185 bireyden elde edilen 13.261 subgingival plak örneğinin DNA-DNA hibridizasyon tekniği ile incelenmesi sonucu plak örneklerinde

bulunan bakterilerden birbiri ile yoğun ilişki içinde bulunanlar 6 grup altında toplanmıştır (S. S. Socransky, Haffajee, Cugini, Smith ve Kent, 1998).

Buna göre; Actinomyces türleri, Streptokok türlerinden oluşan sarı kompleks, *E. corrodens*, *C. concisus*, *A. actinomycetemcomitans* serotip a ve *Capnocytophaga* türlerinden oluşan yeşil kompleks ve *Veillonella parvula* ve *Actinomyces odontoliticus*'dan oluşan mor kompleks erken kolonizasyon yapan bakteri gruplarıdır. Bu kompleksler sonradan ortama gelecek olan ve daha fazla Gram-negatif mikroorganizmalardan oluşan turuncu ve kırmızı komplekslerin oluşumuna zemin hazırlamaktadırlar. Turuncu kompleks *C. gracilis*, *C. recta*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *F. nucleatum* alt türleri, *Fusobacterium. periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia*, *Provetella nigrescens* ve *Streptococcus constellatus* bakterilerinden oluşmaktadır. *T. forsythia*, *P. gingivalis* ve *T. denticola* kırmızı kompleksi oluşturmaktadır. Yine bu çalışmada turuncu kompleks bakterilerinin ortamda bulunmaması durumunda kırmızı kompleks bakterilerinin nadiren görüldüğü bildirilmiştir (S. S. Socransky ve ark., 1998).

2.9. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)

A. actinomycetemcomitans, fakültatif anaerobik, hareketsiz, sporsuz, küçük gram negatif ve 0,5-1,0 µm. boyutunda bir mikroorganizmadır. Mikroskopik olarak hücreler, özellikle koloniler doğrudan katı ortamdan izole edilmiş ise kokobasiller görülebilir (Henderson, Ward ve Ready, 2010).

A. actinomycetemcomitans'ın virölans faktörleri arasında endotoksin, lökotoxin, fimbria (pili), kollajenaz, fibroblast inhibe eden faktör ve tripsin-benzeri proteolitik enzimler sayılabilir (Tang, Kitten, Munro, Wellman ve Mintz, 2008).

GroEL adı verilen bir antijenik (ısı şok proteini) proteine sahip olduğu, bu proteinin osteoklastları aktive ederek kemik yıkımına neden olduğu bu proteinin bütün serotiplerinin hücre yüzeylerinden salındığı gösterilmiştir (Kirby ve ark., 1995). *Streptococcus sanguis* ve *Streptococcus mitis* gibi bazı mikroorganizmaların bu bakteriye karşı inhibitör etkisi olduğu söylenmiştir (Hillman, Socransky ve Shivers, 1985)

A. actinomycetemcomitans, insanların oral mikrobiyotasının bir üyesi olarak tanımlanmıştır. Periodontitis ve çeşitli oral olmayan enfeksiyonların patolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir (Heinrich ve Pulverer, 1959; A. J. van Winkelhoff ve Slots, 1999; J. J. Zambon, 1985). Bir *A. actinomycetemcomitans* genomunun sekanslanması, bu bakterinin Pasteurellaceae üyeleriyle yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Henderson, Curtis, Seymour ve Donos, 2009; Najar, 2002).

Sürveyans çalışmalarının çoğu, agresif periodontitis tanısı alan genç erişkin hastalarda yüksek düzeyde *A. actinomycetemcomitans* taşıma oranı göstermiştir. Bir çalışmada, lokalize agresif periodontitisi olan hastalarda *A. actinomycetemcomitans*'ın periodontal lezyonların yaklaşık % 95'inde mevcut olduğu gösterilmiştir (Christersson, 1993).

2.10. Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)

P. gingivalis zorunlu anaerobik, kokobasil, yoğun koloniler sergileyen, hareketsiz, asakkarolitik bir mikroorganizmadır. Koloniler, kanlı agar besisi üzerinde başlangıçta beyaz ile krem rengindedir, zamanla (4-8 gün) bu koloniler kenarlarından merkeze doğru koyu kırmızıdan siyah renge doğru koyulaşır, bu durum protohemin konsantrasyonu ile ilişkilidir. *P. gingivalis* türlerinin konak savunmalarından kaçmasına yönelik mekanizmalar sağlayan çok sayıda enzim, protein ve son ürün ürettiği rapor edilmiştir (S. C. Holt, Kesavalu, Walker ve Genco, 1999).

Bu son bileşikler arasında proteinaz inhibitörleri, immünoglobulinler, demir içeren proteinler, bakterisidal proteinler, hücre dışı matriks proteinleri ve kompleman fiksasyonu ve pıhtılaşma gibi fagositik fonksiyonlarla yakından ilişkili proteinler bulunur (Potempa, Pavloff ve Travis, 1995). *P. gingivalis*'in ağız epitel dokusu ile karşılaştığında epitel hücrelerine invazyon göstererek hücrelerden IL-6 salınımını tetiklediği bulunmuştur. IL-6 periodontal hastalık gelişmesinde önemli rolleri olan pro-enflamatuvar bir sitokindir ve osteoklastik aktiviteyi indüklediği söylenmiştir (S. C. Holt ve Bramanti, 1991; Nakatani, Umemoto, Nakamura ve Namikawa, 1994).

P.gingivalis insanlarda hem hücresel hem humoral immün yanıtı değiştirebilir. *P. gingivalis* fimbriasına karşı özellikle periodontitis hastalarında serum IgA ve IgG antikor cevabı oluşur (Zhou ve Windsor, 2006). Fimbria *P. gingivalis*in gerek konak epitel hücrelerine gerekse gram pozitif plak bakterilerine adezyonunda rol almaktadır (Darveau, Tanner ve Page, 1997). *P.gingivalis*'in, gingipainleri aracılığıyla da antikor yanıtı oluşturduğu ve kronik periodontitis hastalarının % 92'sinde serum gingipainine karşı IgG antikor bulundurduğu gösterilmiştir (Kitani ve Strober, 1993).

P. gingivalis'te kapsülün varlığı, birçok araştırmacı tarafından önemli bir anti-fagositik virülans faktörü olarak kabul edilmiştir. Rutenyum kırmızı boyama (asidik mukopolisakkaritlerin varlığı için) ve rutin kurşun asetat boyaması ile birkaç *P. gingivalis* suşunun elektron mikroskopik incelemesi, dış membrana harici bir elektron yoğun tabakanın varlığını ortaya çıkarmıştır. Bazı suşların, bu kalın kapsülden yoksun gibi görünmektedir veya ince bir elektrondan yoğun tabaka ile kaplı olduğu bildirilmiştir (Handley ve Tipler, 1986; Listgarten ve Lai, 1979) .

P. gingivalis'in kapsülü oral patojen olarak işlev görür ve birkaç önemli biyolojik fonksiyonu vardır. Kapsüllü *P. gingivalis* suşları azalmış otoaglutinasyon sergiler ve kapsüllü olmayan suşlara göre daha hidrofilitirler. (Reynolds, Van Winkelhoff, Schifferle, Chen ve Zambon, 1989; Sundqvist, Fıgdor, Hänström, Sörlin ve Sandström, 1991).

2.11. Tannerella forsythia (T. forsythia)

T. forsythia, Cytophaga-Bacteroides ailesinin anaerobik, fusiform özellikli, gram negatif bir üyesidir ve başlangıçta Tanner ve ark.'ları tarafından *B. forsythus* olarak adlandırılmıştır (ACR Tanner, Listgarten, Ebersole ve Strzempko, 1986) ve 16S rRNA filogenetik analizine dayanarak, daha sonra Sakamoto ve ark.'ları tarafından *T. forsythia* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Sakamoto, Suzuki, Umeda, Ishikawa ve Benno, 2002).

T. forsythia'nın kapsülünün bakteriyi fagositozdan koruduğu ve bakterinin epitel hücrelerine invazyonunda önemli rol oynadığı bulunmuştur (A Sharma ve ark., 2005). *T. forsythia*'nın genellikle kronik periodontitis olgularında *P. gingivalis* ile birlikte

şiddetli periodontitis tablosuna yol açtığı ve *T. forsythia* 'nın, özellikle aktif yıkım olan ceplerde daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Suda ve ark., 2004).

T. forsythia; gingivitis ve periodontitis gibi çeşitli periodontal hastalık formlarıyla yüksek seviyelerde ilişkilidir (A. C. Tanner ve Izard, 2006). Virülans faktörleri arasında kapsül, endotoksinler (LPS), tripsin-benzeri proteinaz, apoptozis indükleyici faktör ve β -laktam enzimleri sayılabilir (Munemasa ve ark., 1999; A Sharma ve ark., 2005; Ashu Sharma ve ark., 1998).

2.12. *Treponema denticola* (*T. denticola*)

T. denticola gram negatif, hareketli, asakkarolitik, spiral şekilli anaerobik bir spirokettir (Lindhe, Lang ve Karring, 2009). Sürekli olarak etkileşim halinde olduğu *F. nucleatum* ve *P. gingivalis* ile koagregasyonu ile periodontal yıkımın ilerlemesinde rol oynadığı bulunmuştur (Kuramitsu, Chen ve Ikegami, 2005). Dış membranı fonksiyonel olarak LPS'ye, kimyasal olarak ise gram pozitif lipoteikoik asitlerine benzemektedir (Mineoka ve ark., 2008). *T. denticola*, oral spiroketlerin ürettiği kollajen bağlayan proteinler ile tip I, IV ve V kollajene bağlanır ve bu şekilde de mikroorganizmanın kolonizasyonunda rol alır. *T. denticola* bazı özellikleri ile konak savunmasına karşı koyar ve konak yanıtını azaltır. Bu özellikleri; majör membran proteini ve kimotripsin-benzeri proteaz kompleksi ile konak hücrelerinin metabolik inhibisyonuna neden olması, lenfosit proliferasyonunu azaltması ve lenfositlerde apoptozu tetiklemesi olarak özetlenebilir (Duncan, 2003). Sahip olduğu LPS pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olur. Bu durumun periodontal hastalığın ilerlemesiyle sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (Tal, 1980).

2.13. *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)

P. intermedia gram negatif, anaerobik, filamentöz çomak/pleomorfik basil formda olan periodontopatojendir. Bu organizma, periodontitis (Slots, 1979), hamilelik gingivitis (Riggio, Lennon ve Roy, 1998), akut nekrotizan ülseratif gingivitis ve HIV ile ilişkili gingivitis gibi periodontal hastalıklar geçiren erişkinlerde subgingival bölgelerden sıklıkla izole edilmiştir (Loesche, Syed, Laughon ve Stoll, 1982; Tenenbaum ve ark., 1997).

P. intermedia fosfolipaz A, jelatinaz ve lipaz enzimlerine sahiptir ve bu enzimler ile epitel hücrelerinin bütünlüğünü bozarak dokular arasına invaze olabilir (Socransky, Smith ve Haffajee, 2002). Ig A proteazları, kazein, jelatin, DNA, RNA ve lipidleri hidrolize eden enzimleri salgılayabilmektedir. Ancak *P. intermedia*'nın proteolitik aktivitesi sınırlıdır. *P. intermedia* hemin içeren maddelere bağımlıdır ve bu maddeleri hücre fonksiyonları için kullanır (Tompkins, Wood ve Birchmeier, 1997). *P. intermedia*'nın hemolizin üreterek bu hemolizinleri periferik lökositlerin kemotaktik cevabını inhibe etmek ve diğer ökaryotik hücreleri yok etmek için kullandığı bulunmuştur (Tompkins ve ark., 1997). Ek olarak *P. intermedia*'nın endotoksinlerinin makrofaj ve monositlerden prostoglandin salınımını indüklemesi özelliği de vardır (S. S. Socransky ve ark., 1998). *P. Intermedia*'nın özellikle hamilelikte ve hormonal değişiklikler sonucunda subgingival alanda varlığı artan bir patojen olduğu bildirilmiştir (Jensen, Liljemark ve Bloomquist, 1981).

2.14. *Peptostreptococcus micros* (**P. micros**)

P. micros, birincil yaşam alanı insan ağız boşluğu olan gram pozitif bir anaerobik, asakkarolitik koktur (Cato, Johnson, Hash ve Holdeman, 1983). Virülans faktörleri arasında kapsül yapısı ve hyaluronidaz enzimi olduğu bilinmektedir. Bununla beraber katalaz üretmedikleri ve metabolik ürün olarak laktik asit ürettikleri bilinmektedir. (Jervøe-Storm, Koltzsch, Falk, Dörfler ve Jepsen, 2005; Rams, Feik, Listgarten ve Slots, 1992). Oral kavitede periodontal ve endodontik apse sahalarında sıkça görülürler (Rams ve ark., 1992).

P. micros çoğunlukla periodontal ceplerin daha derin kısımlarında kalan MDP'tan izole edildiği ve esas kolonize oldukları kısımların bu bölgeler olduğu düşünülmektedir (Rams ve ark., 1992). Literatürde *P. micros*'un aktif periodontal yıkımın olduğu bölgelerde daha fazla görüldüğünü bildiren çalışmalar da olduğu bildirilmiştir (A. Van Winkelhoff, Loos, Van Der Reijden ve Van Der Velden, 2002).

P. micros, beyin, peritoneal, karın ve pelvik bölgelerinde bulunur (I Brook, 1989). *P. micros*'un, sepsisemi (Moore, Cato, ve Holdeman, 1980), obstetrik enfeksiyonlar, jinekolojik enfeksiyonlar, kulak enfeksiyonları, sinüs enfeksiyonları (ITZHAK Brook, 1988), vertebral osteomyelit (Papasian, McGregor, Hodges ve Kennedy, 1986), hematogen ve eklem protez enfeksiyonları dahil olmak üzere genellikle vücut bölgelerinde şiddetli polimikrobiyal enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Waldvogel ve Bisno, 2000).

Oral kavitede *P. micros*, endodontik apseler (Itzhak Brook, Grimm ve Kielich, 1981), periodontal apseler (Newman ve Sims, 1979), peritonsiller apseler (Murdoch,

Mitchelmore ve Tabaqchali, 1988), mandibular osteomyelitis (Chow, ROser ve Brady, 1978) ve akut süperatif parotit enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Anthes, Blaser ve Reller, 1981). *P. micros*'un periodontitis patogeneğinde de rol oynadığı bildirilmiştir (Dzink, Socransky ve Haffajee, 1988).

2.15. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)

F. nucleatum gram negatif, anaerobik, hareketsiz, spor formu olmayan, ucu yuvarlak veya nokta şeklinde, basil formunda bir mikroorganizmadır (Newman, Takei, Klokkevold ve Carranza, 2011). Çoğu intraoral mikroorganizma ile yakından ilişkili ve gram pozitif koklarla birlikte oluşturduğu kendine özgü bir yapı olan “corn-cob” mısır püskülü şeklinde kolonizasyonu olduğu bulunmuştur (Y. W. Han ve ark., 2000). *F. nucleatum* bu organizmalar arasında köprü görevi görür ve hatta bu özelliği ile “koagregasyon köprü mikroorganizması” olarak bilinir (Duncan, 2003).

F. nucleatum hastalığın şiddeti, inflamasyonun ilerlemesi ve cep derinliği ile artar (Riep ve ark., 2009; Yang, Zhang, Li, Yang ve Shi, 2014). *F. nucleatum*'un virulans faktörleri fimbria, endotoksin, porin ve fosfolipaz C enzimidir (Albrektsson, Berglundh ve Lindhe, 2003). *F. nucleatum*'un aynı zamanda ağız epitel hücrelerine, eritrositler, fibroblastlar, lenfositler, polimorfonükleer lökositler gibi immün sistem hücrelerine, kollajen IV ve lamininlere tutunma yeteneği de vardır (Y. W. Han ve ark., 2000). Ek olarak sahip olduğu fosfolipaz C enzimi ile konakta doku yıkımına sebep olur (Y. W. Han ve ark., 2000).

Ayrıca sıklıkla pulpa nekrozu ve periapikal periodontitis gibi endodontik enfeksiyonlarla da ilişkilidir (Didilescu ve ark., 2012). *F. nucleatum*'un miktarı çevresel

faktörlerden etkilenir. Sigara içmek hem periodontal olarak sağlıklı hem de periodontal hastalıklı bireylerde sayısını arttırmaktadır (Mason ve ark., 2015; J. H. Moon, Lee ve Lee, 2015).

2.16. *Campylobacter recta* (*C. recta*)

C. recta (eski adıyla *Wolinella recta*) (Vandamme ve ark., 1991), flagella ile hareket kabiliyeti olan küçük, gram negatif, fakültatif anaerobik, sporsuz, kıvrık, düz veya virgül şeklinde mikroorganizmadır (Y.-H. Han, Smibert ve Krieg, 1991; A. C. TANNER ve ark., 1981).

C. recta'nın periodontitiste subgingival bölgelerde yüksek miktarda bulunduğu ve periodontal hastalıklar ile direkt olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (Macuch ve Tanner, 2000). Ek olarak *C. recta* erişkinlerde gingivitis oluşumu ve başlangıç seviyedeki periodontitis ile ilişkili olan bakteriler arasında olduğu bildirilmiştir (A Tanner, Maiden, Macuch, Murray ve Kent, 1998).

2.17. *Eubacterium nodatum* (*E. nodatum*)

E. nodatum son zamanlarda orta ve ileri şiddette periodontal ceplerden izole edilen bir periodontopatojendir (A. Haffajee, Teles ve Socransky, 2006; Hill, Ayers ve Kohan, 1987). *E. nodatum*, hareketsiz, asakkarolitik ve anaerobik gram pozitif bir bakteridir (Hill ve ark., 1987; Lalla, 2007). Özellikle *P. gingivalis* ve *T. forsythia*'nın

ortamda fazla miktarlarda bulunduğu durumlarda *E. nodatum* miktarının da arttığı bildirilmiştir (A. Haffajee ve ark., 2006).

Optimal büyüme için % 5-10 CO₂ ve hema (X faktörü) içeren kanlı agar gerektiren yavaş büyüyen bir mikroorganizma olduğu söylenmiştir (B. Holmes, Picket ve Hollis, 1995; Stoloff ve Gillies, 1986).

2.18. *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*)

E. corrodens, gram negatif, fakültatif anaerop, kapnofilik, asakkarolitik bir mikroorganizmadır ve morfolojik olarak düzgün şekilli küçük basil yapısındadırlar (Müller ve ark., 1997; Suda, Lai, Yang ve Hasegawa, 2002). Bazı alt türleri fakültatif anaerop olmasına rağmen bazı suşları ise aeroptur. Virulans faktörleri ise LPS, dış membran proteinleri, adezinleri olarak sayılabilir (Suda ve ark., 2002).

E. corrodens, ağız boşluğunun commensal florasının bir parçasıdır ve aynı zamanda gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerin mukozal yüzeyinin bir sakini olduğu bildirilmiştir (Sheng ve ark., 2001). Klindamisin ve metronidazol gibi anaeroblara karşı aktif olan antimikrobiyal ajanlar etkisizdir (B. Holmes ve ark., 1995).

Bu bakterinin aynı zamanda antistafilokok penisilinler, aminoglikozitler, vankomisin ve eritromisine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (E. Goldstein ve Citron, 1984; E. J. Goldstein, Sutte ve Finegold, 1978).

2.19. Capnocytophaga Türleri: (gingivalis/ochracea/sputigena)

Gram negatif hareketli, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerop koko-basil, periodontitis hastalarının periodontal lezyonlarının apikal kısmında, destrüktif periodontitis ve periodontal apsesi olan hastalarda yüksek sayıda bulunmuştur (Grinenko ve ark., 1977; Newman, Socransky, Savitt, Propas ve Crawford, 1976; A. C. R. Tanner, Haffer, Bratthall, Visconti ve Socransky, 1979).

Metabolik aktiviteleri için CO₂'e gereksinim duyarlar. Oral florada *C. gingivalis/ochracea/sputigena* gibi farklı alt türleri vardır (Ohishi, Yamamoto, Tomofuji, Tamaki, ve Watanabe, 2005).

Organizmalar sadece patolojik süreçlerle sınırlı kalmamış, aynı zamanda yıkıcı periodontal hastalığı olmayan bireylerin supragingival dental plaklarından izole edilmiştir (S. Holt, Simpson ve Leadbetter, 1975). Capnocytophaga'nın lipopolisakkaritinin sadece zayıf bir endotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Stevens, Sela, McArthur, Nowotny ve Hammond, 1980).

Capnocytophaga'nın çeşitli patolojik süreçlerdeki önemine rağmen, bu bakterilerin hastalık üretebileceği mekanizmalar aydınlatılamamıştır. Capnocytophaga, in vitro olarak polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisini inhibe edebilen ürünler üretebildiği (Shurin, Socransky, Sweeney ve Stossel, 1979; Van Dyke, Bartholomew, Genco, Slots ve Levine, 1982), fibroblast proliferasyonunu önlediği veya poliklonal B-lenfosit aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Nakamura ve Slots, 1982).

2.20. Periodontopatojen Mikroorganizma Tespit Etme Yöntemleri ve Dişeti Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi

Subgingival MDP örneklerinin toplanması için küret, diş ipi veya kağıt şerit gibi yardımcı araçlar kullanılabilir (Boutaga, Savelkoul, Winkel ve van Winkelhoff, 2007). Elde edilen örneklerde periodontal patojenlerin tespit edilmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), anaerobik mikrobiyolojik kültür yöntemi, ELISA testi, DNA sondları ve biyokimyasal enzim testleri kullanılabilir (A. J. van Winkelhoff, 2003). Bu tezimizde diş eti biyobelirteçleri ve periodontopatojenler PZR yöntemiyle değerlendirildi.

2.20.1. PZR Yöntemi

PZR, DNA içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimeler bütününe verilen isimdir (J. J. Zambon ve Haraszthy, 1995). İlk kez 1985 yılında tanıtılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi; çok hassas, türe özgün ve hızlı olması ile diğer tekniklerin önüne geçmiştir (Santos, Sakai, Machado, Schippers ve Greene, 2004). Dr. Kary B. Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PZR buluşu ile 1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü almıştır. PZR yöntemi bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA veya RNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanır (Boutaga, van Winkelhoff, Vandenbroucke-Grauls ve Savelkoul, 2005). PZR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) sentetik oligo nükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu) sonra zincirin uzaması (polimerizasyon) ve

bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına ile gerçekleşir. Bu üç adım (denatürasyon/hibridizasyon/polimerizasyon) bir PZR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (Loomer, 2004; J. J. Zambon ve Haraszthy, 1995).

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

PZR üç aşamadan oluşur:

- 1- Çift sarmal DNA'nın denatürasyonu
- 2- Primerlerin bağlanması
- 3- Primerlerin uzaması

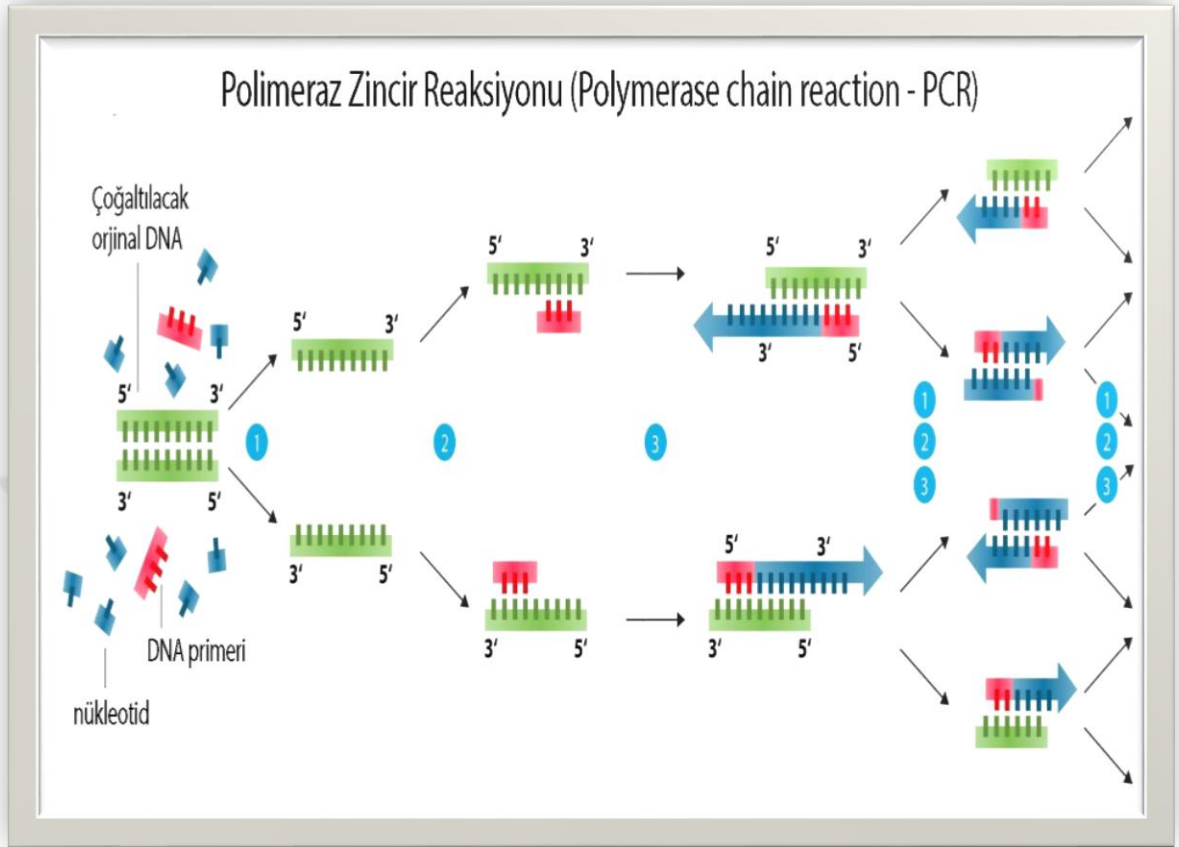
Denatürasyon aşaması: Bu aşamada çoğaltılması planlanan DNA sarmalı, iplikleri bir arada tutan hidrojen bağlarının sıcaklığın 95-100 °C'a çıkarılması ile koparılır ve iki parçaya ayrılır. Böylece tek sarmal elde edilir. Eğer çoğaltılması istenen

nükleotid dizisi DNA değil RNA ise; ilk önce revers transkriptaz enzimi ile DNA kopyası elde edilir. PZR işlemi daha sonra uygulanır (Santos ve ark., 2004).

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

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

Her    aşama tek bir d nę  kabul edilir ve yaklaşık 3-5 dakika sürer. PZR işlemi 20-40 d nę den oluşur. Her d nę  sonrası bir önceki d nę dekinin 2 katı DNA elde edilir (Santos ve ark., 2004).



Şekil 2.20.1. 1:Polimeraz zincir reaksiyonunu gösteren şekil (Prof. Dr. Mustafa ÖZDOĞAN internet sitesinden alınmıştır)

Farklı nükleik asit yöntemleri karşılaştırıldığında PZR hassasiyet sınırlarının genişliği açısından en iyi yöntemdir (M. Shaddox ve ark., 2007). Multipleks PZR ve gerçek zamanlı (real-time) PZR olmak üzere iki tipi vardır. Nicel bir yöntem olan real time PZR periodontopatojen mikroorganizmaların tespit edilebilmesi için çok ideal bir yöntemdir. Alınan örneklerde çok sayıda mikroorganizma bulunmasa bile mikroorganizmalar belirlenebilmektedir ve bu yönüyle oldukça hassas bir yöntemdir (Boutaga ve ark., 2007).

Micro-IDent® testi *micro-IDent®* ve *micro-IDent®plus* olarak iki şekilde piyasada bulunmaktadır. Bu iki test arasındaki fark *micro-IDent®* testinde 5 mikroorganizmanın incelenebilmesine karşın *Micro-IDentPlus®* testinde aynı anda 11 mikroorganizmanın tanımlanabilmesidir.

2.21. Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi, periodontal olarak sağlıklı bireylerde, günlük tüketilen sigara miktarı ile doğru orantılı olarak artacak olan hipoksik ortamın, hipoksiyle indüklenebilen sinyal yolağı biyobelirteçlerine ve periodontopatojen bakterilerin miktar ve içeriğine etki edeceği yönündedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, TOGÜ KAEK 2019/07 karar numaralı ve 16.04.2019 tarihli onayını takiben başlanmıştır (EK-1).

3.1. Hasta Seçim Kriterleri

Dâhil edilme kriterlerine uyan her hastaya çalışmanın amacı ve prosedürleri anlatılmış ve çalışmaya katılmak isteyip istemedikleri sorulmuştur. Birey seçimi fazında hastaların dahil edilme ve çıkarılma kriterlerini belirleyebilmek için tüm ağız periodontal sağlık değerlendirilmeleri yapılmıştır. Hastalardan plak indeksi, gingival indeks, cep derinliği ölçümleri yapılmıştır. Bütün hastalardan başlangıç dokümantasyonu için medikal ve dental hikayelerini de içeren ağız içi değerlendirmeleri alınmıştır.

3.2. Dahil Edilme Kriterleri:

Bu çalışmaya Tokat Gaziosmanpaşa Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalına tedavi olmak üzere gelen, sigara kullanan, son 6 ay içerisinde diş eti tedavisi görmemiş, antibiyotik kullanmamış, medikal anamnezinde sistemik hastalık hikayesi olmayan, periodontal tedavide rutin prosedürler olan kron boyu uzatma veya gingivektomi endikasyonu konulmuş, ağızda en az 20 dişi bulunan 18-45 yaş arası rutin klinik ve radyografik muayenelerde periodontal açıdan sağlıklı ve çalışmaya katılmayı kabul eden bireyler dahil edilmiştir.

3.3. Çıkarılma Kriterleri:

Yukarıda bahsi geçen kriterlerden herhangi birini sağlamayan tüm bireyler çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışma grupları:

1. Grup (n=20): Günlük 5 veya daha az sayıda sigara tüketen bireyler
2. Grup (n=20): Günlük 6-10 sigara tüketen bireyler
3. Grup (n=20): Günlük 11-19 sigara tüketen bireyler
4. Grup (n=20): Günlük 20 veya daha fazla sigara tüketen bireyler
5. Grup (Kontrol grubu, n=20): Sigara kullanmayan ve hayatı boyunca hiç sigara kullanmamış bireyler

3.4. Klinik Periodontal Parametrelerin Ölçümü:

Ağız aynası ve 0,5 mm çaplı periodontal sond (Hu-Friedy Periodontal Sond #, Hu-Friedy, Chicago, IL) kullanılmıştır.

3.2.1. Plak indeksi (PI):

Hastaların mevcut dişlerinin hepsinden bir dişte 6 bölgeden olmak üzere, MDP miktarı değerlendirilerek 0 ile 3 arasında skorlama yapılmıştır. Silness ve Löe tarafından tanımlanan PI skorları aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır;

0: Plak yok

1: Serbest diş eti kenarı ve ona komşu olan alanda film şeklinde plak bulunmaktadır. Plak diş yüzeyine sondun sürtülmesi veya boyayıcı solüsyon uygulanarak görülebilmektedir.

2: Diş eti cebinde yumuşak plak birikimi vardır. Plak çıplak gözle görülebilmektedir.

3: Diş eti cebinde ve/veya diş yüzeyinde aşırı plak birikimi bulunmaktadır (Silness ve Loe, 1964).

3.2.2. Gingival indeks (GI):

Hastaların mevcut dişlerinin hepsinden toplamda 6 bölge olmak üzere enflamasyon miktarı, ödem, diş etinde sondlama ile veya spontan kanama, renk değişimi, ülserasyon gibi değişkenler değerlendirilerek 0 ile 3 arasında skorlama yapılmıştır. Loe ve Silness tarafından tanımlanan GI aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır;

0: Normal gingiva

1: Hafif enflamasyon, hafif renk değişikliği, ödem ve diş etinde kanama yok

2: Orta derecede enflamasyon, kızarıklık, ödem ve sondlamada kanama

3: Şiddetli enflamasyon, belirgin kızarıklık, ödem, ülserasyon ve spontan kanamaya eğilim var (Loe ve Silness, 1963).

3.2.3. Gingival sulkus derinliği (GSD)

Hastaların çalışmaya dâhil edilen dişlerinin ilgili ceplerinden periodontal sond dişin uzun aksına paralel olacak şekilde sondun kendi ağırlığından fazla bir kuvvet uygulanmaksızın diş eti cebine yerleştirilerek cep tabanından mine-sement sınırına kadar olan mesafe ölçölerek kaydedilmiştir.

Çalışma programı;

Tüm Gruplarda:

- Periodontal klinik ölçümler yapılmıştır.
- DOS ve plak örnekleri alınmıştır.
- Gingivektomi ve/ya kron boyu uzatma operasyonu ile diş eti örnekleri alınmıştır.

3.5. Subgingival Mikrobiyal Dental Plak Örneklerinin Toplanması:

Subgingival dental plak örneklerinde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. nodatum*, *E. corrodens* ve *C. gingivalis/ochracea/sputigena* mikroorganizmaların tespit edilmesi amacı ile yapılmıştır.

Mikrobiyolojik örneklerin elde edilmesi:

Bu çalışmada sigaranın subgingival mikroflora üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla subgingival MDP örnekleri alınmıştır. Öncelikle supragingival plak periodontal küretler yardımıyla uzaklaştırılmış, sonra *Micro-IDent Plus®* (*Micro-IDent Plus®*Hain Life Science, Nehren, Almanya.) test kutusunun içerisinde mevcut olan steril 50 numara kağıt şeritler (*Micro-IDent Plus®* Hain Life Science, Nehren, Almanya.) periodontal cebin içine yerleştirilip direnç hissedilene kadar ilerletilmiştir. Kağıt şeritler daha önce literatürde tavsiye edildiği üzere 20 saniye boyunca gingival sulkus içinde bekletildikten sonra uzaklaştırılmıştır (A. D. Haffajee ve ark., 2009; Hartroth, Seyfahrt, ve Conrads, 1999). Her bireyde belirlenmiş olan gingival sulkustan 2 adet kağıt şerit ile örnek alınmıştır. Alınan örnekler, bir arada tek bir eppendorf tüpüne (*Micro-IDent Plus®*Hain Life Science, Nehren, Almanya.) yerleştirilerek analiz yapılmak üzere laboratuara gönderilmiştir.

Doctor Information

Name: _____

Address: _____

City, ZIP-Code, St: _____

Phone: _____ Fax: _____

E-Mail (required): _____

Patient Information

Family name of patient: _____

First name of patient: _____ Sex: ☐ Female ☐ Male

Date of birth (MM/DD/YY): _____

Address, City, ZIP-Code, State (voluntary): _____

See operating guidelines on back!

micro-Ident® plus

Molecular Biological Detection of Periodontopathogenic Bacteria

Content:

- 5 sterile paper points
- 1 colour-coded transfer tube
- 1 order form
- 1 envelope

IVD 15-25°C Product Code: 323E Lot-No. and Minimum Shelf Life: see bottom of package

Manufactured by:

Hain Lifescience GmbH | D-72147 Nehren
Tel.: +49 (0) 74 73-94 51-0 | www.hain-lifescience.de

HAIN
LIFESCIENCE

micro-Ident® plus € 69,-
excl. VAT

VAT number: _____

up to 5 paper points

4 Payment Method of payment

Şekil 3.5. 1:Micro-IDent Plus® örnek toplama malzemeleri

Mikrobiyal değerlendirmeler Hain Life Science firmasının Nehren, Almanya'daki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.6. Dos Toplanması ve Elisa Analizi

DOS toplamadan önce diş yüzeylerinden supragingival plak ve yiyecek artıkları uzaklaştırılmıştır sonra bu yüzeyler hava spreyiyle kurutulmuş ve pamuklarla izole edilmiştir. DOS örnekleri kağıt şeritlerle toplanmıştır. DOS toplama işlemi ağrısız, anestezi gerektirmeyen bir prosedürdür. Özel kağıt şeritler diş etine hafifçe yerleştirilerek 30 saniye bekletilecektir. Mekanik travma oluşturmamak için özen gösterilmiştir. Kağıt şeritler eppendorf tüplerine yerleştirilerek -80 derecelik ortamda

biyokimyasal analiz bekletilmiştir. DOS numenelerinde Hif-1 α , Hif-1 β ve PHD-1 değerlendirilmesi sandviç ELISA yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Her bir biyobelirteç için 2'şer kit 96 kutucuklu ELISA kiti kullanılmıştır (YL Biont, Shangai YL Biotech Co., Ltd.).

ELISA analizleri üretici firmanın kullanım talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Analizin gerçekleştirileceği gün 1 saat önceden örneklerin bulunduğu eppendorf tüpleri buzdolabından (-20 °C) oda sıcaklığına çıkarılmıştır. Her tüpe her bir kağıt şerit için 100 μ L olmak üzere toplamda 300 μ L Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) eklenmiştir. Kağıt şeritlerin içindeki örneklerin ekstraksiyonu için tüpler vorteks cihazında birer dakika süre ile çalkalanmıştır. ELISA kitinin üretici firmasının tarif ettiği kullanım talimatları doğrultusunda tüm aşamalar uygulanarak, tüpler içindeki sıvı örneklerin ELISA analizi gerçekleştirilmiştir. Numuneler 450 nm dalga boyundaki optik okuyucuda okutulmuştur. Standart çözeltilerin absorbens-konsantrasyon eğrisi çizilerek her bir örneğin, absorbens değerine karşılık gelen konsantrasyonu belirlenmiştir.

ELISA analizi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat TAŞKAN, Dr. Öğr. Üyesi Özkan KARATAŞ ve Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Diş eti Örneklerinin Toplanması ve RT-PZR analizi

Çalışmaya dahil edilen hastalardan diş eti büyümesi veya yetersiz kron boyu yüksekliğinin tedavisinde rutin tedavi yöntemlerinden biri olan gingivektomi

yöntemiyle diş eti örnekleri toplanmıştır. Toplanan diş eti biyopsilerinin en az 2x2mm boyutunda olmasına dikkat edilmiştir. Diş eti örnekleri analiz gününe kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Alınan diş eti dokularının bir kısmı sıvı nitrojende dondurularak bir homojenizatör yardımıyla homojenize edilecek ve sonrasında ultrasonikasyon uygulanmıştır. Son olarak 25000g'de 16 dakika santrifüj edilerek homojenatlar elde edilmiştir. Homojenatlarda HIF-1 α , VEGF real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile analiz edilmiştir. Homojenizasyon Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat TAŞKAN, Dr. Öğr. Üyesi Özkan KARATAŞ ve Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.6.1.1. RT-PZR yöntemi

İlk olarak mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir, mRNA izolasyonu daha önce Cacac ve ark.'larının (2014) tarif ettiği gibi Trizol RNA ekstraksiyon reaktifi kullanılarak elde edilmiştir. Kısaca, hücreler Trizol içinde lizis edilerek 5 dakika süreyle bir çalkalayıcıda rotasyonda bırakılmıştır. Daha sonra kloroform ilave edilip 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra numuneler santrifüj edilip sulu faz bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Sulu faza izopropanol eklenip ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilip tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeyi takiben, dipte biriken pelet kısmı % 75 lik soğuk etanol ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edilmiş ve RNase içermeyen steril saf su içinde süspanse edilmiştir. Elde edilen mRNA nın miktarı bir nanodrop yardımıyla belirlenmiştir. Daha sonra one step real time (Thermo AB4104C) qRT-PCR kiti kullanılarak, 1 mg mRNA ilgili geni hedefleyen spesifik primerler yardımıyla Hif1 α forward 5'- TGC TCA TCA GTT GCC ACT TC -3' Hif1

α reverse 5'- CCA AGC AGG TCA TAG GTG GT -3', VEGF forward 5'-AAG GCT GAG CTG GAG GAA-3', VEGF reverse 5'- GGA GCA TGA TTG AGA CTC GC-3'. mRNA ifadesi GAPDH mRNA düzeylerine normalleştirilmiş (GAPDH forward primer: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', GAPDH reverse primer: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'). Döngü koşulları aşağıdaki gibi seçilmiştir: Ters transkripsiyon (50 ° C, 30 dk), Denatürasyon (95 ° C, 10 dk), Amplifikasyon (15 sn için 95 ° C, 30 sn için 55 ° C, 35 sn için 72 ° C) ve Soğutma (37) C, 30 saniye. İlgili gen ekspresyonu ölçülmüş, 3 replikasyon yapılmıştır ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile GAPDH' ye normalleştirilmiştir ($2^{-\Delta\Delta Ct} = (CP - GAPDH_{CP})$)(Berkel ve Cacan, 2020). RT-PCR yöntemi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında Dr. Öğretim Üyesi Ercan ÇAÇAN ve Arş. Gör. Özge YÜKSEKKAYA tarafından gerçekleştirilmiştir.

PCR ile ilgili biyobelirteçlerin analizi

Dış etinde bakılmış biyobelirteçler

⇒ - HIF-1 α

- VEGF

Plakta bakılmış periodontopatojenler

⇒ - *A. actinomycetemcomitans*

- *P. gingivalis*

- *T. forsythia*

- *T. denticola*

- *P. micros*
- *F. nucleatum*
- *P. intermedia*
- *C. recta*
- *E. nodatum*
- *E. corrodens*
- *Capnocytophaga spec. (gingivalis, ochracea, sputigena)*

ELİSA ile histolojik analizler

- ⇒
- HIF-1 α
 - HIF-1 β
 - PHD- 1

3.7. İstatistiksel Analiz

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

Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları One sample K-S testi normalite testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası yaş, sigara sayısı, plak indeksi, gingival indeks ve sondlanabilir cep derinliği gibi demografik verilerin değerlendirilmesinde Oneway ANOVA ve Tukey testleri kullanılmıştır. Gruplar arası HIF-1 α , HIF-1 β ve PHD-1'in değerlendirilmesinde ise Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri

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



4. BULGULAR

Araştırmaya katılan tüm katılımcılardan başarılı bir şekilde ölçümler tamamlanmış ve örnekler alınmıştır. Çalışma verilerinin istatistiksel analiz sonuçları aşağıda sunulmuştur. Araştırma sonuçlarının demografik verileri ve klinik ölçüm sonuçları **Tablo 13.1**, **Tablo 13.2** ve **Tablo 13.3**'de verilmiştir.

Gruplar/ Parametreler	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Plak indeksi	1,22±0,42	1,11±0,48	1,12±0,50	1,16±0,38	0,86±0,35
Gingival indeks	1,22±0,42	1,29±0,46	1,43±0,51	1,16±0,38	1,06±0,25
Gingival sulkus vestibül	2,32±0,42	2,19±0,55	2,30±0,53	2,38±0,46	2,15±0,46
Gingival sulkus lingual	2,08±0,41	1,85±0,42	2,01±0,53	1,96±0,55	1,92±0,28
Yaş	23,66±4,40	23,35±4,21	23,12±2,80	24,50±3,70	24,00±2,07
Sondlamada kanama	0,68±0,52	0,55±0,34	0,78±0,45	0,97±0,56	0,64±0,76

Tablo 13.1: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler

Gruplar/ Parametreler	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Sigara sayısı	2,88±1,18	7,05±0,96 ^a	12,00±1,96 ^{a,b}	20,00±0,00 ^{a,b,c}	0,00±0,00 ^{a,b,c,d}

Tablo 13.2: Çalışma grupları sigara sayısı verileri

^ap<0,05 grup 1'den farklılığı ifade etmektedir. ^bp<0,05 grup 2'den farklılığı ifade etmektedir. ^cp<0,05 grup 3'ten farklılığı ifade etmektedir. ^dp<0,05 grup 4'ten farklılığı ifade etmektedir. a'dan c'ye kadar olan sayılar satırdaki farklılıkları gösterir.

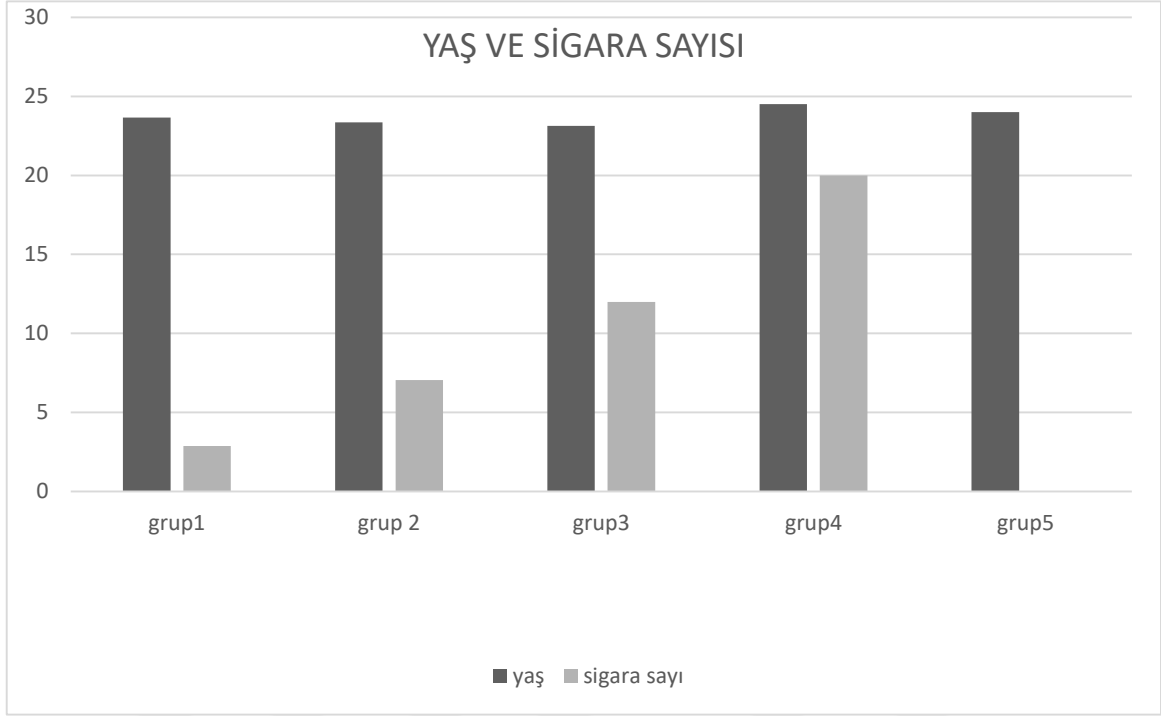
Gruplar/ Parametreler	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Hif -1α ELISA	1,17 $\pm$ 0,18 Min: 0,85 Maks: 1,43	1,03$\pm$0,16^a Min: 0,82 Maks: 1,36	1,52 $\pm$ 1,46 Min: 0,73 Maks: 6,27	0,73$\pm$0,42^a Min: 0,20 Maks: 1,26	1,30$\pm$0,45^{a,b,c,d} Min: 0,64 Maks: 2,23
Hif -1β ELISA	11,81 $\pm$ 3,50 Min: 5,49 Maks: 19,71	11,09 $\pm$ 3,27 Min: 5,18 Maks: 20,57	12,54 $\pm$ 5,22 Min: 8,70 Maks: 29,24	10,68 $\pm$ 2,00 Min: 5,02 Maks: 12,60	15,05 $\pm$ 8,69 Min: 6,04 Maks: 38,15
Prolil hidroksilaz ELISA	8,04 $\pm$ 4,30 Min: 2,00 Maks: 14,53	12,93 $\pm$ 20,02 Min: 2,00 Maks: 64,53	11,87 $\pm$ 18,71 Min: 2,00 Maks: 80,20	10,39 $\pm$ 5,60 Min: 2,53 Maks: 20,87	15,94$\pm$10,99^{a,b,c} Min: 7,00 Maks: 44,53

Tablo 13.3: Çalışma gruplarında demografik veriler ve klinik ölçümler

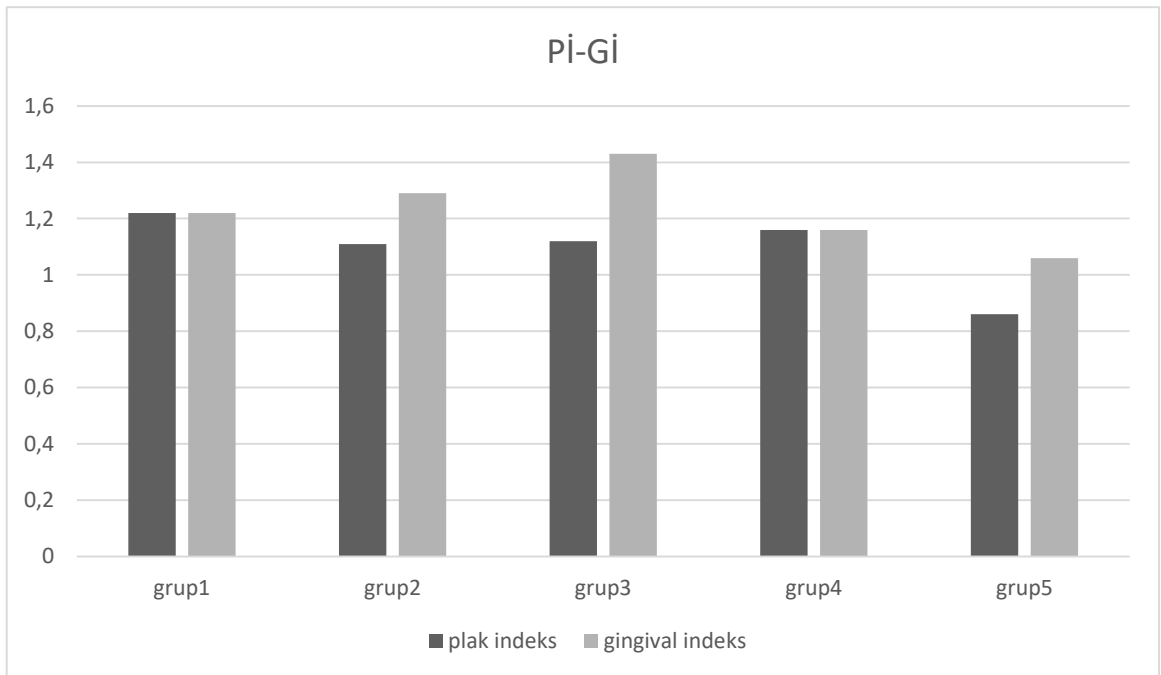
^ap<0,05 grup 1'den farklılığı ifade etmektedir. ^bp<0,05 grup 2'den farklılığı ifade etmektedir. ^cp<0,05 grup 3'ten farklılığı ifade etmektedir. ^dp<0,05 grup 4'ten farklılığı ifade etmektedir. a'dan c'ye kadar olan sayılar satırdaki farklılıkları gösterir.

Grup 1'e dâhil edilen hastaların yaş ortalaması 23,66 $\pm$ 4,40, grup 2'ye dâhil edilen hastaların yaş ortalaması 23,35 $\pm$ 4,21, grup 3'e dâhil edilen hastaların yaş ortalaması 23,12 $\pm$ 2,80, grup 4'e dâhil edilen hastaların yaş ortalaması ise 24,50 $\pm$ 3,70, grup 5'e dâhil edilen hastaların yaş ortalaması 24,00 $\pm$ 2,07 bulunmuştur. Yaşta gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur (**Şekil 4.1, p>0,05**). Gruplar arası plak indeksleri, gingival indeksler, sondlamada kanama ve gingival sulkus derinliği değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (**Şekil 4.2, Şekil 4.3**

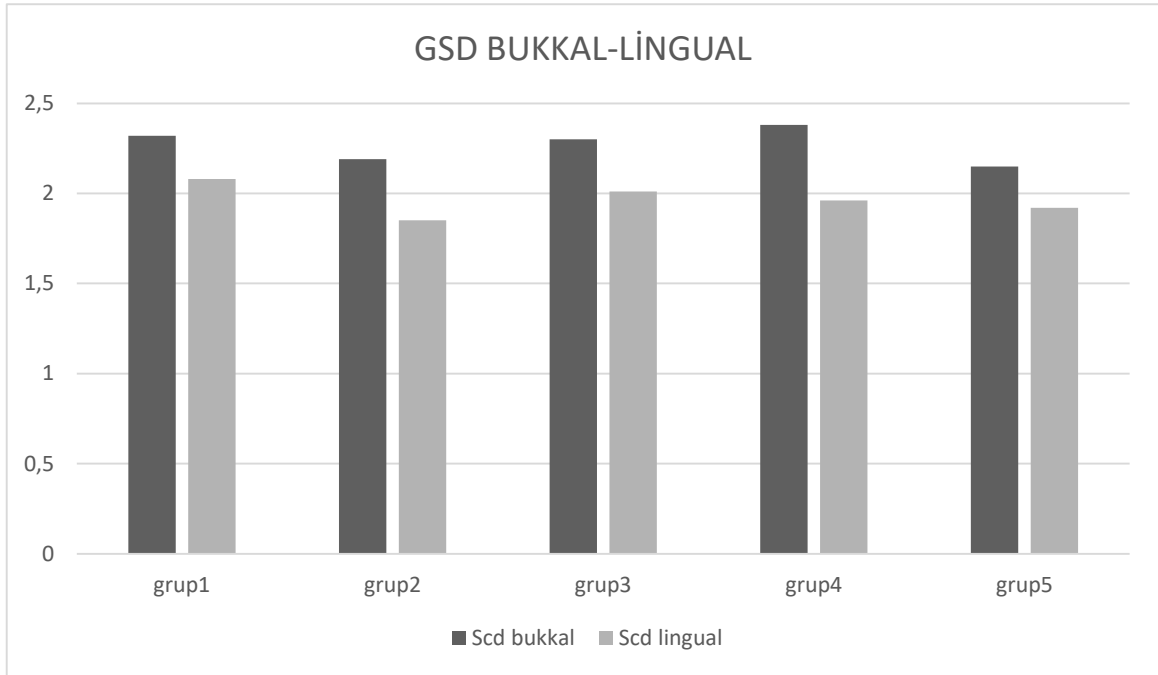
ve $p>0,05$). Sigara sayısı bütün gruplar arasında istatistiksel olarak farklıdır (Şekil 4.2, $p<0,05$), tezimiz günlük içilen sigara miktarına göre karşılaştırılmasıdır.



Şekil 4.1: Çalışma grupları yaş ve sigara sayısı ELISA sonuçları

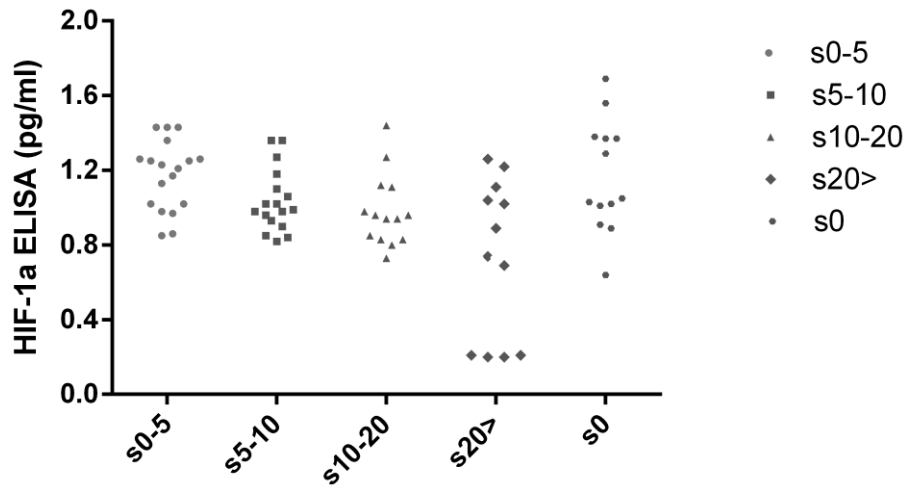


Şekil 4.2: Çalışma grupları plak ve gingival indeks ELISA sonuçları



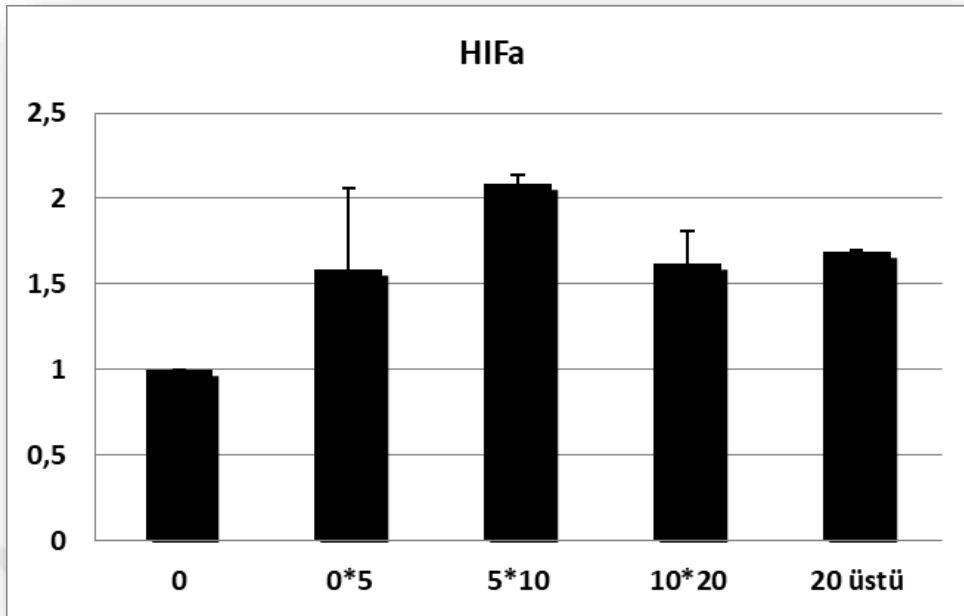
Şekil 4.3: Çalışma grupları bukkal ve lingual gingival sulkus derinliği ELISA sonuçları

HIF-1 α değerlerine bakıldığında grup 1, grup 2 ve grup 4'ten anlamlı derece yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Grup 5 ise grup 1, grup 2 ve grup 4'ten anlamlı derecede yüksek bulunurken grup 3'ten anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.4, $p<0,05$).



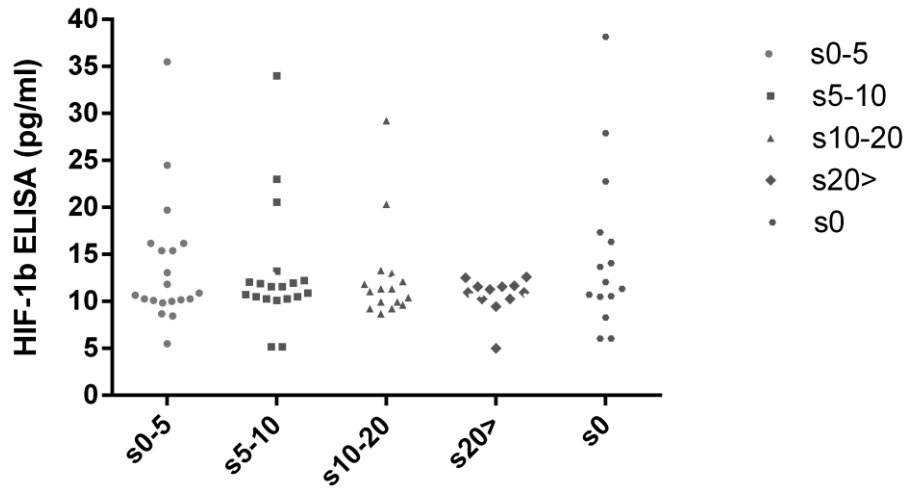
Şekil 4.4: Çalışma grupları HIF-1α ELISA sonuçları

HIF-1α PZR sonuçları ise kontrol genini (GAPDH) sabit tutularak yapıldığında 0-5 arası sigara içen grup 1,58, 5-10 arası sigara içen grup 2,08, 10-20 arası sigara içen grup 1,62, 20 adet üstü sigara içen grup 1,68 kat ekspresyonu sigara içmeyenlere göre artmıştır. Sigara içenler arasında artış farkı yokken sigara içmeyenlere göre içenler yaklaşık 2 kata yakın bir artış göstermiştir (Şekil 4.5).



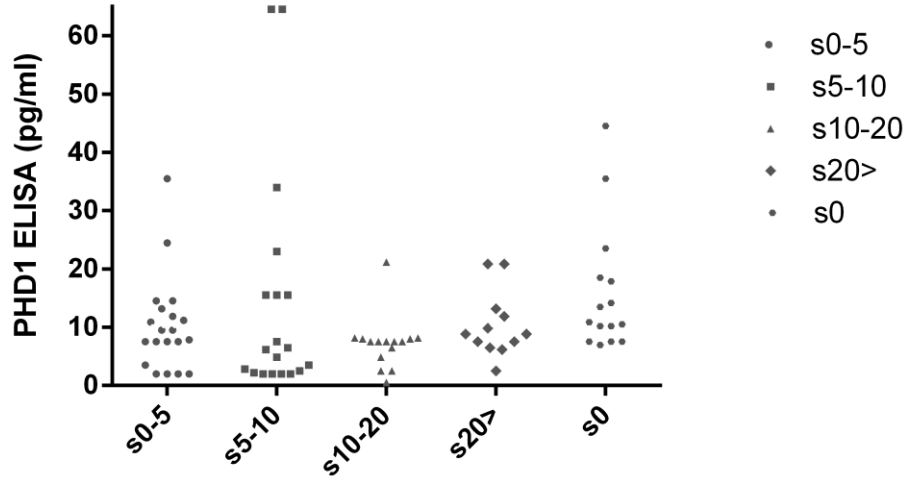
Şekil 4.5: Çalışma grupları HIF-1α PZR sonuçları

HIF-1β değerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur (Şekil 4.6, $p>0,05$).



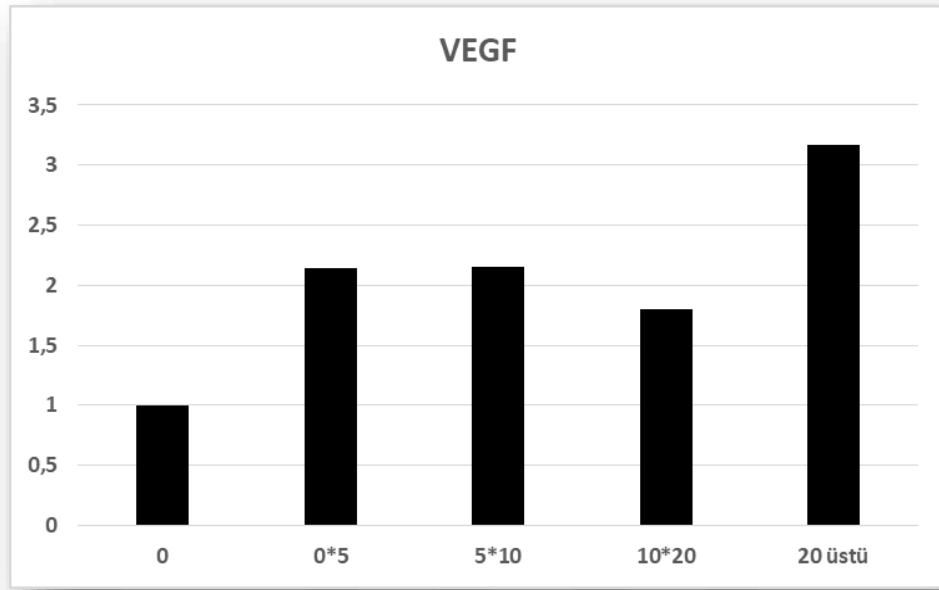
Şekil 4.6: Çalışma grupları HIF-1β ELISA sonuçları

Grup 5'in PHD değ erlerine bakıldığında grup 1, grup 2 ve grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.7, $p<0,05$).



Şekil 4.7: Çalışma grupları PHD-1 ELISA sonuçları

VEGF PZR sonuçları ise kontrol genini (GAPDH) sabit tutularak yapıldığında ise 0- 5 arası sigara içen grup 2,13, 5-10 arası sigara içen grup 2,15, 10-20 arası sigara içen grup 1,79, 20 adet üstü sigara içen grup 3,16 kat ekspresyonu sigara içmeyenlere göre artmıştır. VEGF değ erinde sigara içenler arasında 3,16 kat artış ile 20 adet üstü sigara içen grupta artış varken diğ er sigara içen gruplar arasında fark yoktur. Sigara içenlerde içmeyenlere göre ise yaklaşık 2 kat artış vardır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Çalışma grupları VEGF PZR sonuçları

On bir adet periodontopatojen mikroorganizma sırayla: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *C. gingivalis/ochracea/sputigena* olmak üzere her hastada Micro IDentPlus® testi ile ayrı ayrı incelenmiştir (**tablo 13.4**).

	Aa	Pg	Pi	Tf	Td	Pm	Fn	Cr	En	Ec	Csp
1A		+	+	+	+	+	+	+		+	+
1B	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
2A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3A	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
3B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4A		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5A				+	+	+	+	+		+	+
5B	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 13.4: Bakterilerin Micro-IDentPlus® testi sonuçları

1A ve 1B 0-5 arası sigara içen grup 1, 2A ve 2B 5-10 arası sigara içen grup 2, 3A ve 3B 10-20 arası sigara içen grup 3, 4A ve 4B 20 üstü sigara içen grup ve 5A ve 5B sigara içmeyen gruptur. A ilk 10 B ise son 10 hasta örnek toplamlarıdır. Tespit edilen bakteriler ‘+’ olarak işaretlenmiştir.

Bütün gruplarımız periodontal olarak sağlıklı ve sigara içme miktarına göre kıyaslama yaptığımızdan birkaç bakteri haricinde gruplar arasında belirgin farklar yoktur. 0-5 arası sigara içen grupta *E. nodatum* tespit edilmemiştir.

20 üstü sigara içen grupta ise hiç *A. actinomycetemcomitans* tespit edilmemiştir. Hiç sigara içmeyen grupta *P. gingivalis* tespit edilmemiştir.

5. TARTIŞMA

Sigaranın periodontitis için bir risk faktörü olduğu, periodontitise bağlı doku yıkımını arttırdığı ve yıkım şiddetinin de tüketilen sigara miktarıyla orantılı olarak arttığı uzun yıllardan beri bilinmektedir (Mahanonda ve ark., 2009; Scabbia ve ark., 2001; Williams ve ark., 2001). Aynı zamanda sigaranın periodontitise karşı gelişen konak savunma yanıtını bozduğu ve periodonsiyumu deoksijenize ederek mikrobiyal kompozisyonu da değiştirdiği rapor edilmiştir (Barbour ve ark., 1997; Jan Bergström, 1989; Kinane ve Chestnutt, 2000; Ryder ve ark., 1998). Bir diğer yandan; diş etinde enflamasyona bağlı ortaya çıkan klinik semptomların sigara kullanıcılarında maskelendiği bildirilmiştir (Jan Bergström ve Preber, 1986; Danielsen ve ark., 1990). Bu gözlemler, daha önce belirtildiği gibi, sigara içenlerde enflamatuvar yanıtta veya diş eti dokularının vasküler yanıtındaki değişikliklere bağlı olabilir. Sigara içenler ve içmeyenler arasında sağlıklı diş eti vasküler yoğunluğunda anlamlı bir fark gözlenmese de (Lena Persson ve Bergström, 1998), içmeyenlere kıyasla mikrodolaşımın plak birikimine verdiği yanıt sigara içenlerde değişmiş gibi görünmektedir. Gelişen iltihaplanma ile DOS akışındaki artışlar, sondlamada kanama ve diş eti kan damarları sigara içmeyenlere kıyasla sigara içenlerde daha azdır. Ek olarak, sağlıklı diş eti dokularındaki oksijen konsantrasyonu sigara içenlerde içmeyenlere göre daha az gibi görünmektedir, ancak bu durumun periodontal hastalığın daha ileri evrelerinde ise tersine çevrilebileceği bildirilmiştir (Hanioka ve ark., 2000).

Literatür taraması sonucunda; günlük tüketilen sigara miktarı ile orantılı olarak artacak olan hipoksik ortamın hipoksiyle indüklenebilen HIF-1 α , HIF-1 β , PHD-1,

VEGF ve periodontopatojenlerin miktar ve içeriğine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığında; çalışmamızın amacı, periodontal olarak sağlıklı bireylerde günlük içilen sigara miktarı ile oluşan hipoksik ortamın hipoksiyle indüklenebilen sinyal yolağı biyobelirteçleri ve periodontal patojen bakterilerin miktar ve içeriğine etkisinin araştırılmasıdır.

Hasta seçiminde yaş aralığı olarak 18-40 yaş arasındaki sistemik olarak sağlıklı bireyler çalışmaya dahil edilmiştir ve gruplar arasında yaşta fark yoktur. Bu sayede; periodonsiyumun yapısal özelliklerinde, periodontitise karşı immün yanıtta ve gündelik oral hijyen gereksinimlerinin yerine getirilebilme seviyelerinde bir değişken olan yaş ve sistemik durum faktörlerinin elimine edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, klinik verilerin değerlendirilmesinde, periodontal sağlık durumlarının belirlenmesinde en güvenilir yöntemlerden olan Silness-Löe plak indeksi ve Löe-Silness gingival indeksleri kullanılmıştır (Harks ve ark., 2016; Kinane ve ark., 2015; Loe ve Silness, 1963; Silness ve Loe, 1964; Toiviainen ve ark., 2015). Tüm bireylerin periodontal sağlık durumunu gösteren başlangıç klinik periodontal parametreleri (Pİ, Gİ, GSD) ölçülmüştür. Bu parametrelerde gruplar arasında fark olmaması, grupların benzer başlangıç periodontal sağlık koşullarına sahip bireylerden oluştuğunu göstermektedir.

Çalışma grupları; günlük tüketilen sigara miktarına bağlı olarak kategorize edilerek oluşturulmuştur.

PZR tekniği son yıllarda periodontopatojenlerin teşhisi için en çok kullanılan yöntemdir. PZR haricinde anaerobik mikrobiyolojik kültür yöntemi, ELISA testi, DNA sondları, enzim testleri kullanılabilir (A. Van Winkelhoff, 2003). Ancak PZR'ın hızlı ve basit olması diğer yöntemlere göre belirgin avantajlarıdır (Morikawa ve ark., 2008)

Micro-IDent® test sistemleri diğer yöntemlere oranla daha yeni ve kullanımı daha kolay sistemlerdir. *Micro-IDent®* testi ile kültür yönteminin karşılaştırıldığı bir araştırmada *Micro-IDent®* testinin kültür sonuçlarına paralel sonuçlar verdiği ve subgingival dental plak örneklerinin analizi için güvenli bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (Eick ve Pfister, 2002). Yapılan bir diğer araştırmada hamile bayanlarda mikro floranın analizi için ise *Micro-IDent®* ile anaerobik kültür yöntemi karşılaştırılmış ve *Micro-IDent®* kitinin rutin yöntemlere iyi bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (Urbán, Terhes, Radnai, Gorz ve Nagy, 2010). Literatürdeki bu bilgiler dikkate alındığında *Micro-IDent®* yönteminin hızlı, güvenilir ve etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmaktadır.

HIF-1 α ; güvenilir ve detayı yansıtan yöntemler olmaları nedeniyle, DOS'ta ELISA ve diş etinde PZR yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Alkan ve ark.'larının, 2013'te yaptığı çalışmada, sigara nedeniyle periferel kan damarlarında oluşan vazokonstrksiyonun, tüm dokulara taşınan kan ve oksijen miktarının azalmasına sebep olduğu rapor edilmiştir. Semenza ve ark.'larının yaptıkları çalışmada oksijen konsantrasyonunun % 20'den % 0,5'e düşmesinin HIF-1 α ve HIF-1 β alt birimlerinin bağlanma hızını arttırdığı (Semenza ve ark., 1997), Guan ve arkadaşlarının çalışmasında ise sigara kullanımının HIF-1 α , ROS üretimini ve proenflamatuvar sitokinler seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir (Guan ve ark., 2018).

Çalışmamızın hipotezine göre; günlük tüketilen sigara miktarı arttıkça hipoksiye bağlı olarak HIF-1 α seviyelerinin de artacağı düşünülmekteydi. PZR sonuçlarımıza göre, günlük tüketilen sigara miktarıyla HIF-1 α seviyelerinde, sigara kullanmayanlara kıyasla 2 kat artış gözlenmiştir. HIF-1 α seviyeleri bakımından, sigara kullanıcıları arasında ise günlük tüketilen sigara miktarına bağlı bir fark bulunmamıştır. ELISA sonuçlarına göre ise günlük 0-5 sigara tüketen grup, 5-10 arası ve 20 den fazla tüketenlerden yüksek bulunmuştur. Buna ek olarak; hiç kullanmayanlar ise 0-5, 5-10 ve 20 den fazla tüketenlerden yüksek bulunurken, 10-20 arası tüketenlerden ise düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Buna göre; hipokside, HIF-1 esas düzenleyici olsa da; büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar ve viral proteinler gibi bazı hipoksik olmayan uyaranların da bu transkripsiyon faktörünü etkileyebildiği düşünülebilir.

Yine bu bulgumuzu destekler nitelikte, HIF-1'in hipoksik ve hipoksik olmayan koşullarda aktive edilmesinde rol oynayan mekanizmaların da farklı olduğu bildirilmiştir (Déry ve ark., 2005). Ayrıca HIF1 α 'nın sadece HIF sinyal yolağı ile değil normoksik koşullar altında ekspresyonu ve stabilitesi, PI3K ve ERK / MAPK ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere büyüme faktörleri ve sitokinlerin neden olduğu ana sinyal iletim yolları ile de düzenlenebileceği rapor edilmiştir (Chachami, Paraskeva, Georgatsou, Bonanou ve Simos, 2005; Fedulova, Hanrieder, Bergquist ve Emrén, 2007).

Pasif sigara içicileri, sigara içenler tarafından dışarıya verilen ana duman ve yanıl dumandan oluşan havayı solumaktır (Aronow, 1978). Okoli ve ark.'ları aktif sigara içenlerin, pasif maruziyetten de ilave nikotin aldığını; hatta bu pasif maruziyete

bağlı ortaya çıkan nikotin seviyelerinin aktif sigara yoluyla elde edilene benzer bulunduğunu bildirmişlerdir (Okoli, Kelly ve Hahn, 2007). Buna göre; çalışmamızdaki 0-5 arası sigara tüketen grup ve hiç tüketmeyen grup diğer gruplara göre pasif içiciliğe daha fazla maruz kalmış olabilir.

Tidal volüm (TV), her bir normal soluk alma ve verme sırasında akciğere girip çıkan hava miktarıdır. Anatomik ölü boşluk, havayı ileten yollarda kalan havanın volümüdür. Fizyolojik ölü boşluk ise fonksiyonel bir ölçümde saptanan ve akciğerlerde gaz değişimine katılmayan havanın volümüdür. Normal bir akciğerde anatomik ölü boşluğa eşittir. Ancak ventilasyon/perfüzyon (V/Q) bozukluklarında anatomik ölü boşluktan daha fazla ölçülebilir (Vagas ve Akgül, 2009).

Bu bilgilerin ışığında, inhale edilen sigara dumanının akciğerlere ulaşarak sistemik etki yaratmasına sebep olacak miktarı da sigara içme alışkanlığıyla ilgili olabilir. Örneğin; sigara dumanını daha az inhale eden bireylerde, sigara içeriğinin daha az miktarı akciğere ulaşıp ölü boşlukta kalabilir. Bu da, HIF-1 α seviyelerinin gündelik tüketilen sigara miktarıyla doğru orantılı artış göstermemesinin bir açıklaması olabilir.

Armitage ve ark.'a göre, sigara dumanını akciğerine inhale edenler, ağza giren ana dumandaki nikotinin % 90'ını emebilir. Aynı çalışmada, bu etkinin, dumanın akciğerlere solunmasından kaynaklandığı ve tam içine çekmeyen sigara kullanıcılarının çok daha az nikotini inhale ettiği bildirilmiştir. (Armitage ve ark., 1975). Bizim çalışmamızda da gruplar arası farklılıklar, dumanın tam anlamıyla inhale edilip edilmemesiyle ilgili olabilir.

Nikotin metabolizmasının kişiden kişiye değişmesi sonucunda, farklı kotinin serum düzeyleri ve idrar nikotini ve kotinin atılım oranları ortaya çıkar (Benowitz, Jacob, Jones ve Rosenberg, 1982; Benowitz, Kuyt, Jacob, Jones ve Osman, 1983).

Bu verilere ek olarak, Hugod ve ark.'ları günlük tüketilen sigara sayılarının etkileri konulu çalışmaların sonuçlarının; sigaranın havalandırma seviyeleri farklı odalarda tüketimi, farklı sigara markalarının içeriklerinin de farklı oluşu ve sigara tüketim şeklinin ve inhale edilen duman düzeylerinin kişiden kişiye değişkenlik göstermesi nedeniyle, karşılaştırılmalarının zor olduğunu bildirmişlerdir (Hugod, Hawkins ve Astrup, 1978).

Bizim çalışmamızda da, sigara markası, nikotin oranı, bireysel nikotin metabolizması, sigaranın nasıl içildiği, pasif içiciliğe maruz kalınıp kalınmadığı gibi pek çok araştırmacıdan bağımsız değişken bulunmasından dolayı gruplar arasında, günlük sigara tüketim miktarından bağımsız hipoksi bulguları ortaya çıkmış olabilir.

Çalışmamızda HIF-1 β 'ya DOS'ta ELISA yöntemiyle bakılmıştır ve gruplar arasında fark bulunmamıştır. HIF molekülü α (O_2 'ye bağımlı, O_2 'den bağımsız) ve β (O_2 'den bağımsız) alt birimlerinden oluşan heterodimer yapısında bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 β , hücrede hipoksiden bağımsız ve yoğun olarak eksprese edilirken HIF-1 α oksijen varlığında PHD'ler tarafından hızla degrade edilir, bu nedenle HIF molekülünün oluşumunda HIF-1 α miktarı hız kısıtlayıcı basamak olduğu bildirilmiştir (Jiang ve ark., 1996).

Çalışmamızda, PHD-1 değerlerine DOS'ta ELISA yöntemiyle bakılmıştır. PHD'ler, 2-oksanoatrat bağımlı dioksijenazlar grubunda yer alır. Bu enzimler, O_2 algılama fonksiyonları için moleküler temeli sağlayan bir ortak-substrat olarak O_2 'ye

ihtiyaç duyarlar. Aynı şekilde, PHD'ler de ortak faktörler olarak Fe^{+2} ve askorbat kullanırlar. Fe^{+2} O_2 'nin aktifleştirilmesi ve reaktiflerin düzenli bağlanması için bir şablon olarak çok önemlidir. Askorbat, dekarboksilasyon reaksiyonundan sonra enzimin aktif bölgesine bağlanan Fe^{+3} 'ü azaltarak etki gösterir ve tekrar aktifleşmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Berra ve ark., 2006). Hiç sigara içmeyenlerin PHD değerleri 0-5, 5-10 ve 10-20 arası içenlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum hiç sigara içmeyenlerde askorbat ve Fe^{+2} miktarlarının yeterli ya da yüksek olması veya da düşük çıkan gruplarda yetersiz olmasıyla açıklanabilir.

VEGF değerlerine dış etine PZR yöntemiyle bakılmıştır. HIF-1'in VEGF ekspresyonundaki rolü iyi bilinmektedir. VEGF değerinde sigara içenler arasında 3,16 kat artışla 20 adet üstü sigara içen grupta artış varken diğer sigara içen gruplar arasında fark yoktur ($p>0,05$). Sigara içenlerde içmeyenlere göre ise yaklaşık 2 kat artış vardır.

VEGF ekspresyonu, hipoksiye yanıt olarak artar (Forsythe ve ark., 1996). Ugur ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada VEGF düzeylerinin sigara kullananlarda, kullanmayanlara kıyasla daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir (Ugur, Kutlu ve Kilinc, 2018). Bu veriler de bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

VEGF endotelial hücrelerin en güçlü aktivatörüdür. VEGF, iskemik dokulardaki hipoksi ortamında indüklenir, burada anjiyogenezin indüksiyonu için kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Neufeld, Cohen, Gengrinovitch ve Poltorak, 1999).

VEGF, vasküler geçirgenliği, hücresel çoğalmayı ve hücresel göçü indüklemek için VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-1 / KDR) reseptörleri yoluyla endotelial hücreler üzerine etki eder (Ferrara, Gerber ve LeCouter, 2003). Bu çalışma sigara dumanının içeriğine maruz kalmanın VEGF kaynaklı endotel hücre göçünü bozduğunu

göstermektedir. Sigara dumanının önleyici etkisi, Akt / eNOS / NO yolunun blokajı ile birlikte artan reaktif oksijen türevleri (ROS) seviyesi ile ilişkilidir ve son çalışmalar nitrik oksidin (NO) endotel hücre göçü ve VEGF kaynaklı anjiyogenezin temel bir aracısı olduğunu göstermiştir. Michaud ve ark' larının yaptığı bu çalışma sigara dumanına maruz kalmanın VEGF kaynaklı endotel hücre göçünü bozduğunu bildirmişlerdir (Michaud, Dussault, Groleau, Haddad ve Rivard, 2006).

Heeschen ve ark.'a göre bazı anjiyojenik faktörlerin nikotin ile arttığı bulunmuştur. Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve VEGF ekspresyonunun kanser hücrelerinde nikotin tarafından indükleneyeceği bildirilmiştir (Heeschen ve ark., 2001; Heeschen, Weis, Aicher, Dimmeler ve Cooke, 2002; Jacobi ve ark., 2002; Mousa ve Mousa, 2006).

Ayrıca, anjiyojenik damarlardan endotel hücrelerde aktif olarak eksprese edilen VEGFR-2 seviyeleri, nikotin maruziyetine bağlı olarak önemli ölçüde artmaktadır (Jacobi ve ark., 2002). VEGF'yi hedefleyen antikorlar, bir dereceye kadar nikotin varlığında anjiyogenezi önler, bu da VEGF'den bağımsız bir yolun muhtemelen bu alkaloid tarafından uyarıldığını gösterir (M. K. Ng ve ark., 2007). Bu bulguların ışığında; nikotinin başka bir ilgili anjiyojenik büyüme faktörü olan bFGF'yi indükleyebileceği düşünülmektedir. (Heeschen ve ark., 2002).

Nikotin, EC üzerinde bimodal ve doza bağımlı etkiler gösterir (Heeschen ve ark., 2001; Kuhlmann ve ark., 2005; Mousa ve Mousa, 2006). 10^{-8} M'nin altındaki konsantrasyonlarda, nikotin DNA sentezini uyarırken, daha yüksek konsantrasyonlarda ($>10^{-6}$ M) uygulandığında nikotin lokal toksisite, ödem ve hücre apoptozuna yol açtığı rapor edilmiştir. (Villablanca, 1998).

Sadece birkaç çalışma anjiyogenez sürecinde nikotin iletiminin etkisine odaklanmıştır. Heeschen ve ark.'ları nikotinin sistemik uygulamasının kas içi uygulamaya kıyasla iskemik anjiyogenez üzerinde çok daha yüksek etkiler sağladığını göstermiştir. Bununla birlikte, lokal uygulamanın da bir dereceye kadar doku içinde anjiyogenezi indükleyebileceği rapor edilmiştir (Avogaro ve Fadini, 2006).

Lena Persson ve Bergström ise, genç sağlıklı yetişkinler üzerinde yaptıkları çalışmada diş eti vasküler yoğunluğunun sigara kullananların yanı sıra, sigara kullanmayanlarda da sabit kaldığını bildirmişlerdir. Sigara kullananlar ve kullanmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Lena Persson ve Bergström, 1998).

VEGF'nin anjiyojenik özellikleri önemlidir ancak çalışmalar, sadece VEGF'nin kan damarlarının tam ve normal olgunlaşmasını teşvik etmek için yeterli olmadığını göstermiştir (Déry ve ark., 2005; Shyu ve ark., 2002). HIF-1 degradasyonunda yer alan mekanizmaları hedef alan ilaçların, VEGF, VEGFR2, PAI-1, MMP'ler, EPO ve IGF-2 gibi anjiyogenez ile ilgili birçok genin ekspresyonuna büyük bir yarar sağladığı söylenmiştir (Shyu ve ark., 2002).

Hipotezimize göre; günlük tüketilen sigara miktarı arttıkça VEGF'nin de artması öngörülmektedir. Ancak sadece günlük 20 adet üstü sigara tüketenlerde VEGF değeri artışı olması; kan damarı oluşumunda sadece VEGF'nin değil, birçok gen, büyüme faktörü ve sinyal yolağının etkili olabileceği, aynı zamanda nikotinin doza bağımlı olması ve de etkene bağlı nikotin emilim farklılıklarının olması ile açıklanabilir.

Yine hipotezimizde; sigara tüketimi sırasında, ağız içi oksidatif potansiyelin azalmasına bağlı olarak anaerobik bakterilerin sayısında artış olabileceği

düşünülmüştür. Sigara içen ve içmeyenlerde subgingival bölgedeki bakteri kolonizasyonunu değerlendiren çalışmalara göre sigara içen bireylerde subgingival bölgedeki *T. forsythia*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *C. recta*, *Bacteroides*, *T. denticola* (Shchipkova ve ark., 2010) ve *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *E. coli*, *C. albicans* oranlarının yüksek bulunduğu bildirilmiştir (Alkan ve ark., 2013; Grossi ve ark., 2007).

Çalışma gruplarımızda, sigara tüketim miktarına göre yaptığımız karşılaştırmalarda birkaç bakteri haricinde gruplar arasında belirgin fark bulunamamıştır. *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. corrodens*, *C. gingivalis/ochracea/sputigena* bütün gruplarda tespit edilmiştir.

Bu durumun olası nedenleri arasında; çalışma gruplarında yer alan bireylerin çalışma öncesinde benzer periodontal sağlık seviyelerine sahip olmaları bulunabileceği gibi; çalışma esnasında oral hijyen uygulama seviyelerinin yeteneklerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmesi de sayılabilir.

0-5 arası sigara içen grupta *E. nodatum* hiç tespit edilmemiştir. *E. nodatum* son zamanlarda orta ve derin şiddette periodontal ceplerden izole edilen bir periodontopatojendir (A. Haffajee ve ark., 2006; Hill ve ark., 1987). Bu durumun olası nedenleri arasında da ilgili grubu oluşturan bireylerin daha önce hiç periodontal sağlık durumlarının bozulmaması ya da ilgili periodontopatojenle hiç kontamine olmamış olmaları için sayılabilir.

A. actinomycetemcomitans bütün gruplarda bulunmasına rağmen 20 üstü sigara içen grupta ise hiç *A. actinomycetemcomitans* tespit edilmemiştir. *A. actinomycetemcomitans* sağlıklı ve/veya hastalıklı tüm periodontal dokularda

bulunabilmesine rağmen, lokalize agresif periodontitis ile oldukça yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir(Duncan, 2003).

Hastalardaki *A. actinomycetemcomitans* kontaminasyon oranı, çeşitli coğrafi bölgeler ve periodontitisin farklı klinik görünümüne bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir (Rylev ve Kilian, 2008). Çalışmamızda; 20 üstü sigara tüketen grupta *A. Actinomycetemcomitans*'ın saptanamaması da yine ilgili grubu oluşturan bireylerin daha önce hiç periodontal sağlık durumlarının bozulmaması ya da ilgili periodontopatojenle hiç kontamine olmamış olmalarından dolayı olabilir.

P. gingivalis tüm gruplarda bulunmasına rağmen hiç sigara içmeyen grupta *P. gingivalis* tespit edilmemiştir. *P. gingivalis* için sigara içenler arasında daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Umeda ve ark., 1998; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001; J. Zambon ve ark., 1996). Aynı zamanda sağlık bireylerde de oral florada *P. gingivalis*'e rastlanabileceği de gösterilmiştir (Rafiei ve ark., 2018). Çalışmamızda; ilgili periodontopatojene sigara kullanmayan grupta rastlanamaması, ilgili grubu oluşturan bireylerin periodontal açıdan sağlıklı olmasının doğal sonuçları arasında sayılabilir.

Bununla birlikte; Erie County'nin çalışmasından elde edilen veriler, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. forsythia* bakımından pozitif olan bireylerin oranlarının sigara kullanıcıları arasında daha yüksek olduğunu göstermektedir. (Umeda ve ark., 1998; A. Van Winkelhoff ve ark., 2001; J. Zambon ve ark., 1996).

Peptostreptokoklar aynı zamanda doğal oral floranın da önemli bir üyesidir (S. S. Socransky ve Haffajee, 2002). Bütün gruplarda bulunmasının sebebi de muhtemelen bu olabilir. Shchipkova ve ark.'ları sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre daha fazla

sayıda *Parvimonas*, *Campylobacter*, *Treponema*, *Bacteroides* ve *Fusobacteroides* cinsi olduğunu göstermişlerdir (Shchipkova ve ark., 2010).

Alves ve ark. sondlama derinliğindeki artışın *P. intermedia* genotiplerinin sayısı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Alves, Napimoga, Klein, Hofling ve Gonçalves, 2006). Bu raporlar, *P. intermedia* ve *C. recta* 'nın ileri periodontitis ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Başka bir çalışmada, sigara kullanıcılarında *C. recta* kolonizasyonu anlamlı olarak daha yüksek iken *A. actinomycetemcomitans* sayısı daha düşük bulunmuştur. Sigara içenlerde *C. recta* ile ilgili bu sonuç, Kamma ve ark.'larının yaptığı önceki çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (Kamma ve ark., 1999). *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. micros* ve *C. recta* 'nın sigara içenlerde subgingival mikroflorada baskın olduğunu, ancak periodontitisin erken evrelerinde ise normal seviyelerde bulunduğunu rapor etmişlerdir (Kubota, Tanno-Nakanishi, Yamada, Okuda ve Ishihara, 2011). *C. recta* varlığının *P. gingivalis*, *T. denticola* veya *T. forsythia* varlığı ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Miyamoto ve ark., 2009).

Stoltenberg ve ark.'larının çalışmalarında; daha önce yapılmış bazı çalışmalarındaki bulgularının aksine, sigara kullananlar ve kullanmayanlar arasında bakteriyel kompozisyon bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Stoltenberg ve ark., 1993).

Daha önceki literatür bilgileri ve çalışmamız sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; sigara kullanımının periodonsiyumu deoksijenize ederek çoğunlukla fakültatif anaerob periodontopatojenlerin kolonizasyonu için elverişli ortamın oluşmasına katkı sağladığı ve içerdiği nikotine bağlı olarak DOS ve gingivadaki HIF-1 α , HIF-1 β , PHD 1, VEGF seviyelerini etkilediği düşünülebilir. Bununla birlikte; sigara tüketim miktarı ile bahsi geçen parametreler arasında korelasyon kurulamamış

olması da bahsi geçen parametrelerin seviyelerinin pek çok farklı değışkene bağı olabileceğı sonucunu akla getirmektedir.

Bu konuda gelecekte yapılabilecek, yüksek denek sayılı, uzun dönem takipli, genetik yatkınlıklar da göz önünde bulundurularak daha çok sayıda biyobelirtecın birarada değeriendirildiğı yeni çalışmalar da bilimin yoluna ışık tutacaktır.



6. SONUÇ

Araştırmamız günlük tüketilen sigara miktarı ile artacak olan hipoksik ortamın hipoksiyle indüklenebilen sinyal yolağı biyobelirteçleri ve periodontopatojen bakterilerin miktar ve içeriğine etkisini araştıran ilk çalışmadır. Bahsi geçen durumun araştırılması ile bu biyobelirteç ve periodontopatojenlerin günlük tüketilen sigara miktarından ne kadar etkilendiğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

1. *Micro-IDentPlus®* kiti subgingival dental plak örneklerinin incelenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.
2. *Micro-IDentPlus®* kitinin manuel olarak uygulanan PZR yöntemine oranla zaman ve maddi açıdan daha ekonomik olduğu görülmüştür.
3. İncelenen örneklerde araştırılan herhangi bir periodontopatojen açısından örnek bozulması veya veri kaybı gibi bir sorunla karşılaşılmamıştır.
4. *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. recta*, *E. corrodens*, *C. gingivalis/ochracea/sputigena* bütün gruplarda tespit edilmiştir.
5. *E. nodatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* bakterilerinde gruplar arasında farklılıklar bulunmuştur.
6. Gruplar arasında HIF-1 α , HIF-1 β , VEGF ve PHD-1 biyobelirteçleri arasında sigara sayısından bağımsız farklılıklar bulunmuştur.
7. HIF-1 α değerleri ELISA sonuçları ile değerlendirildiğinde 10-20 arası sigara kullanan grup değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

8. HIF-1 α PZR sonuçları ise kontrol genini (GAPDH) sabit tutularak değerlendirildiğinde sigara kullanan gruplar arasında fark bulunmazken, sigara kullanıcılarında kullanmayanlara göre yaklaşık 2 kat artış saptanmıştır.
9. HIF-1 β seviyeleri ELISA sonuçları ile değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
10. PHD-1 seviyeleri ELISA sonuçları ile değerlendirildiğinde hiç sigara kullanmayan grup değerleri, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
11. PZR sonuçlarına göre, sigara kullanıcıları arasında 20 adet üstü sigara tüketenlerden oluşan grupta, VEGF seviyelerinde artış varken diğer gruplar arasında fark bulunamamıştır. Sigara kullanıcılarında ise kullanmayanlara göre yaklaşık 2 kat artış bulunmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Abuse, S. (2006). Results from the 2005 national survey on drug use and health: national findings.
- Akat, F., & Fıçıcılar, H. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Prolil Hidroksilazlar. J Ankara Univ Fac Med, 70(1), 29-36.
- Albrektsson, T., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2003). Karring Th, Lang NP: Clinical Periodontology and Implant Dentistry (4 ed., pp. 352-365): Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing Company Oxford UK;.
- Alkan, E. A., Dikilitaş, A., Alkan, Ö., & Parlar, A. (2013). Sigara ve periodontal hastalık ilişkisi. Acta Odontol. Turc., 30(1), 49-53.
- Alves, A. C. B., Napimoga, M. H., Klein, M. I., Hofling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2006). Increase in probing depth is correlated with a higher number of Prevotella intermedia genotypes. J. Periodontol., 77(1), 61-66.
- Andersen, P., Pedersen, O., Bach, B., & Bonde, G. (1982). Serum antibodies and immunoglobulins in smokers and nonsmokers. Clin Exp Immunol., 47(2), 467.
- Anthes, W. H., Blaser, M. J., & Reller, L. B. (1981). Acute suppurative parotitis associated with anaerobic bacteremia. Am. J. Clin. Pathol., 75(2), 260-262.
- Apatzidou, D., Riggio, M., & Kinane, D. (2005). Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. J. Clin. Periodontol. 32(9), 973-983.
- Appelhoff, R. J., Tian, Y.-M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., . . . Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1,

- PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.*, 279(37), 38458-38465.
- Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M., Vasselli, J. R., Riss, J., Maranchie, J. K., . . . Barrett, J. C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J. Cell. Biochem.*, 92(3), 491-501.
- Armitage, A., Dollery, C., George, C., Houseman, T., Lewis, P., & Turner, D. (1975). Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J.*, 4(5992), 313-316.
- Aronow, W. S. (1978). Effect of passive smoking on angina pectoris. *N Engl J Med.*, 299(1), 21-24.
- Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2006). The Janus face of nicotinic angiogenesis: *J. Am. Coll. Cardiol.*
- Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J.-B., Tangada, S., Hahn, C.-L., Schenkein, H. A., & Tew, J. G. (1997). Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 8(4), 437-460.
- Benowitz, N. L. (1996a). Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* 18(2), 188-204.
- Benowitz, N. L. (1996b). Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36(1), 597-613.
- Benowitz, N. L., & Jacob III, P. (1994). Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56(5), 483-493.

- Benowitz, N. L., Jacob, P., Jones, R. T., & Rosenberg, J. (1982). Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221(2), 368-372.
- Benowitz, N. L., Kuyt, F., Jacob, P., Jones, R. T., & Osman, A. L. (1983). Cotinine disposition and effects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 34(5), 604-611.
- Bergen, A. W., & Caporaso, N. (1999). Cigarette smoking. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(16), 1365-1375.
- Bergström, J. (1989). Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 17(5), 245-247.
- Bergström, J. (2004). Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92(1), 1-8.
- Bergström, J., Eliasson, S., & Preber, H. (1991). Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J. Periodontol.*, 62(4), 242-246.
- Bergström, J., & Eliasson, S. (1987). Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J. Periodontal Res.*, 22(6), 513-517.
- Bergström, J., & Floderus-Myrhed, B. (1983). Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*, 11(2), 113-116.
- Bergström, J., Persson, L., & Preber, H. (1988). Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Eur. J. Oral Sci.*, 96(1), 34-39.
- Bergström, J., & Preber, H. (1986). The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J. Periodontal Res.*, 21(6), 668-676.
- Berkel, C., & Cacan, E. (2020). In silico analysis of DYNLL1 expression in ovarian cancer chemoresistance. *Cell Biol. Int.*

- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO Rep.*, 22(16), 4082-4090.
- Berra, E., Ginouvès, A., & Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep.*, 7(1), 41-45.
- Berra, E., Roux, D., Richard, D. E., & Pouyssegur, J. (2001). Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep.*, 2(7), 615-620.
- Bikfalvi, A. (2004). Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem. Pharmacol.*, 68(6), 1017-1021.
- Blouin, C. C., Pagé, E. L., Soucy, G. M., & Richard, D. E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood*, 103(3), 1124-1130.
- Bolin, A., Eklund, G., Frithiof, L., & Lavstedt, S. (1993). The effect of changed smoking habits on marginal alveolar bone loss. A longitudinal study. *Swed. Dent. J.*, 17(5), 211-216.
- Boström, L., Linder, L. E., & Bergström, J. (1998). Clinical expression of TNF- α in smoking-associated periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 25(10), 767-773.
- Boström, L., Linder, L. E., & Bergström, J. (1999). Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 26(6), 352-357.
- Boutaga, K., Savelkoul, P. H., Winkel, E. G., & van Winkelhoff, A. J. (2007). Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and

- quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J. Periodontol.*, 78(1), 79-86.
- Boutaga, K., van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Savelkoul, P. H. (2005). Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS IMMUNOL MED MICROBIOL.*, 45(2), 191-199.
- Brat, D. J., & Van Meir, E. G. (2001). Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am. J. Pathol.*, 158(3), 789.
- Breese, C. R., Marks, M. J., Logel, J., Adams, C. E., Sullivan, B., Collins, A. C., & Leonard, S. (1997). Effect of smoking history on [3H] nicotine binding in human postmortem brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282(1), 7-13.
- Brook, I. (1988). Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, 26(6), 1181-1188.
- Brook, I. (1989). A 12 year study of aerobic and anaerobic bacteria in intra-abdominal and postsurgical abdominal wound infections. *Surg gynecol obstet.*, 169(5), 387-392.
- Brook, I., Grimm, S., & Kielich, R. B. (1981). Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J. Endod.*, 7(8), 378-380.
- Bry, M., Kivelä, R., Leppänen, V.-M., & Alitalo, K. (2014). Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiol. Rev.*, 94(3), 779-794.
- Buduneli, N., Baylas, H., Buduneli, E., Türkoğlu, O., & Dahlen, G. (2005). Evaluation of the relationship between smoking during pregnancy and subgingival microbiota. *J. Clin. Periodontol.*, 32(1), 68-74.

- Cato, E. P., Johnson, J. L., Hash, D., & Holdeman, L. V. (1983). Synonymy of *Peptococcus glycinophilus* (Cardon and Barker 1946) Douglas 1957 with *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 and electrophoretic differentiation of *Peptostreptococcus micros* from *Peptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 33(2), 207-210.
- Cattaneo, V., Cetta, G., Rota, C., Vezzoni, F., Rota, M., Gallanti, A., . . . Poggi, P. (2000). Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.*, 71(3), 425-432.
- Cervera, A. M., Apostolova, N., Luna-Crespo, F., Sanjuan-Pla, A., Garcia-Bou, R., & McCreath, K. J. (2006). An alternatively spliced transcript of the PHD3 gene retains prolyl hydroxylase activity. *Cancer Lett.*, 233(1), 131-138.
- Chachami, G., Paraskeva, E., Georgatsou, E., Bonanou, S., & Simos, G. (2005). Bacterially produced human HIF-1 α is competent for heterodimerization and specific DNA-binding. *Biochem.Biophys.Res.Comm*, 331(2), 464-470.
- Chavez, A., Miranda, L. F., Pichiule, P., & Chavez, J. C. (2008). Mitochondria and hypoxia-induced gene expression mediated by hypoxia-inducible factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147(1), 312-320.
- Chow, A. W., Roser, S. M., & Brady, F. A. (1978). Orofacial odontogenic infections. *Ann. Intern. Med.*, 88(3), 392-402.
- Christersson, L. A. (1993). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and localized juvenile periodontitis. Clinical, microbiologic and histologic studies. *Swed. Dent. J. Supplement*, 90, 1-46.

- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G.-W., Clifford, S. C., . . . Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.*, 275(33), 25733-25741.
- Coleman, M., & Ratcliffe, P. (2009). Signalling cross talk of the HIF system: involvement of the FIH protein. *Curr. Pharm. Des.*, 15(33), 3904-3907.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., . . . Nizet, V. (2003). HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), 645-657.
- D'Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P., & Frelin, C. (2003). Hypoxia Up-regulates Prolyl Hydroxylase Activity A Feedback Mechanism That Limits HIF-1 Responses During Reoxygenation. *J. Biol. Chem.*, 278(40), 38183-38187.
- Danielsen, B., Manji, F., Nagelkerke, N., Fejerskov, O., & Baelum, V. (1990). Effect of cigarette smoking on the transition dynamics in experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 17(3), 159-164.
- Darveau, R. P., Tanner, A., & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* 2000, 14(1), 12-32.
- Demirel, S. H., Çetinkaya, S. (2014). Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1: Hücrenin Hipoksiye Fizyolojik ve Patolojik Cevabı. *Sakaryamj.*, 4(4), 171-177.
- Déry, M.-A. C., Michaud, M. D., & Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37(3), 535-540.

- Didilescu, A., Rusu, D., Anghel, A., Nica, L., Iliescu, A., Greabu, M., . . . Stratul, S. (2012). Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. *Int. Endod. J.*, 45(3), 282-293.
- Djordjevic, M., Hoffmann, D., Thompson, S., & Stellman, S. (1997). Distribution of smoking parameters and self-administered doses of select smoke components among different population groups. *Coresta Inform Bull (Paris)*, 2, 183.
- Djordjevic, M. V., Hoffmann, D., & Hoffmann, I. (1997). Nicotine regulates smoking patterns. *Prev. Med.*, 26(4), 435-440.
- Duncan, M. J. (2003). Genomics of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 14(3), 175-187.
- Dzink, J., Socransky, S., & Haffajee, A. (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, 15(5), 316-323.
- Eick, S., & Pfister, W. (2002). Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 29(7), 638-644.
- Epping-Jordan, M. P., Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. (1998). Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*, 393(6680), 76.
- Faddy, M. J., Cullinan, M. P., Palmer, J. E., Westerman, B., & Seymour, G. J. (2000). Ante-dependence modeling in a longitudinal study of periodontal disease: the effect of age, gender, and smoking status. *J. Periodontol.*, 71(3), 454-459.

- Fedulova, N., Hanrieder, J., Bergquist, J., & Emrén, L. O. (2007). Expression and purification of catalytically active human PHD3 in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 54(1), 1-10.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., & Semenza, G. L. (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.*, 59(16), 3915-3918.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 25(4), 581-611.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 9(6), 669-676.
- Ferson, M., Edwards, A., Lind, A., Milton, G., & Hersey, P. (1979). Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *INT J CANCER.*, 23(5), 603-609.
- Feyerabend, C., Ings, R., & Russel, M. (1985). Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 19(2), 239-247.
- Flores, C. M., Dávila-García, M. I., Ulrich, Y. M., & Kellar, K. J. (1997). Differential regulation of neuronal nicotinic receptor binding sites following chronic nicotine administration. *J. Neurochem.*, 69(5), 2216-2219.
- Forsythe, J. A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.*, 16(9), 4604-4613.
- Gandomani, H. S., Tarazoj, A. A., & Salehiniya, H. (2017). Cigarette: The Silent Killer in the World. *Biomed. Res. Ther.*, 4(9), 1624-1628.

- Garvalov, B. K., Foss, F., Henze, A.-T., Bethani, I., Gräf-Höchst, S., Singh, D., . . . Damm, M. (2014). PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. *Nat. commun.*, 5, 5577.
- Giannopoulou, C., Cappuyns, I., & Mombelli, A. (2003). Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 30(11), 996-1002.
- Giannopoulou, C., Geinoz, A., & Cimasoni, G. (1999). Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J. Clin. Periodontol.*, 26(1), 49-55.
- Giannopoulou, C., Kamma, J. J., & Mombelli, A. (2003). Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J. Clin. Periodontol.*, 30(2), 145-153.
- Goldstein, E., & Citron, D. M. (1984). Susceptibility of *Eikenella corrodens* to penicillin, apalcillin, and twelve new cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26(6), 947-948.
- Goldstein, E. J., Sutter, V. L., & Finegold, S. M. (1978). Susceptibility of *Eikenella corrodens* to ten cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14(4), 639-641.
- Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R., . . . Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: role of the p22 phox-containing NADPH oxidase. *Circ. Res.*, 89(1), 47-54.
- Grinenko, V., Weiner, M., Karge, H., Angel, I., Newman, M., & Sims, T. (1977). *Predominant Cultivable Microbiota OF Periodontal Abscesses*. *J. Dent. Res.*

- Grossi, S. G., Goodson, J. M., Gunsolley, J. C., Otomo-Corgel, J., Bland, P. S., Doherty, F., & Comiskey, J. (2007). Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-complex bacteria in smokers. *J J. Periodontol.*, 78(9), 1741-1750.
- Grossi, S. G., Skrepicki, F. B., DeCaro, T., Zambon, J. J., Cummins, D., & Genco, R. J. (1996). Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J. Periodontol.*, 67, 1094-1102.
- Guan, R., Wang, J., Li, Z., Ding, M., Li, D., Xu, G., . . . Long, Z. (2018). Sodium tanshinone IIA sulfonate decreases cigarette smoke-induced inflammation and oxidative stress via blocking the activation of MAPK/HIF-1 α signaling pathway. *Front. Pharmacol.*, 9, 263.
- Gulsvik, A., & Fagerhol, M. (1979). Smoking and immunoglobulin levels. *The Lancet*, 313(8113), 449.
- Gunsolley, J., Pandey, J., Quinn, S., Tew, J., & Schenkein, H. (1997). The effect of race, smoking and immunoglobulin allotypes on IgG subclass concentrations. *J. Periodontal Res.*, 32(4), 381-387.
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K., & Kent, R. L. (1993). Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J. Periodontol.*, 64(1), 16-23.
- Haffajee, A., & Socransky, S. (2001). Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J. Clin. Periodontol.*, 28(5), 377-388.
- Haffajee, A., Teles, R. P., & Socransky, S. (2006). Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immun.*, 21(5), 269-282.

- Haffajee, A. D., Yaskell, T., Torresyap, G., Teles, R., & Socransky, S. S. (2009). Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 36(8), 642-649.
- Han, Y.-H., Smibert, R., & Krieg, N. (1991). *Wolinella recta*, *Wolinella curva*, *Bacteroides ureolyticus*, and *Bacteroides gracilis* are microaerophiles, not anaerobes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 41(2), 218-222.
- Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T.-J., Haake, S. K., Park, N.-H., Kuramitsu, H., & Genco, R. J. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.*, 68(6), 3140-3146.
- Handley, P. S., & Tipler, L. S. (1986). An electron microscope survey of the surface structures and hydrophobicity of oral and non-oral species of the bacterial genus *Bacteroides*. *Arch. Oral Biol.*, 31(5), 325-335.
- Hanioka, T., Tanaka, M., Ojima, M., Takaya, K., Matsumori, Y., & Shizukuishi, S. (2000). Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 71(12), 1846-1851.
- Harks, I., Jockel-Schneider, Y., Schlagenhauf, U., May, T. W., Gravemeier, M., Prior, K., . . . Ehmke, B. (2016). Impact of the daily use of a microcrystal hydroxyapatite dentifrice on de novo plaque formation and clinical/microbiological parameters of periodontal health. A randomized trial. *PloS one*, 11(7), e0160142.

- Hartroth, B., Seyfahrt, I., & Conrads, G. (1999). Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol.*, 14(5), 326-330.
- Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., . . . Cooke, J. P. (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat. Med.*, 7(7), 833-839.
- Heeschen, C., Weis, M., Aicher, A., Dimmeler, S., & Cooke, J. P. (2002). A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Clin. Investig.*, 110(4), 527-536.
- Heinrich, S., & Pulverer, G. (1959). On the etiology and microbiology of actinomycosis. III. The pathogenic significance of *A. actinomycetem comitans* among the accompanying bacteria of *A. israelii*. *entralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg.*, 176(1-2).
- Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1. *Blood*, 94(5), 1561-1567.
- Henderson, B., Curtis, M., Seymour, R., & Donos, N. (2009). *Periodontal medicine and systems biology*: John Wiley & Sons.
- Henderson, B., Ward, J. M., & Ready, D. (2010). *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A. periodontopathogen *Periodontol.* 2000, 54(1), 78-105.
- Hersey, P., Prendergast, D., & Edwards, A. (1983). Effects of cigarette smoking on the immune system: Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking. *Med. J. Aust.*, 2(9), 425-429.

- Hill, G. B., Ayers, O., & Kohan, A. (1987). Characteristics and sites of infection of *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, and other asaccharolytic eubacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 25(8), 1540-1545.
- Hillman, J., Socransky, S., & Shivers, M. (1985). The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, 30(11), 791-795.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.*, 56(4), 549-580.
- Holmes, B., Pickett, M., & Hollis, D. (1995). Unusual gram-negative bacteria, including *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Pasteurella*, and *Streptobacillus*. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM News, 449-508.
- Holmes, L. G. (1990). Effects of smoking and/or vitamin C on crevicular fluid flow in clinically healthy gingiva. *Quintessence Int.*, 21(3).
- Holt, P. (1987). Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax*, 42(4), 241.
- Holt, S., Simpson, J., & Leadbetter, E. (1975). *Some characteristics of gliding bacteria isolated from human dental plaque*. *J. Dent. Res.*
- Holt, S. C., & Bramanti, T. E. (1991). Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 2(2), 177-281.
- Holt, S. C., Kesavalu, L., Walker, S., & Genco, C. A. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000, 20(1), 168-238.

- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., & Lee, F. S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J. Biol. Chem*, 277(42), 39792-39800.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., & Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J. Biol. Chem.*, 271(50), 32253-32259.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *PNAS*, 95(14), 7987-7992.
- Hugod, C., Hawkins, L., & Astrup, P. (1978). Exposure of passive smokers to tobacco smoke constituents. *Int Arch Occup Environ Health*. 42(1), 21-29.
- Jacobi, J., Jang, J. J., Sundram, U., Dayoub, H., Fajardo, L. F., & Cooke, J. P. (2002). Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am. J. Pathol.*, 161(1), 97-104.
- James, J. A., Sayers, N. M., Drucker, D. B., & Hull, P. S. (1999). Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontol.*, 70(5), 518-525.
- Jensen, J., Liljemark, W., & Bloomquist, C. (1981). The Effect of Female Sex Hormones on Subgingival Plaque. *J. Periodontol.*, 52(10), 599-602.
- Jervøe-Storm, P. M., Koltzsch, M., Falk, W., Dörfler, A., & Jepsen, S. (2005). Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 32(7), 778-783.

- Jiang, B.-H., Semenza, G. L., Bauer, C., & Marti, H. H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 271(4), C1172-C1180.
- Johnson, G. K., Guthmiller, J. M., Joly, S., Organ, C., & Dawson, D. (2010). Interleukin-1 and interleukin-8 in nicotine-and lipopolysaccharide-exposed gingival keratinocyte cultures. *J. Periodontal Res.*, 45(4), 583-588.
- Johnson, J. D., Houchens, D. P., Kluwe, W. M., Craig, D. K., & Fisher, G. L. (1990). Effects of mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review. *Crit. Rev. Toxicol.*, 20(5), 369-395.
- Kaelin Jr, W. G. (2007). Von hippel-lindau disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2, 145-173.
- Kaelin Jr, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell.*, 30(4), 393-402.
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., & Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *PNAS*, 94(11), 5667-5672.
- Kamma, J. J., Nakou, M., & Baehni, P. (1999). Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 34(1), 25-33.
- Keith, B., Adelman, D. M., & Simon, M. C. (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *PNAS*, 98(12), 6692-6697.

- Kenney, E., Kraal, J., Saxe, S., & Jones, J. (1977). The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J. Periodontal Res.*, 12(4), 227-234.
- Khan, G. J., Mehmood, R., & Marwat, F. M. (2005). Secretion of calcium in the saliva of long-term tobacco users. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 17(4).
- Kim, Y., Flynn, T. R., Donoff, R. B., Wong, D. T., & Todd, R. (2002). The gene: the polymerase chain reaction and its clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 60(7), 808-815.
- Kinane, D., & Chestnutt, I. (2000). Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 11(3), 356-365.
- Kinane, D., Zhang, P., Benakanakere, M., Singleton, J., Biesbrock, A., Nonnenmacher, C., & He, T. (2015). Experimental gingivitis, bacteremia and systemic biomarkers: a randomized clinical trial. *J. Periodontal Res.*, 50(6), 864-869.
- Kirby, A., Meghji, S., Nair, S., White, P., Reddi, K., Nishihara, T., . . . Wilson, M. (1995). The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J. Clin. Investig.*, 96(3), 1185.
- Kitani, A., & Strober, W. (1993). Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J. Immunol. Res.*, 151(7), 3478-3488.
- Koivunen, P., Tiainen, P., Hyvärinen, J., Williams, K. E., Sormunen, R., Klaus, S. J., . . . Myllyharju, J. (2007). An endoplasmic reticulum transmembrane prolyl 4-hydroxylase is induced by hypoxia and acts on hypoxia-inducible factor α . *J. Biol. Chem.*, 282(42), 30544-30552.
- Kraal, J., Chancellor, M., Bridges, R., Bemis, K., & Hawke, J. (1977). Variations in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate in dogs induced by

- chemotactic autologous serum and migration inhibitor from tobacco smoke. *J. Periodontal Res.*, 12(4), 242-249.
- Kubota, M., Tanno-Nakanishi, M., Yamada, S., Okuda, K., & Ishihara, K. (2011). Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *BMC Oral Health*, 11(1), 1.
- Kuhlmann, C. R. W., Scharbrodt, W., Schaefer, C. A., Most, A. K., Backenköhler, U., Neumann, T., . . . Wiecha, J. (2005). Discordant effects of nicotine on endothelial cell proliferation, migration, and the inward rectifier potassium current. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 38(2), 315-322.
- Kuramitsu, H. K., Chen, W., & Ikegami, A. (2005). Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol.*, 76(11-s), 2047-2051.
- Lalla, E. (2007). Periodontal infections and diabetes mellitus: when will the puzzle be complete. *J. Clin. Periodontol.*, 34(11), 913-916.
- Lang, K. J., Kappel, A., & Goodall, G. J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol. Biol. Cell.*, 13(5), 1792-1801.
- Li, H., Ko, H. P., & Whitlock, J. P. (1996). Induction of Phosphoglycerate Kinase 1 Gene Expression by Hypoxia Roles OF Arnt and HIF1 α . *J. Biol. Chem.*, 271(35), 21262-21267.
- Li, X., & Eriksson, U. (2001). Novel vegf family members: Vegf-b, vegf-c and vegf-d. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(4), 421-426.
- Linden, G. J., & Mullally, B. H. (1994). Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J. Periodontol.*, 65(7), 718-723.

- Lindhe, J., Lang, N. P., & Karring, T. (2009). *Clinical periodontology and implant dentistry*: John Wiley & Sons.
- Listgarten, M. A., & Lai, C. H. (1979). Comparative ultrastructure of *Bacteroides melaninogenicus* subspecies. *J. Periodontal Res.*, *14*(4), 332-340.
- Loe, H., & Silness, J. (1963). Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol. Scand.*, *21*, 533-551.
- Loesche, W. J., Syed, S. A., Laughon, B. E., & Stoll, J. (1982). The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.*, *53*(4), 223-230.
- Loomer, P. M. (2004). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000, *34*(1), 49-56.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., . . . Semenza, G. L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, *145*(5), 732-744.
- Luo, W., Lin, B., Wang, Y., Zhong, J., O'Meally, R., Cole, R. N., . . . Semenza, G. L. (2014). PHD3-mediated prolyl hydroxylation of nonmuscle actin impairs polymerization and cell motility. *Mol. Biol. Cell.*, *25*(18), 2788-2796.
- M. Shaddox, L., Andia, D. C., Casati, M. Z., Nociti Jr, F. H., Sallum, E. A., Gollwitzer, J., & Walker, C. B. (2007). Microbiologic changes following administration of locally delivered doxycycline in smokers: a 15-month follow-up. *J. Periodontol.*, *78*(11), 2143-2149.
- MacFarlane, G. D., Herzberg, M. C., Wolff, L. F., & Hardie, N. A. (1992). Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J. Periodontol.*, *63*(11), 908-913.

- Machuca, G., Rosales, I., Lacalle, J. R., Machuca, C., & Bullón, P. (2000). Effect of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. *J. Periodontol.*, 71(1), 73-78.
- Macuch, P., & Tanner, A. (2000). *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 79(2), 785-792.
- Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Eksomtramate, M., Rerkyen, P., Phairat, B., Schaecher, K., . . . Pichyangkul, S. (2009). Cigarette smoke extract modulates human β -defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.*, 44(4), 557-564.
- Malin, D. H., Lake, J. R., Newlin-Maultsby, P., Roberts, L. K., Lanier, J. G., Carter, V. A., . . . Wilson, O. B. (1992). Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 43(3), 779-784.
- Mancini, N., Bene, M., Gerard, H., Chabot, F., Faure, G., Polu, J., & Lesur, O. (1993). Early effects of short-time cigarette smoking on the human lung: a study of bronchoalveolar lavage fluids. *Lung*, 171(5), 277-291.
- Marks, M., Burch, J., & Collins, A. (1983). Genetics of nicotine response in four inbred strains of mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226(1), 291-302.
- Marks, M. J., Burch, J. B., & Collins, A. C. (1983). Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226(3), 817-825.
- Marks, M. J., Stitzel, J. A., & Collins, A. C. (1986). Dose-response analysis of nicotine tolerance and receptor changes in two inbred mouse strains. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 239(2), 358-364.

- Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., . . . Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem. J.*, 381(3), 761-767.
- Mason, M. R., Preshaw, P. M., Nagaraja, H. N., Dabdoub, S. M., Rahman, A., & Kumar, P. S. (2015). The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. *The ISME journal*, 9(1), 268-272.
- Mavropoulos, A., Aars, H., & Brodin, P. (2003). Hyperaemic response to cigarette smoking in healthy gingiva. *J. Clin. Periodontol.*, 30(3), 214-221.
- McGuire, J. R., McQuade, M. J., Rossmann, J. A., Garnick, J. J., Sutherland, D. E., Scheidt, M. J., & Van Dyke, T. E. (1989). Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 60(4), 176-181.
- Metzen, E., Stiehl, D. P., Doege, K., Marxsen, J. H., Hellwig-Bürgel, T., & Jelkmann, W. (2005). Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem. J.*, 387(3), 711-717.
- Michaud, S. É., Dussault, S., Groleau, J., Haddad, P., & Rivard, A. (2006). Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 41(2), 275-284.
- Mineoka, T., Awano, S., Rikimaru, T., Kurata, H., Yoshida, A., Ansai, T., & Takehara, T. (2008). Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J. Periodontol.*, 79(4), 670-676.

- Miyamoto, E., Nakano, K., Fujita, K., Nomura, R., Okawa, R., Matsumoto, M., & Ooshima, T. (2009). Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch. Oral Biol.*, 54(4), 374-379.
- Moimaz, S. A. S., Zina, L. G., Saliba, O., & Garbin, C. A. S. (2009). Smoking and periodontal disease: clinical evidence for an association. *Oral Health Prev Dent.*, 7(4).
- Moon, E.-J., Jeong, C.-H., Jeong, J.-W., Kim, K. R., Yu, D.-Y., Murakami, S., . . . Kim, K.-W. (2004). Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α . *The FASEB journal*, 18(2), 382-384.
- Moon, J. H., Lee, J. H., & Lee, J. Y. (2015). Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Mol Oral Microbiol.*, 30(3), 227-241.
- Moore, W., Cato, E., & Holdeman, L. (1980). *Anaerobes associated with periodontal disease*. Paper presented at the Specia Symposium.
- Morikawa, M., Chiba, T., Tomii, N., Sato, S., Takahashi, Y., Konishi, K., . . . Imai, K. (2008). Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. *J. Periodontal Res.*, 43(3), 268-274.
- Morozumi, T., Kubota, T., Sato, T., Okuda, K., & Yoshie, H. (2004). Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 31(4), 267-272.
- Mosely, L. H., Finseth, F., & Goody, M. (1978). Nicotine and its effect on wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.*, 61(4), 570-575.

- Mousa, S., & Mousa, S. A. (2006). Cellular and molecular mechanisms of nicotine's pro-angiogenesis activity and its potential impact on cancer. *J. Cell. Biochem.*, 97(6), 1370-1378.
- Munemasa, T., Takemoto, T., Dahlen, G., Hino, T., Shiba, H., Ogawa, T., . . . Kurikara, H. (1999). Adherence of *Bacteroides forsythus* to host cells. *Microbios*, 101(399), 115-126.
- Muranaka, H., Higashi, E., Itani, S., & Shimizu, Y. (1988). Evaluation of nicotine, cotinine, thiocyanate, carboxyhemoglobin, and expired carbon monoxide as biochemical tobacco smoke uptake parameters. *Int Arch Occup Environ Health*, 60(1), 37-41.
- Murdoch, D., Mitchelmore, I., & Tabaqchali, S. (1988). Peptostreptococcus micros in polymicrobial abscesses. *The Lancet*, 331(8585), 594.
- Müller, H. P., Heinecke, A., Borneff, M., Knopf, A., Kiencke, C., & Pohl, S. (1997). Microbial ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* and *Capnocytophaga* spp. in adult periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 32(6), 530-542.
- Nair, P., Sutherland, G., Palmer, R., Wilson, R., & Scott, D. (2003). Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. *J. Clin. Periodontol.*, 30(5), 435-437.
- Najar, F. Z. (2002). *Sequence and analysis of Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Nakamura, M., & Slots, J. (1982). Aminopeptidase activity of *Capnocytophaga*. *J. Periodontal Res.*, 17(6), 597-603.

- Nakatani, Y., Umemoto, T., Nakamura, Y., & Namikawa, I. (1994). Fibronectin-Binding Proteins of Host-Associated Spirochetes. *菌科基礎医学会雑誌*, 36(3), 330-334.
- Natto, S., Baljoon, M., Dahlén, G., & Bergström, J. (2005). Tobacco smoking and periodontal microflora in a Saudi Arabian population. *J. Clin. Periodontol.*, 32(6), 549-555.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal*, 13(1), 9-22.
- Newman, M. G., & Sims, T. N. (1979). The predominant cultivable microbiota of the periodontal abscess. *J. Periodontol.*, 50(7), 350-354.
- Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A., & Crawford, A. (1976). Studies of the microbiology of periodontosis. *J. Periodontol.*, 47(7), 373-379.
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2011). *Carranza's clinical periodontology*: Elsevier health sciences.
- Ng, M., Freeman, M. K., Fleming, T. D., Robinson, M., Dwyer-Lindgren, L., Thomson, B., . . . Lopez, A. D. (2014). Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *Jama*, 311(2), 183-192.
- Ng, M. K., Wu, J., Chang, E., Wang, B.-y., Katzenberg-Clark, R., Ishii-Watabe, A., & Cooke, J. P. (2007). A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27(1), 106-112.
- Numabe, Y., Ogawa, T., Kamoi, H., Kiyonobu, K., Sato, S., Kamoi, K., & Deguchi, S. (1998). Phagocytic function of salivary PMN after smoking or secondary smoking. *Ann. Periodontol.*, 3(1), 102-107.

- Oehme, F., Ellinghaus, P., Kolkhof, P., Smith, T. J., Ramakrishnan, S., Hütter, J., . . . Flamme, I. (2002). Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296(2), 343-349.
- Ohishi, K., Yamamoto, T., Tomofuji, T., Tamaki, N., & Watanabe, T. (2005). Isolation and characterization of aminopeptidase from *Capnocytophaga granulosa* ATCC 51502. *Oral Microbiol Immunol.*, 20(2), 67-72.
- Okoli, C. T., Kelly, T., & Hahn, E. J. (2007). Secondhand smoke and nicotine exposure: a brief review. *Addict. Behav.*, 32(10), 1977-1988.
- Onesto, C., Berra, E., Grépin, R., & Pagès, G. (2004). Poly (A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J. Biol. Chem.*, 279(33), 34217-34226.
- Organization, W. H. (2015). *WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015*: World Health Organization.
- Ortége, N., Hutchings, H., & Plouët, J. (1999). Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci*, 4, D141-D152.
- Palmer, R. (1988). Tobacco smoking and oral health. *Br. Dent. J.*, 164(8), 258.
- Palmer, R., Scott, D., Meekin, T., Poston, R., Odell, E., & Wilson, R. (1999). Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J. Periodontal Res.*, 34(7), 363-369.
- Pankow, W., Neumann, K., Rüschoff, J., Schröder, R., & von Wichert, P. (1991). Reduction in HLA-DR antigen density on alveolar macrophages of smokers. *Lung*, 169(1), 255-262.

- Papasian, C., McGregor, D., Hodges, G., & Kennedy, J. (1986). Peptostreptococcal vertebral osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.*, 24(4), 633-635.
- Pauletto, N. C., Liede, K., Nieminen, A., Larjava, H., & Uitto, V. J. (2000). Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *J. Periodontol.*, 71(1), 58-62.
- Payne, J. B., Johnson, G., Reinhardt, R. A., Dyer, J., Maze, C., & Dunning, D. G. (1996). Nicotine effects on PGE₂ and IL-1 β release by LPS-treated human monocytes. *J. Periodontal Res.*, 31(2), 99-104.
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Whiting, P. J., & Lindstrom, J. (1994). Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol. Pharmacol.*, 46(3), 523-530.
- Persson, L., & Bergström, J. (1998). Smoking and vascular density of healthy marginal gingiva. *Eur J Oral Sci.*, 106(5), 953-957.
- Persson, L., Bergström, J., Gustafsson, A., & Asman, B. (1999). Tobacco smoking and gingival neutrophil activity in young adults. *J. Clin. Periodontol.*, 26(1), 9-13.
- Persson, L., Bergström, J., Ito, H., & Gustafsson, A. (2001). Tobacco smoking and neutrophil activity in patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 72(1), 90-95.
- Persson, R. E., Hollender, L. G., & Persson, G. R. (1998). Assessment of alveolar bone levels from intraoral radiographs in subjects between ages 15 and 94 years seeking dental care. *J. Clin. Periodontol.*, 25(8), 647-654.
- Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landázuri, M. O., & del Peso, L. (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that

- regulates the expression of the egl nine homologue 3 (eglⁿ³/phd3) gene. *Biochem. J.*, 390(1), 189-197.
- Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., & Dani, J. A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, 390(6658), 401.
- Pietinalho, A., Pelkonen, A., & Rytälä, P. (2009). Linkage between smoking and asthma. *Allergy*, 64(12), 1722-1727.
- Place, T. L., & Domann, F. E. (2013). Prolyl-hydroxylase 3: evolving roles for an ancient signaling protein. *Hypoxia*, 1, 13.
- Poggi, P., Rota, M., & Boratto, R. (2002). The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J. Periodontal Res.*, 37(3), 230-235.
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., & Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*, 382(6588), 255.
- Poore, T. K., Johnson, G. K., Reinhardt, R. A., & Organ, C. C. (1995). The Effects of Smokeless Tobacco on Clinical Parameters of Inflammation and Gingival Crevicular Fluid Prostaglandin E₂, Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . *J. Periodontol.*, 66(3), 177-183.
- Potempa, J., Pavloff, N., & Travis, J. (1995). Porphyromonas gingivalis: a proteinase/gene accounting audit. *TRENDS MICROBIOL.*, 3(11), 430-434.
- Preber, H., & Bergström, J. (1985). Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontol. Scand.*, 43(5), 315-320.
- Preber, H., & BERGSTRÖM, J. (1986). Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Eur J Oral Sci.*, 94(2), 102-108.

- Preber, H., Bergström, J., & Linder, L. E. (1992). Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J. Clin. Periodontol.*, 19(9), 667-671.
- Preber, H., Linder, L., & Bergström, J. (1995). Periodontal healing and periopathogenic microflora in smokers and non-smokers. *J. Clin. Periodontol.*, 22(12), 946-952.
- Rabinowitz, M. H. (2013). Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J. Med. Chem.*, 56(23), 9369-9402.
- Rafiei, M., Kiani, F., Sayehmiri, K., Sayehmiri, F., Tavirani, M., Dousti, M., & Sheikhi, A. (2018). Prevalence of anaerobic bacteria (*P. gingivalis*) as major microbial agent in the incidence periodontal diseases by meta-analysis. *J Dent.*, 19(3), 232.
- Rams, T. E., Feik, D., Listgarten, M. A., & Slots, J. (1992). *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immun.*, 7(1), 1-6.
- Raulin, L., McPherson, J. r., McQuade, M., & Hanson, B. (1988). The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J. Periodontol.*, 59(5), 318-325.
- Renvert, S., Dahlén, G., & Wikström, M. (1998). The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *J. Clin. Periodontol.*, 25(2), 153-157.
- Reynolds, H., Van Winkelhoff, A., Schifferle, R., Chen, P., & Zambon, J. (1989). Relationship of encapsulation of *Bacteroides gingivalis* to invasiveness. *J Dent Res*, 68, 328.
- Rezavandi, K., Palmer, R., Odell, E., Scott, D., & Wilson, R. (2002). Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. *J. Oral Pathol Med.*, 31(1), 59-64.

- Richard, D. E., Berra, E., & Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 275(35), 26765-26771.
- Riep, B., Edesi-Neuß, L., Claessen, F., Skarabis, H., Ehmke, B., Flemmig, T. F., . . . Moter, A. (2009). Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers. *J. Clin. Microbiol.*, 47(6), 1705-1711.
- Riggio, M., Lennon, A., & Roy, K. (1998). Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J. Periodontal Res.*, 33(6), 369-376.
- Robertson, M. D., Boyd, J. E., Collins, H. P., & Davis, J. (1984). Serum immunoglobulin levels and humoral immune competence in coalworkers. *Am. J. Ind. Med.*, 6(5), 387-393.
- Roskoski Jr, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 62(3), 179-213.
- Ryder, M. I., Fujitaki, R., Johnson, G., & Hyun, W. (1998). Alterations of neutrophil oxidative burst by in vitro smoke exposure: implications for oral and systemic diseases. *Ann. Periodontol.*, 3(1), 76-87.
- Rylev, M., & Kilian, M. (2008). Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J. Clin. Periodontol.*, 35, 346-361.
- Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, I., & Benno, Y. (2002). Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52(3), 841-849.

- Salceda, S., & Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.*, 272(36), 22642-22647.
- Salvi, G. E., Ramseier, C. A., Kandylaki, M., Sigrist, L., Awedowa, E., & Lang, N. P. (2005). Experimental gingivitis in cigarette smokers: a clinical and microbiological study. *J. Clin. Periodontol.*, 32(5), 441-447.
- Santos, C. F. d., Sakai, V. T., Machado, M. A. d. A. M., Schippers, D. N., & Greene, A. S. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J. of Appl. Oral Sci.*, 12(1), 1-11.
- Sasagawa, S., Suzuki, K., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1985). Effects of nicotine on the functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 37(5), 493-502.
- Scabbia, A., Cho, K. S., Sigurdsson, T. J., Kim, C. K., & Trombelli, L. (2001). Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. *J. Periodontol.*, 72(1), 43-49.
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5(5), 343.
- Schwartz, R. D., & Kellar, K. J. (1983). Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation in vivo. *sci.*, 220(4593), 214-216.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, 3(10), 721.

- Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B.-H., . . . Yu, A. (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.*, 51(2), 553-555.
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.*, 12(12), 5447-5454.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M. L., & Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62.
- Sharma, A., Inagaki, S., Honma, K., Sfintescu, C., Baker, P., & Evans, R. (2005). Tannerella forsythia-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *J. Dent. Res.*, 84(5), 462-467.
- Sharma, A., Sojar, H. T., Glurich, I., Honma, K., Kuramitsu, H. K., & Genco, R. J. (1998). Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect. immun.*, 66(12), 5703-5710.
- Shchipkova, A., Nagaraja, H., & Kumar, P. (2010). Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J. Dent. Res.*, 89(11), 1247-1253.
- Shea, A. K., & Steiner, M. (2008). Cigarette smoking during pregnancy. *Nicotine Tob Res.*, 10(2), 267-278.
- Sheiham, A. (1971). Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. *J. Periodontol.*, 42(5), 259-263.
- Sheng, W.-S., Hsueh, P.-R., Hung, C.-C., Teng, L.-J., Chen, Y.-C., & Luh, K.-T. (2001). Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections

- and microbiological characteristics of the causative isolates. *Euro J Clin Microbiol Infect Dis.*, 20(4), 231-236.
- Shiloah, J., Patters, M. R., & Waring, M. B. (2000). The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers. *J. Periodontol.*, 71(4), 562-567.
- Shimazaki, Y., Saito, T., Kiyohara, Y., Kato, I., Kubo, M., Iida, M., & Yamashita, Y. (2006). The influence of current and former smoking on gingival bleeding: the Hisayama study. *J. Periodontol.*, 77(8), 1430-1435.
- Shurin, S. B., Socransky, S. S., Sweeney, E., & Stossel, T. P. (1979). A neutrophil disorder induced by capnocytophaga, a dental micro-organism. *N. Engl. J. Med.*, 301(16), 849-854.
- Shyu, K.-G., Wang, M.-T., Wang, B.-W., Chang, C.-C., Leu, J.-G., Kuan, P., & Chang, H. (2002). Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc. Res.*, 54(3), 576-583.
- Silness, J., & Loe, H. (1964). Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol. Scand.*, 22, 121-135.
- Slots, J. (1979). Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 6(5), 351-382.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000, 28, 12-55.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, 25(2), 134-144.

- Socransky, S. S., Smith, C., & Haffajee, A. D. (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 29(3), 260-268.
- Stevens, R., Sela, M., McArthur, W., Nowotny, A., & Hammond, B. (1980). Biological and chemical characterization of endotoxin from *Capnocytophaga sputigena*. *Infect. immun.*, 27(1), 246-254.
- Stiehl, D. P., Wirthner, R., Köditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G., & Wenger, R. H. (2006). Increased Prolyl 4-Hydroxylase Domain Proteins Compensate for Decreased Oxygen Levels Evidence for AN Autoregulatory Oxygen-Sensing System. *Rev. Infect. Dis.*, 281(33), 23482-23491.
- Stoloff, A. L., & Gillies, M. L. (1986). Infections with *Eikenella corrodens* in a general hospital: a report of 33 cases. *Rev. Infect. Dis.*, 8(1), 50-53.
- Stoltenberg, J. L., Osborn, J. B., Pihlstrom, B. L., Herzberg, M. C., Aeppli, D. M., Wolff, L. F., & Fischer, G. E. (1993). Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J. Periodontol.*, 64(12), 1225-1230.
- Suda, R., Kobayashi, M., Nanba, R., Iwamaru, M., Hayashi, Y., Lai, C.-H., & Hasegawa, K. (2004). Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J. Periodontol.*, 75(8), 1084-1089.
- Suda, R., Lai, C.-H., Yang, H.-W., & Hasegawa, K. (2002). *Eikenella corrodens* in subgingival plaque: relationship to age and periodontal condition. *J. Periodontol.*, 73(8), 886-891.
- Sundqvist, G., Figdor, D., Hänström, L., Sörlin, S., & Sandström, G. (1991). Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Oral Sci.*, 99(2), 117-129.

- Swan, G. E., Habina, K., Means, B., Jobe, J. B., & Esposito, J. L. (1993). Saliva cotinine and recent smoking--evidence for a nonlinear relationship. *Public Health Rep.*, 108(6), 779.
- Takano, S., Yoshii, Y., Kondo, S., Suzuki, H., Maruno, T., Shirai, S., & Nose, T. (1996). Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res.*, 56(9), 2185-2190.
- Tal, M. (1980). Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J. Periodontol.*, 51(11), 668-669.
- Tang, G., Kitten, T., Munro, C. L., Wellman, G. C., & Mintz, K. P. (2008). EmaA, a potential virulence determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in infective endocarditis. *Infect. immun.*, 76(6), 2316-2324.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., & Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO Rep.*, 19(16), 4298-4309.
- Tanner, A., Listgarten, M., Ebersole, J., & Strzempko, M. (1986). *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 36(2), 213-221.
- Tanner, A., Maiden, M., Macuch, P., Murray, L., & Kent, R. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 25(2), 85-98.
- Tanner, A. C., Badger, S., Lai, C.-H., Listgarten, M. A., Visconti, R. A., & Socransky, S. S. (1981). *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella*

- corrodens from humans with periodontal disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 31(4), 432-445.
- Tanner, A. C., & Izard, J. (2006). *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol.* 2000, 42(1), 88-113.
- Tanner, A. C. R., Haffer, C., Bratthall, G., Visconti, R., & Socransky, S. (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.*, 6(5), 278-307.
- Tanur, E., McQuade, M. J., McPherson, J. C., Al-Hashimi, I. H., & Rivera-Hidalgo, F. (2000). Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J. Periodontol.*, 71(5), 717-722.
- Taylor, C. T. (2008). Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem. J.*, 409(1), 19-26.
- Tenenbaum, H., Elkaim, R., Cuisinier, F., Dahan, M., Zamanian, P., & Lang, J. (1997). Prevalence of six periodontal pathogens detected by DNA probe method in HIV vs non-HIV periodontitis. *Oral Dis*, 3(S1), S153-S155.
- Tew, J. G., Zhang, J. B., Quinn, S., Tangada, S., Nakashima, K., Gunsolley, J. C., . . . Califano, J. V. (1996). Antibody of the IgG2 subclass, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and early-onset periodontitis. *J. Periodontol.*, 67, 317-322.
- Tipton, D. A., & Dabbous, M. K. (1995). Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodontol.*, 66(12), 1056-1064.
- Toiviainen, A., Jalasvuori, H., Lahti, E., Gursoy, U., Salminen, S., Fontana, M., . . . Paster, B. (2015). Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus*

- rhamnosus GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin. Oral Investig.*, 19(1), 77-83.
- Tompkins, G. R., Wood, D. P., & Birchmeier, K. R. (1997). Detection and comparison of specific hemin binding by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *J. Bacteriol.*, 179(3), 620-626.
- Tonetti, M. S. (1998). Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann. Periodontol.*, 3(1), 88-101.
- Tuckerman, J. R., Zhao, Y., Hewitson, K. S., Tian, Y.-M., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2004). Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett.*, 576(1-2), 145-150.
- Ugur, M. G., Kutlu, R., & Kilinc, I. (2018). The effects of smoking on vascular endothelial growth factor and inflammation markers: A case-control study. *Clin Respir J.*, 12(5), 1912-1918.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J., & Slots, J. (1998). Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J. Periodontol.*, 69(10), 1111-1118.
- Urbán, E., Terhes, G., Radnai, M., Gorzó, I., & Nagy, E. (2010). Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe*, 16(3), 283-288.
- Vagas, E., & Akgül, A. G. (2009). Solunum sistemi fizyolojisi ve çocuklardaki farklar. *Türk Toraks Derg.*

- Van Dyke, T., Bartholomew, E., Genco, R., Slots, J., & Levine, M. (1982). Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J. Periodontol.*, 53(8), 502-508.
- Van Winkelhoff, A. (2003). Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg.*, 1(3), 131-137.
- Van Winkelhoff, A., Bosch-Tijhof, C., Winkel, E., & Van der Reijden, W. (2001). Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J. Periodontol.*, 72(5), 666-671.
- Van Winkelhoff, A., Loos, B., Van Der Reijden, W., & Van Der Velden, U. (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.*, 29(11), 1023-1028.
- van Winkelhoff, A. J. (2003). Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg.*, 1(3), 131-137. doi: 10.1034/j.1601-5037.2003.00031.x
- van Winkelhoff, A. J., & Slots, J. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol.* **2000**, 20(1), 122-135.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., & De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 41(1), 88-103.
- Villablanca, A. C. (1998). Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. *J. Appl. Physiol.*, 84(6), 2089-2098.

- Wakasa, Y., Takada, K., & Yanagita, T. (1995). Reinforcing effect as a function of infusion speed in intravenous self-administration of nicotine in rhesus monkeys. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi*= J Pharmacol Sci, 15(1), 53-59.
- Waldvogel, F. A., & Bisno, A. L. (2000). *Infections associated with indwelling medical devices*: ASM press Washington, DC.
- Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. PNAS, 92(12), 5510-5514.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. PNAS, 90(9), 4304-4308.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J. Biol. Chem., 270(3), 1230-1237.
- Whiting, P., & Lindstrom, J. (1988). Characterization of bovine and human neuronal nicotinic acetylcholine receptors using monoclonal antibodies. J. Neurosci, 8(9), 3395-3404.
- Willam, C., Maxwell, P. H., Nichols, L., Lygate, C., Tian, Y. M., Bernhardt, W., . . . Pugh, C. W. (2006). HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. J. Mol. Cell. Cardiol., 41(1), 68-77.
- Williams, R. C., Paquette, D. W., Offenbacher, S., Adams, D. F., Armitage, G. C., Bray, K., . . . Fiorellini, J. P. (2001). Treatment of periodontitis by local administration of minocycline microspheres: a controlled trial. J. Periodontol, 72(11), 1535-1544.

- Yamada, Y., Nezu, J.-i., Shimane, M., & Hirata, Y. (1997). Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*, 42(3), 483-488.
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242.
- Yang, N. Y., Zhang, Q., Li, J. L., Yang, S. H., & Shi, Q. (2014). Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of *P orphyromonas gingivalis*, *P revotella intermedia*, *T annerella forsythensis*, and *F usobacterium nucleatum*. *INT J PAEDIATR DENT*, 24(3), 226-233.
- Yazir, Y., Gonca, S., Filiz, S., & Dalçık, H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi (2004). *Cumhuriyet Medical Journal*.181-186.
- Zambon, J., Grossi, S., Machtei, E., Ho, A., Dunford, R., & Genco, R. (1996). Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J. Periodontol*, 67, 1050-1054.
- Zambon, J. J. (1985). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 12(1), 1-20.
- Zambon, J. J., & Haraszthy, V. I. (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol*. 2000, 7(1), 69-82.
- Zhou, J., & Windsor, L. J. (2006). *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J. Periodontal Res.*, 41(1), 47-54.

EKLER

ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : 83116987 - 326
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 16.04.2019
Toplantı No : 2019/07
Proje No : 19-KAEK-116

17.04.2019

Sayın, Dr. Öğretim Üyesi Özkan KARATAŞ

Etik Kurulumuzun 16.04.2019 tarihli toplantısında görüşülen 19-KAEK-116 kayıt numaralı **“Periodontal Olarak Sağlıklı Bireylerde Günlük İçilen Sigara Miktarına Bağlı Hipoksiyle İndüklenen Faktör (HİF) Sinyal Yolağının Araştırılması”** başlıklı çalışmanız gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

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

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç.Dr. Faruk KUTLUTÜRK
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

18 Nisan 1991 yılında İzmir’de doğdum. Lise öğrenimimi 2009 yılında Gaziantep Anadolu Lisesi’nde tamamladım.

2010 yılında Gaziantep Diş Hekimliği Fakültesi’ni kazandım ve 2015 yılında mezun oldum. 2016-2017 yıllarında Bitlis Ağız Diş Sağlığı Merkezi ve sonrasında Adıyaman Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalında çalıştım. 2017 yılında Tokat Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım ve devam etmekteyim.

Mail adresi: dt.ozgeozdemir@hotmail.com

Telefon numarası: 0(507) 729 34 80