



**ANDROJEN HORMON METABOLİZMASINDA
GÖREV ALAN 5α -REDÜKTAZIN PERİODONTAL
HASTALIKLARLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yerda ÖZKAN

Periodontoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Recep ORBAK

Ortak Danışman

Doç. Dr. Alpdoğan KANTARCI

Doktora Tezi-2019

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

**ANDROJEN HORMON METABOLİZMASINDA GÖREV
ALAN 5 α -REDÜKTAZIN PERİODONTAL
HASTALIKLARLA İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yerda ÖZKAN

**Periodontoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Recep ORBAK
Ortak Danışman
Doç. Dr. Alpdoğan KANTARCI**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANDROJEN HORMON METABOLİZMASINDA GÖREV ALAN
5 α -REDÜKTAZIN PERİODONTAL HASTALIKLARLA
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Yerda ÖZKAN

Tez Savunma Tarihi	: 08.03.2019
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Recep ORBAK (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Turgut DEMİR (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Nuran YANIKOĞLU (Atatürk Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Ayşe Ezel BERKER (Hacettepe Üniversitesi)
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Kamile ERCİYAS (Gaziantep Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
Erzurum-2019



Bu doktora tezi TÜBİTAK 2214/A burs programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Periodontal Hastalıklar ve Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması.....	4
2.2. Periodontopatojen Bakteriler	7
2.2.1. <i>Porphyromonas Gingivalis</i>	8
2.3. Sitokinler.....	9
2.3.1. Pro-enflamatuar Sitokinler.....	10
2.3.1.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β).....	10
2.3.1.2. Tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α)	10
2.3.1.3. İnterlökin-6 (IL-6).....	11
2.3.2. İnterlökin-8 (IL-8).....	11
2.3.3. İnterferon- γ (IFN- γ)	11
2.3.4. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)	12
2.4. Androjen Hormonlar	12
2.4.1. Periodontal Hastalıklar ve Testosteron Hormonu Arasındaki İlişki	12
2.5. 5- α Redüktaz Enzimi	13
2.6. Androjenetik Alopesi	14
2.6.1. 5- α Redüktaz Enzimi ve Androjenetik Alopesi	15
2.6.2. 5- α Redüktaz Enzimi ile Periodontal Doku İlişkisi	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Periodontal Hastalık ve Androgenetik Alopesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi İçin Epidemiyolojik Çalışma Planı	18
3.1.1. Periodontitis Hastalarından Gingival Biyopsi Örneklerinin Alınması	19
3.1.2. Dişeti Biyopsi Örneklerinin Parafine Gömülmesi	20
3.1.3. Dişeti Biyopsi Örneklerinin İmmunohistokimyasal Olarak Boyanması	20
3.1.4. Dişeti biyopsi örneklerinin hematoksilen-eozin ile boyanması	22
3.1.5. İmmunohistokimyasal Boyamaların ImageJ İle Değerlendirilmesi	23
3.2. Periodontal Hastalık ve Androgenetik Alopesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi İçin Dişeti Fibroblast Hücre Kültürü Çalışma Planı	23
3.2.1. Fibroblast Hücrelerinin İzolasyonu, Kültüre Edilmesi ve Pasajlanması	23
3.2.2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> A7436 Bakteri Kültürünün Elde Edilmesi	26
3.2.3. Real-time PCR için Trizol RNA İzolasyon Protokolü.....	26
3.2.4. RNA Miktarının, Kalitesi ve Saflığının Değerlendirilmesi	27
3.2.5. Reverse Transkripsiyon-cDNA sentezi	28
3.2.6. Step One Plus Real Time PCR	29
3.2.7. Dişeti Fibroblast Hücrelerinin İmmunositokimyasal Boyanması.....	31
3.2.8 İmmunositokimyasal Boyamaların ImageJ ile Değerlendirilmesi.....	33
3.3. Hücre Kültürü Süpernatantlarında IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN γ , MCP-1 Miktarlarının Bio-Plex Luminex ile Belirlenmesi	33
3.3.1. Fibroblast hücre kültürü süpernatantlarının hazırlanması	34
3.3.2. Immunoassay için reaktiflerin hazırlanması	34
3.3.2.1. Antikor-İmmobilize beadlerin Hazırlanması	34
3.3.2.2. Kalite kontrollerinin hazırlanması	34
3.3.2.3. Yıkama tamponunun hazırlanması	34

3.3.2.4. İnsan sitokin standardının hazırlanması.....	35
3.3.3. Immunoassay prosedürü	35
3.4. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Epidemiyolojik Çalışma Bulguları	38
4.2. Real Time PCR Bulguları	39
4.2.1. 5-alfa Redükteaz Tip 1 Enzimi mRNA Bulguları	39
4.2.2. 5-alfa Redükteaz Tip 2 Enzimi mRNA Bulguları	40
4.3. Dişeti Biyopsi Örneklerinde İmmunohistokimyasal Bulgular.....	41
4.3.1. 5-alfa Redükteaz Tip-1 Enzim Bulguları.....	41
4.4. Dişeti Fibroblast Hücrelerinde İmmunositokimyasal Bulgular	42
4.4.1. 5-alfa Redükteaz Tip-1 Enzim Bulguları.....	42
4.4.2. 5-alfa Redükteaz Tip 2 Enzim Bulguları	43
4.5. Dişeti Fibroblast Hücre Kültürü Süpernatantlarında Biyokimyasal Bulgular	44
4.5.1. IFN- γ Bulguları.....	44
4.5.2. IL-1 β Bulguları	44
4.5.3. IL-6 bulguları	45
4.5.4. IL-8 bulguları.....	46
4.5.5. TNF- α Bulguları	46
4.5.6. MCP-1 Bulguları.....	47
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
EKLER	69
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	69
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	70

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca beni bilgi ve deneyimleriyle destekleyen, iyi bir periodontolog ve bilim insanı olmam için elinden geleni yapan ve bana yol gösteren, aldığım kararlarda bana hep destek olan, ileri görüşlülüğü ile bana asla yorulmamayı ve pes etmemeyi öğreten, çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Recep ORBAK'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Forsyth Enstitüsündeki tez çalışmalarım süresince, bana çok değerli bilgi ve birikimleriyle yol gösteren, bilimsel araştırmalarımı her zaman destekleyen ve ortak danışmanım olarak beni onurlandıran çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Alpdoğan KANTARCI'ya en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimine başlamamda çok büyük katkısı olan ve bilgilerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Cenk Fatih ÇANAKCI'ya, bilgi ve deneyimlerini benle her zaman paylaşan Prof. Dr. Turgut DEMİR'e, Prof. Dr. Alparslan DİLSİZ'e, Doç. Dr. Taner ARABACI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Didem ÖZKAL EMİNOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 1059B141600460 nolu TÜBİTAK-2214/A bursu ile destekleyen TÜBİTAK'a ve TÜBİTAK çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan annem Dr. Serap ALPTEKİN'e sevgi, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dt. Yelda ÖZKAN

ÖZET

Androjen Hormon Metabolizmasında Görev Alan 5 α -Redüktazın Periodontal Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi

Amaç: Hipotezimiz periodontal hastalık ile androjenetik alopesi arasında bir ilişki olduğu, 5- α redüktazın bu ilişkide rol oynayabileceği ve bu enzim seviyelerinin periodontal hastalıkta etkin olan mikrobiyal ve iltihapsal mekanizmalarla bağlantılı olabileceğidir. Çalışmanın amacı, periodontitisle, 5- α redüktaz enzimi ve 5- α redüktaz enziminin sorumlu olduğu androjenetik alopesi arasındaki ilişkinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmanın ilk aşamasında androjenetik alopesi ile periodontitis arasındaki ilişki, epidemiyolojik ve kesitsel olarak ve 385 birey üzerinde değerlendirildi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise bu olası ilişkinin mekanizması hastalardan alınan dişeti örneklerinde immunohistokimyasal olarak incelendi. Toplam örneklem grubundan seçilen ve periodontal tedavi kapsamına dahil edilen 36 hastada periodontal tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere toplam 72 diş eti biyopsi örneği analiz edildi. Çalışmanın üçüncü aşamasında dişeti fibroblast hücre kültürü çalışmalarında hücrelerdeki 5- α redüktaz enzimi tip-1 ve tip-2 mRNA miktarları PCR ile ve protein düzeyleri immunositokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: Androjenetik alopesi ile periodontitis arasında epidemiyolojik olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.001$). Periodontal tedavi öncesi alınan diş eti biyopsilerinde Anti-SRD5A1 antikoru ile pozitif boyanan fibroblast hücre oranının, periodontal tedavi sonrası alınan biyopsilere göre daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Bu bilgilere göre periodontal hastalığa bağlı olarak dişetinde yüksek seviyede gözlenen tip-1 5- α redüktaz enziminin periodontal tedaviyle azaldığı, buna karşılık periodontal tedavinin tip-2 5- α redüktaz enzimi seviyelerini etkilemediği saptandı.

Bir periodontopatojen olan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ile enfekte edilen ve edilmeyen dişeti fibroblast hücre kültürü grupları karşılaştırıldığında, tip-1 5- α redüktaz enziminin mRNA ekspresyonunun enfekte grupta daha yüksek tespit edilmesine rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Buna karşılık, 5- α redüktaz tip 2 enzimi için *P. gingivalis* ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürü grubunda, enfekte edilmeyen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

Doğrulanmış toplam hücre floresansı (corrected total cell fluorescence-DTHF) *P. gingivalis* ile enfekte edilen dişeti fibroblast hücre kültürü grubunda enfekte edilmeyen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). *P. gingivalis* ile enfekte edilen ve edilmeyen dişeti fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki IL-6, TNF- α ve IL-8 miktarları istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunurken ($p<0.05$), IFN- γ , IL-1 β ve MCP-1 miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Bu bulgular ışığında androjenetik alopesi ile periodontal hastalık arasında bir ilişkinin olduğu, periodontal hastalık tedavisinin androjenetik alopesinin etiyolojisinde rol aldığı düşünülen 5- α redüktaz enziminin dişetindeki seviyesini azalttığı; hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda ise bir periodontopatojen olan *P. gingivalis*'in 5- α redüktaz enziminin seviyelerini ve buna paralel olarak proenflamatuar sitokin sentezini arttırdığı söylenebilir. Dolayısıyla androjenetik alopesi ile periodontal hastalık arasındaki ilişkinin iltihapsal olarak ve 5- α redüktaz enzim aktivasyonu mekanizmasıyla gerçekleştiği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Androjenetik alopesi, 5- α redüktaz, periodontal hastalık.

ABSTRACT

The Study of the Relationship of 5 α -Reductase Serving in the Metabolism of Androgen Hormone with Periodontal Diseases

Aim: Our hypothesis is that there is a relation between the periodontal disease and androgenetic alopecia and that 5- α reductase may be playing a role in this relation and these enzyme levels may be related to microbial and inflammatory mechanisms that are active in periodontal diseases. The objective of the study is to analyze the relation between periodontitis and 5- α reductase enzyme and the androgenetic alopecia for which 5- α reductase enzyme is responsible.

Material and Method: At the first phase of the study, the relation between androgenetic alopecia and periodontitis has been assessed epidemiologically and cross-sectionally on 385 individuals. In the second phase of the study, the mechanism of this relation has been assessed immunohistochemically according to the samples taken from the gums of patients. Both before and after the treatment, a total of 72 gum biopsy samples, chosen from the total sample group and included in the treatment scope of 36 patients, have been analyzed. At the third phase of the study, during the operations of gum fibroblast cell culture, 5- α reductase enzyme type – 1 and type 2 mRNA amounts were assessed through PCR and protein levels were assessed immunohistochemically.

Findings: A significant relation has been found between androgenetic alopecia and periodontitis ($p < 0.001$). The fact that the rate of Anti-SRD5A1 antibody and the fibroblast cell, painted in white, in the gum biopsies taken before the treatment have been higher related to the biopsies taken after the periodontal treatment, has been found to be statistically significant ($p < 0.001$). According to this information, type-1 5- α reductase enzyme, observed to be in high amounts in the gum, decreases through periodontal treatment, however, it does not affect type-2 5- α reductase enzyme levels.

Although the expression of type-1 5- α reductase enzyme mRNA has been detected to be higher in the infected group, when gum fibroblast cell culture groups infected with *Poryhyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), which is a periodontopatogen, are compared with non-infected ones, the difference between the groups has not been found to be statistically significant ($p > 0.05$). However, 5- α reductase type-2 enzyme has been found to be higher, with a statistically significant difference, in the fibroblast cell culture group infected with *P. gingivalis* related to the non-infected group. ($p < 0.05$).

Corrected total cell fluorescence-DTHF, infected with *P. gingivalis* in gum fibroblast cell culture group, has been found to be higher, with statistically significant difference, related to the non-infected group. ($p < 0.001$). While statistically significant different amounts of IL-6, TNF- α and IL-8 in the supernatants of infected and non-infected gum fibroblast cell culture groups has been found, ($p < 0.05$), a statistically important difference between the amounts of IFN- γ , IL-1 β and MCP-1 has not been found. ($p > 0.05$).

Conclusion: In the light of this information, it can be suggested that there is a relation between alopecia and periodontal disease reduces the amount of 5- α reductase enzyme, which is thought to play a role in the etiology of the androgenetic alopecia of periodontal disease treatment; according to the studies, performed on cell cultures, it can be suggested that *P. gingivalis*, which is a periodontopatogen, increases the levels of 5- α reductase enzyme and concordantly increases the proinflammatory cytokine synthesis. Therefore, it can be considered that the relation between androgenetic alopecia and periodontal disease occurs inflammatorily and through the mechanism of 5- α reductase enzyme activation.

Key Words: Androgenetic alopecia, 5- α reductase, periodontal disease.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5αR	: 5 α - redüktaz
5αR-1	: 5 α - redüktaz tip 1
5αR-2	: 5 α - redüktaz tip 2
AGA	: Androjenetik alopesi
DHT	: Di-hidro-testosteron
BPH	: Benign prostat hiperplazisi
IL-1β	: İnterlökin-1 β
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
INF- γ	: İnterferon- γ
TNF-α	: Tümör nekrotizan faktör- α
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Norwood-Hamilton skalası.....	19
Sekil 4.1. 5-alfa redükteaz tip-1 enzimi mRNA bulguları.....	40
Sekil 4.2. 5-alfa redükteaz tip-2 enzimi mRNA bulguları.....	40
Şekil 4.3. (A) Periodontal tedavi öncesi alınan biyopsi örneği ile (B) Periodontal tedavi sonrası alınan biyopsi örneklerinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri.....	41
Şekil 4.4. Tedavi öncesi ve sonrası diş eti biyopsi örneklerinde 5-alfa redükteaz tip 1 enzim bulguları.	41
Şekil 4.5. İmmunositokimyasal yöntem ile boyanan gingival fibroblast hücrelerinde 5-alfa Redükteaz tip-1 görüntüsü.....	42
Sekil 4.6. 5-alfa redükteaz tip-1 enzimi CTCF değerleri.	42
Şekil 4.7. İmmunositokimyasal yöntem ile boyanan gingival fibroblast hücrelerinde 5-alfa Redükteaz tip-2 görüntüsü.....	43
Sekil 4.8. 5-alfa redükteaz tip-2 enzimi CTCF değerleri.	43
Sekil 4.9. IFN- γ değerleri.	44
Sekil 4.10. IL-1 β değerleri.	45
Sekil 4.11. IL-6 değerleri.....	45
Sekil 4.12. IL-8 değerleri.....	46
Sekil 4.13. TNF- α değerleri.....	46
Sekil 4.14. MCP-1 değerleri.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Master mix karışımı	28
Tablo 3.2. PCR palet havuzundaki solüsyon içerikleri	30
Tablo 4.1. Çalışma gruplarında yaş dağılımları.	38
Tablo 4.2. Hastalarda alopesi skorlarının dağılımı.	38
Tablo 4.3. Çalışma gruplarında alopesi skorunun dağılımı.	39



1. GİRİŞ

Periodontitis, spesifik mikroorganizma grupları ya da spesifik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, dişin destek dokularını etkileyen, artan sondlama derinliği, diş eti çekilmesi veya her ikisiyle birlikte görülen periodontal ligament ve alveolar kemik yıkımıyla sonuçlanan enflamatuvar bir hastalıktır.¹ Periodontitisteki kemik yıkımının miktarı konak cevabı ve mikrobiyal dental plak arasındaki etkileşimle belirlenir. Periodontal hastalıkların etiyolojisi ve farklı tedavi yaklaşımları üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Periodontal dokularda hastalığın varlığını, periodontal hastalıkların aşamasını ve periodontal hastalık açısından bireylerin risk durumunu gösteren IL-1, IL-6, IL-8, IL-23, TNF- α , IFN- γ gibi biyolojik belirleyiciler sıklıkla incelenmektedir. Nitekim periodontitiste IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi immun sitokinlerde artış olduğu gösterilmiştir.² Bu iltihapsal sitokinlerin artışına bağlı olarak alveolar kemik yıkımında artış meydana geldiği düşünülmektedir.³

Periodontal hastalıkların etiyolojisindeki önemli faktörlerden biri hormonlardır. Tiroit, insülin ve cinsiyet hormonlarının periodontal hastalıklarla ilişkisi incelenmiştir. Cinsiyet hormonları büyüme, hücresel rejenerasyon ve farklılaşma gibi birçok metabolik faaliyetten sorumludurlar. Periodontal hastalıklar ve cinsiyet hormonları arasındaki ilişki farklı şekillerde açıklanabilir:

- 1- Hormonlar periodontopatojenlerin sayısında artış meydana getirebilir ve/veya vasküler yapıyı değiştirebilir,
- 2- İmmun sistem-endokrin sistem arasındaki etkileşimler periodontal doku cevabını değiştirebilir,
- 3- Fibroblastlar ve epitel hücreleri cinsiyet hormonlarına cevaben farklılaşabilirler.

Erkeklerde başlıca cinsiyet hormonları testosteron ve dihidrotestesterondur. Diş eti dokusu androjen hormon metabolizması için önemli hedef dokulardan biridir ve testosteron, periodontitis ile de ilişkilidir.^{4, 5} Testosteron seviyesiyle iltihap arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda düşük testosteron seviyesinin, TNF- α ve MIP-1 α ve -1 β ile korelasyon gösterdiği; kardiovasküler hastalıklar, mortalite, diabetes mellitus, metabolik sendrom ve kemik fraktür riskindeki artışla ilişkili olduğu bildirilmiştir.⁶⁻¹³ Artan iltihap biomarkerları ve diabetes mellitus gibi düşük testosteron seviyesiyle ilişkili patolojik durumlar periodontitis için de risk faktörü oluşturabilirler.¹⁴

Testosteron replasman tedavisi ile pro-enflamatuvar sitokinler IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde önemli azalmalar görülmüştür.¹⁵ Yüksek testosteron seviyesi ile periodontitisin şiddeti ve periodontopatojen mikroorganizmaların yüksek prevalansı arasında bağlantı gösterilmiştir.¹⁶ Steffens ve arkadaşları, erkek sıçanlarda yaptıkları çalışmada hem yüksek hem de düşük testosteron seviyesinin kemik kaybına sebep olduğu sonucuna varırken, düşük testosteron seviyesinin diş eti dokusunda IL-1 β 'yı artırdığını; yüksek testosteron seviyesinin ise RANKL seviyesinde farklılık oluşturduğunu bulmuştur.¹⁷

Androjen hormonlar hedef hücrelerine testosteron ya da di-hidro-testosteron olarak etki ederler. Testosteron, 5- α redüktaz enzimi tarafından perifer dokularda 5 kat daha aktif olarak androjen reseptörlerine bağlanma kapasitesine sahip olan di-hidro-testosterona dönüştürülür. 5- α redüktaz enziminin aktivitesi bağ dokusu ve kemikte, büyümeye ve tamire katkıda bulunur.^{18, 19} Ayrıca enflamasyonda tamirle alakalı büyüme faktörlerine cevaben insan diş eti dokusunda ve periodontal membranda artar.^{20, 21} Kronik enflamasyona sahip diş eti dokusundan elde edilen fibroblastlarda artmış androjen hormon metabolizması bulunmuştur.²² Dişeti ve periodontal membran yapısında 5- α redüktaz enzim aktivitesine saptanmıştır.^{21, 23} 5 α -redüktaz aktivitesi ile

periodontopatojen olan *Treponema denticola*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* ve *P.gingivalis* arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur.^{24, 25} 5- α redüktaz aynı zamanda androjenetik alopesiden de sorumludur.²⁶ Androjenetik alopesi erkeklerde en sık görülen saç dökülmesi sebebidir.²⁷ Kardiovasküler hastalıklar için androjenetik alopesinin risk faktörü olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.^{28, 29} 22,071 Amerikalı erkeğin dahil edildiği bir çalışmada, vertekste oluşan saç dökülmesinin kalp krizi riskini artırdığını göstermiştir.³⁰ Frontal saç dökülmesine sahip genç erkeklerde yapılan bir çalışmada, aynı yaş grubunda saç dökülmeyen bireylere göre daha yüksek serum kolesterol seviyesine ve daha yüksek kan basıncına sahip oldukları bulunmuştur.³⁰ Periodontal hastalıklar ile kardiovasküler hastalıklar ve yüksek kan basıncı arasında ilişki olduğu bilinmektedir.³¹

Bu bilgiler derlendiğinde bu çalışmadaki hipotezimizi “periodontal hastalık ile androjenetik alopesi arasında bir ilişki bulunduğu, 5- α redüktazın bu ilişkide rol oynayabileceği ve bu enzim seviyelerinin periodontal hastalıkta etkin olan mikrobiyal ve iltihapsal mekanizmalarla bağlantılı olabileceği” şeklinde oluşturduk. Bu hipotezi sınamak amacıyla çalışmamızın spesifik amaçlarını şu şekilde belirledik:

1. Periodontal hastalıkla androjenetik alopesinin ilişkisinin epidemiyolojik olarak incelenmesi,
2. Periodontal tedaviye bağlı olarak dişetindeki 5- α redüktaz seviyelerinin incelenmesi,
3. İnsan dişeti fibroblast hücre kültürlerinin periodontal hastalık patogenezinde etkin bir mikroorganizma olan *Porphyromonas gingivalis* ile enfekte edilerek, 5- α redüktaz enziminin seviyelerinin mRNA ve protein düzeyinde incelenmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar ve Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal hastalıklar, diş destekleyen diş eti, alveol kemiği ve periodontal ligamentin kronik enflamatuvar hastalıklarını kapsar. Periodontal hastalıklar, diş ve dişeti üzerinde oluşan mikrobiyal biyofilm bakteriler tarafından oluşturulan diş etinin lokalize iltihabı olan gingivitis ile başlar ve dişin çevresindekileri dokuları etkileyen, artan sondlama derinliği, diş eti çekilmesi veya her ikisiyle birlikte görülen periodontal ligament ve alveolar kemik yıkımıyla sonuçlanan periodontitise dönüşür.^{1, 32} Periodontitisteki kemik yıkımının miktarı konak cevabı ve mikrobiyal dental plak arasındaki etkileşimle belirlenir.³³ Bu patofizyolojik durum, periodontitisli dişlerin çekimi veya mikrobiyal dental plağın diş yüzeyinden uzaklaştırılmasıyla, enflamasyon azalınca kadar aktivite ve durgunluk dönemleriyle devam eder.³⁴

Kronik periodontitis ağırlıklı olarak yetişkinleri etkiler ve dünya nüfusunun %10-15'i periodontitisten dolayı diş destek yapılarının ciddi oranda kaybedilmesi sonucu oluşan diş kayıplarından etkilenmektedir.³⁴

2017 sınıflamasına göre periodontal hastalıklar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

A- Periodontal sağlık, gingival hastalık/durumlar

1- Periodontal sağlık ve diş eti sağlığı.³⁵

a. Klinik diş eti sağlıklı

b. Klinik olarak diş eti sağlıklı -çekilmiş periodonsiyum -

i. Stabil periodontitis hastası

ii. Non-periodontitis hastası

2- Gingivitis- Dental biofilm kaynaklı. ³⁶

a. Sadece dental biofilm kaynaklı

- b. Sistemik ya da lokal risk faktörleriyle alakalı
- c. İlaç kullanımına bağlı diş eti büyümeleri
- 3. Gingival hastalıklar-dental biofilm kaynaklı olmayanlar³⁷
 - a. Genetik/gelişimsel hastalıklar
 - b. Spesifik enfeksiyonlar
 - c. Enflamatuar ve immün durumlar
 - d. Reaktif prosesler
 - e. Neoplazmalar
 - f. Endokrin, beslenme ve metabolik hastalıklar
 - g. Travmatik lezyonlar
 - h. Dişetindeki pigmentasyonlar

B- Periodontitisler

- 1-Nekrotizan periodontal hastalıklar³⁸
 - a. Nekrotizan gingivitis
 - b. Nekrotizan periodontitis
 - c. Nekrotizan stomatitis
- 2- Sistemik hastalıkların manifestosu olarak periodontitis^{39, 40}
- 3- Periodontitis⁴¹⁻⁴³
 - a. Evreler: Periodontitisin şiddeti ve tedavi kompleksliğine göre
 - Evre 1: Başlangıç periodontitisi
 - Evre 2: Orta şiddette periodontitis
 - Evre 3: Diş kaybı potansiyeline sahip şiddetli periodontitis
 - Evre 4: Dentisyon kaybı potansiyeli olan şiddetli periodontitis
 - b. Genişlik ve dağılım: Lokalize; generalize; büyük azı-kesici dağılım
 - c. Sınıflar: Hızlı ilerleme kanıtı veya riski, beklenen tedavi cevabı

i. Sınıf A: Yavaş ilerleme

ii Sınıf B: Orta ilerleme

iii. Sınıf C: Hızlı ilerleme

C- Sistemik hastalıkların periodontal belirtileri, gelişimsel ve edinilen durumlar

1- Periodontal destek dokularını etkileyen sistemik hastalıklar veya durumlar⁴⁰

2- Diğer periodontal durumlar^{38, 44}

a. Periodontal apseler

b. Endodontik periodontal lezyonlar

3- Mukogingival deformiteler ve diş çevresi durumlar⁴⁵

a. Gingival fenotip

b. Diş eti/yumuşak doku çekilmeleri

c. Diş eti eksikliği

d. Vestibul derinlik azlığı

e. Anormal frenulum/kas pozisyonları

f. Diş eti fazlalığı

g. Anormal renk

h. Ortaya çıkan kök yüzeyi durumları

4- Travmatik okluzal kuvvetler⁴⁶

a. Primer okluzal travma

b. Sekonder okluzal travma

c. Ortodontik kuvvetler

5- Protezler ve plak kaynaklı diş eti hastalıklarını/periodontitisi değiştiren ya da buna yatkın hale getiren dişle ilgili faktörler⁴⁷

a. Lokalize diş alakalı faktörler

b. Lokalize dental protezlerle alakalı faktörler

2.2. Periodontopatojen Bakteriler

Son otuz yılda, periodontal enfeksiyonların polimikrobiyal olduğu genel olarak kabul edilmiştir.^{48, 49} Periodontal mikrobiyota ve konak arasındaki ilişkinin genellikle dengede olduğu kabul edilir, ancak spesifik bakteri türlerinin subgingival ceplerde aşırı çoğaldığında, periodontal enflamasyonla beraber alveol kemiği ve ataçman kaybı ile bağlantılı olduğu kabul edilir.⁵⁰

Periodontal hastalıkların karmaşık dental biyofilme nispeten sınırlı sayıda periodontal patojen tarafından başlatıldığı düşünülür.⁵⁰⁻⁵⁸ Dental biofilm bakterilerinin sadece küçük bir yüzdesi periodontal dokular için patojenik olarak tanımlanmaktadır. Bu bakterilerin çok küçük miktarda mevcut olsalar bile periodontal yapılara zarar verme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir. Klinik ve deneysel kanıtlar, periodontal ortamdaki belirli bakteri türlerinin ve suşlarının, gingivitis ve kemik yıkımını indükleyebileceğini doğrulamaktadır. Bu bakteri türleri ve suşları periodontal patojenler olarak tanımlanmaktadır.⁵⁵

Bakteri türlerinin periodontal dokularla ilgili patojenitesi, Koch'un postulatlarının Socransky tarafından modifiye edilmesiyle ve aşağıdaki kriterlere dayanarak değerlendirilir:⁵¹

- Hastalıkla bağlantılı olmak;
- Yapılan tedavinin hem klinik parametreler hem de onunla ilişkili mikrobiyota üzerinde etkili olması ve hastalığın remisyonu;
- Deney hayvanlarında da hastalığa neden olma yeteneğine sahip patojenite;
- Periodontal dokulara invazyon veya bakteriyel ürünler tarafından konakçı tepkisinin uyarılması;
- Bakterilerin konak dokularını tahrip etmede veya konak savunmasını engellemede seçici bir avantaj sağlayan, doğrudan ve dolaylı etkiye sahip

virölans faktörlerinin olması.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans ve *Porphyromonas gingivalis*, yukarıda listelenen tüm kriterleri yerine getiren periodontal patojenler olarak sınıflandırılabilirler.⁵¹ Diğer şüpheli periodontal patojenler ise: *Treponema denticola*, *T. Forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*, *Selenomonas türleri*.

2.2.1. *Porphyromonas Gingivalis*

Porphyromonas gingivalis, gram negatif ve zorunlu, anaerobik çubuk bakteridir. Büyümesinde demir için mutlak bir gereksinim vardır. *Porphyromonas* olarak yeniden sınıflandırılmadan önce *Bacteroides gingivalis* olarak adlandırılmıştır. Kanlı agar plaklarındaki *P. gingivalis* kolonilerinin demir birikimine bağlı olarak 6 ila 10 gün sonra kararmaya başlamasından dolayı *Porphyromonas* adı verilmiştir. *Porphyromonas* mor anlamına gelen yunanca sıfat porphyreos ve isim monas in birleşmesiyle oluşur.⁵⁹

Periodontal hastalıklar, dişleri destekleyen dokuların yıkımıyla karakterize kompleks, çok faktörlü, polimikrobiyal bir enfeksiyondur. Yıllar boyunca toplanan önemli veriler, subgingival plak içinde bulunan bakteri türlerinin, periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili olabileceğini göstermektedir. *P. gingivalis*’le ilgili yapılan kapsamlı araştırmalar, bu anaerobun periodontal hastalığın ilerlemesine katkısı konusunda çeşitli kanıtları ortaya çıkarmıştır.

P. gingivalis başlıca subgingival periodontal ceplerde bulunur. Zorunlu bir anaerob olan *P. gingivalis*, genellikle *Streptococcus gordonii* ve *P. intermedia* gibi primer kolonizelere bağlı olarak, dental biyofilmin sekonder koloneri olarak görev yapar. Bodet ve ark. (2006), bu bakterinin, ilerlemiş periodontal lezyonlarda kırmızı bakteri kompleksini oluşturmak için *T. denticola* ve *T. forsythia* ile ilişkili olduğunu göstermiştir.⁶⁰

P. gingivalis, periodontal hastalığın enflamatuvar patogenezinde ve ilerlemesinde birincil etiyolojik ajanlardan biri gibi görünmektedir.⁶¹ Bu periodontopatojen, kronik periodontitisli hastaların subgingival plak örneklerinin % 85.75'inde bulunmuştur.⁶² Yine yapılan pek çok çalışmada periodontitise sahip erişkin hastalarda *P. gingivalis*'e karşı serum antikör seviyelerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.^{63, 64}

P. gingivalis suşları, bir fare modelinde apse oluşturma yeteneklerine dayanarak istilacı ve istilacı olmayan suşlar halinde sınıflandırılmıştır. *P. gingivalis*'in istilacı türünün, hem in vitro hem de in vivo olarak istilacı olmayan türden daha fazla patojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.^{65, 66}

P. gingivalis'in tek başına veya diğer oral patojenlerle karışık bir enfeksiyon olarak etki göstermesi ve muhtemelen konakta bazı immünolojik faktörlerin eksikliği, ilerlemiş periodontitis etiyolojisi için gerekli gibi görünmektedir.⁵¹ Ayrıca *P. gingivalis*'in sitokin yanıtı güçlü bir şekilde indüklediği gösterilmiştir.⁶⁷

2.3. Sitokinler

Sitokinler, hücreler tarafından salgılanan ve hücreler arasındaki etkileşim ve iletişim üzerinde belirli bir etkiye sahip olan proteinlerdir. Sitokin terimi genel bir terim olup, salgılandıkları hücrelere ve etkilerine göre lenfokin, monokin, kemokin veya interlökin olarak adlandırılabilirler. Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin etki), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin etki) etki edebilirler. Sitokinler, adaptif immüniteyi başlatma, büyütme, yönetme, aracılık etme ve düzenlemede önemlidirler ve mikroorganizmalara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynarlar.^{68, 69}

2.3.1. Pro-enflamatuar Sitokinler

Pro-enflamatuar sitokinler sıklıkla aktive edilmiş makrofajlar tarafından salgılanırlar ve enflamatuar reaksiyonların up-regülasyonunda rol oynarlar. IL-1 β , IL-6 ve TNF- α pro-enflamatuar sitokinlerdir.⁶⁹

2.3.1.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β , monosit ve makrofajların yanı sıra mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve endotelial hücreler gibi immun olmayan hücreler tarafından; hücre zedelenmesi, enfeksiyon ve enflamasyon durumlarında salgılanırlar.⁷⁰

IL-1 β , makrofajları ve epitel hücrelerini aktive etmek için güçlü kapasiteye sahip doğal bağışıklık sitokinidir ve sistemik akut faz tepkilerini uyarmak için IL-6 ile birlikte hareket eder. IL-1 β 'nın proenflamatuar etkileri, gingival fibroblastlardan prostoglandi E₂ (PGE₂)'nin salgılanması, makrofajların aktivasyonu ve endotel hücrelerinin stimülasyonunu içerir; ayrıca osteoklastların proliferasyonu, farklılaşması ve aktivasyonu için güçlü bir uyarandır ve periodontitisteki doku yıkımında önemli bir role sahiptir.^{71, 72} Yapılan çalışmalarda periodontal hastalığa sahip dişlerdeki dişeti oluşu sıvısındaki IL-1 β seviyesi sağlıklı dişlerdekine kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.⁷³

2.3.1.2. Tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α)

Kaşektin olarak da bilinen TNF- α , IL-1 ile birlikte kemik rezorbsiyonunu stimüle etmek gibi birçok aynı biyolojik aktiviteyi paylaşır. TNF- α özellikle bakteriyel lipopolisakkaritlere yanıt olarak aktif makrofajlar tarafından salgılanır. TNF- α 'nın da osteoklastlar üzerinde benzer etkileri vardır; fakat IL-1'den daha zayıftır. IL-1 ve TNF- α doku yıkımında payı olan MMP'leri de içeren mezenkimal hücrelerdeki proteinazların üretimini tetikler.⁶⁹

2.3.1.3. İnterlökkin-6 (IL-6)

IL-6 monosit, fibroblast ve endotel hücreleri gibi birçok hücrenin uyarılmasıyla salgılanır. İlk olarak B lenfositlerinden antikor salınımını artırdığı için B hücre farklılaşma faktörü olarak tanımlanmasına rağmen sonradan yapılan çalışmalarda T hücreleri, megakaryositler ve diğer hemopoetik hücreler üzerine de proliferasyon ve farklılaşma etkileri tespit edilmiştir. Osteoklast aktivitesi üzerine de etkilidir ve kemik rezorbsiyonunda rol oynar. Periodontal yıkım bölgelerindeki diş eti oluşu sıvısında, sağlıklı bölgelere göre IL-6 seviyelerinin arttığı görülmüştür.⁷⁴

2.3.2. İnterlökkin-8 (IL-8)

IL-8 enflamatuvar yanıtın başlıca mediatörlerinden biri ve CXC kemokin ailesinin bir üyesidir. Çok çeşitli pro-enflamatuvar etkilere sahiptir. Monositler ve fibroblastlar gibi normal hücrelerden ve pankreas kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli tümör hücrelerinden salgılanır.⁷⁵ Güçlü bir anjiyogenik faktör olarak işlev görür. İnterlökkin-8'in endotelial hücrelerde kemotaktik ve proliferatif aktiviteyi indükleyerek anjiyogenez için bir aracı olduğu gösterilmiştir. IL-8'in etkileri IL-6'ya benzer ancak daha uzun bir yarı ömre sahiptir.^{76, 77}

2.3.3. İnterferon- γ (IFN- γ)

İmmun interferon olarak da bilinen interferon- γ , aktive edilmiş T lenfositleri ve muhtemelen T-killer hücreler tarafından üretilir. Tüm interferonlar antiviral aktiviteye sahiptir; interferon- γ ayrıca, makrofajlar (makrofaj aktivasyonu), T ve B lenfositleri ve granülositleri için düzenleyici fonksiyonlara sahiptir. İnterferon- γ , makrofajlarda lipopolisakkarit kaynaklı IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) üretimi ile sinerjize edilir.⁷⁸ T lenfositlerde interferon- γ otokrin veya parakrin büyüme faktörü olarak işlev gördüğü düşünülmektedir.⁷⁹ IFN- γ kemik rezorbsiyonunda rol oynar ve periodontal tedaviden sonraki iyileşmedeki varlığı anlamlıdır. Kemik hacmindeki ve

trabeküler kemik miktarındaki artış ve trabeküler yıkımdaki düşüş IFN- γ 'nın anti-osteoklastik aktivitesiyle ilgilidir.^{80, 81}

2.3.4. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1 / CCL2), C-C kemokin ailesinin bir üyesi ve monositler için güçlü bir kemotaktik faktördür. MCP-1, kendiliğinden ya da oksidatif stres, sitokinler veya büyüme faktörleri tarafından indüklendikten sonra çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. MCP-1 endotel, fibroblastlar, epitelyal, düz kas, mesansimal, astrositik, monositik ve mikrogliyal hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilir.⁸²⁻⁸⁴

2.4. Androjen Hormonlar

Androjenler erkek üreme sisteminin ve sekonder cinsel özelliklerin gelişmesi için gerekli olan erkek cinsiyet hormonlarıdır. Androjenler veya androjenik hormonlar, testosteron ve dihidrotestosteron [DHT]'dur. Bu hormonlar erkek üreme sisteminin büyümesini, gelişmesini ve işlevini düzenler. Androjenler aynı zamanda dişi cinsiyet hormonları olan östrojenlerin öncülleridir. Androjenlerin ana kaynağı testislerdir, bazı androjenler her iki cinsiyette de adrenal bezler ve kadınlarda ovaryumda üretilirler. Testosteron, 5- α redüktaz enzimi ile DHT'a dönüştürülür. DHT, testosterondan daha aktiftir; androjen reseptörlerine 2 kat daha yüksek afinite ile bağlanır ve testosteron ile karşılaştırıldığında 5 kat daha düşük ayrılma oranına sahiptir.⁸⁵

2.4.1. Periodontal Hastalıklar ve Testosteron Hormonu Arasındaki İlişki

Testosteron, dolaşımdaki ana androjendir.⁸⁶ Kılcal kan yoluyla cilde ulaşır ve sitoplazmada 5- α redüktaz (5 α R) ile daha güçlü androjen olan DHT'ye dönüştürülür. 5 α R1 ve 5 α R2 ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler saç foliküllerinde testosteronun DHT'ye dönüşümünü artırır.⁸⁷

Testosteron seviyesi ırksal ve bireysel farklılıklar gösterir.⁸⁸ Periodontitis ile testosteronun ilişkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur ve yüksek testosteron seviyesi ile periodontitisin şiddeti ve periodontopatojen mikroorganizmalar arasında bağlantı vardır.¹⁶ Testosteron seviyesindeki artış veya azalışın immun yanıtı etkilemesi ile alveolar kemik kaybına sebep olduğu düşünülür.¹⁷ 755 erkeğin dahil edildiği bir çalışmada, testosteron seviyesi ile periodontal hastalığın şiddeti değerlendirilmiştir; bu çalışmaya göre, periodontal hastalığın şiddeti ile kan testosteron seviyesi arasında ilişki vardır.⁵ Testosteronun kemik dokularındaki etkisinin çoğunun, östrojen reseptörlerine etki eden östradiole dönüşümüyle ilgili olduğu düşünülmüştür.⁸⁹⁻⁹¹ Bununla birlikte diğer çalışmalarda, androjen reseptörünün doğrudan rolünü veya testosteronun, kemik yenilenmesi ve regülasyonu üzerindeki östrojenden bağımsız katılımını desteklemektedir.⁹²⁻⁹⁴ Testosteronun deneysel kemik kaybını etkilediği ve bu etkinin androjen reseptörleri aracılığıyla olduğu bilinmektedir.⁹⁵ Yapılan çalışmalarda hem yüksek hem de düşük testosteron seviyesinin kemik kaybına sebep olduğu sonucuna varılırken, düşük testosteron seviyesinin diş eti dokusunda IL-1 β yi artırdığını; yüksek testosteron seviyesinin ise RANKL seviyesinde farklılık oluşturduğunu bulmuştur.¹⁷ Kronik iltihaba sahip diş eti dokusundan elde edilen fibroblastlarda artmış androjen metabolizması bulunmuştur.²²

2.5. 5- α Redüktaz Enzimi

5- α redüktaz izoenzimleri, testosteron molekülünün 4. ve 5. karbonları arasındaki çift bağı kofaktör nikotinamid adenin dinükleotit fosfat -NADPH- ile geri dönüşümsüz kopararak testosteron molekülünü DHT'a dönüştürür. 5- α redüktaz enzimi ailesinin izo enzimleri, 5- α redüktaz-1 (5 α R1), 5- α redüktaz -2 (5 α R2), 5- α redüktaz -3 (5 α R3) tür. Belirli bir tür içinde, 5 α R1 (259 amino asit, 29.5 kDa molekül ağırlıklı; kromozom 5p15 üzerinde kodlanmış) ve 5 α R2 (254 amino asit, 28.4 kDa molekül ağırlıklı; kromozom

2p23 üzerine kodlanmış) izoenzimleri %47'lik benzer amino asit dizisine sahiptirler ve yüksek bir hidrofobik amino asit içeriğine sahip olan bir membran lipid çift tabakasına gömülü bulunurlar.⁹⁶

İzoenzimlerin ekspresyonu, bireyin yaşına ve doku tipine göre değişmekle beraber, bireyler arası ve bireyin farklı dokuları arasında da ekspresyon heterojenliği sergileyebilir. 5 α R1, karaciğer ve beyin gibi çeşitli androjenden bağımsız organlarda tespit edilirken, 5 α R2 ağırlıklı olarak epididim ve prostat gibi androjene bağlı organlarda gözlenir.⁹⁷ Bening prostat hiperplazisinde ve prostat kanserlerinde 5- α redüktaz enzim ekspresyonlarında değişiklikler meydana gelir. Prostat kanser hücreleri ile BPH hücreleri kıyaslandığında, prostat kanser hücrelerinde artmış 5 α R1 ekspresyonu ve 5 α R2 azalmış ekspresyonu gösterilmiştir.⁹⁶

2.6. Androjenetik Alopesi

Androjenik alopesi veya erkek tipi kellik olarak da bilinen androjenetik alopesi (AGA), progresif saç dökülmesinin en yaygın şeklidir. Genetik ve hormonlar başlıca etiyolojik faktördür. Erkeklerde tipik olarak oksipital bölgedeki saçlar dökülmezken, temporal ve vertex bölgesindeki saç kaybıyla karakteristik “at nalı” görüntüsü gözlemlenir.⁸⁷

AGA ensidansı ve prevalansı yaşa ve ırka bağlıdır. Mevcut prevalans verilerine göre, beyaz erkeklerin %30'u 30 yaşına, %50'si 50 yaşına ve %80'i 70 yaşına geldiğinde AGA'ye sahip olduğu bildirilmektedir.⁹⁸⁻¹⁰⁰

AGA'lı erkeklerin çoğu normal androjen seviyesine sahip olsa bile lokal olarak daha fazla testosteron ve dihidrotestosteron (DHT) üretilir.^{101 102}

İltihapsal hastalıklar ile AGA arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. Örneğin kardiovasküler hastalıklar için androjenetik alopesinin risk faktörü olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.^{28, 29} 22,071 erkeğin dahil edildiği bir çalışmada vertekste oluşan saç dökülmesi ile kalp krizi risk artışı arasında bir bağlantı gösterilmiştir.³⁰ Frontal saç dökülmesine sahip genç erkeklerde yapılan bir çalışmada, aynı yaş grubunda saç dökülmeyen bireylere göre daha yüksek serum kolesterol seviyesine ve daha yüksek kan basıncına sahip oldukları bulunmuştur.³⁰ AGA'nın metabolik sendrom, insülin direnci, anormal serum lipid profilleri ve obezite ile ilişkisi gösterilmiştir.¹⁰³⁻¹¹⁰ Androjenetik alopesiye sahip hastalarda azalmış antioksidan aktivite tespit edilmiştir.¹¹¹

2.6.1. 5- α Redüktaz Enzimi ve Androjenetik Alopesi

5- α redüktazın AGA'nın gelişimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.²⁶ 5 α R2 eksikliği olan erkek psödohermafroditler androjenetik alopesinin gelişmemesinden dolayı, 5 α R1'den ziyade 5 α R2'nin daha önemli olduğu bildirilmiştir.¹¹²⁻¹¹⁴ Ayrıca klinik çalışmalarda, erkeklerde 5 α R2'nin seçici bir inhibitörü olan finasteridin kullanımının, düşük DHT seviyelerine paralel olarak kafa derisinde saç büyümesini desteklediğini göstermiştir.^{115, 116}

2.6.2. 5- α Redüktaz Enzimi ile Periodontal Doku İlişkisi

Dişeti ve periodontal membranda bulunan fibroblast hücreleri de 5- α redüktaz enziminin bulunduğu bildirilmiştir.^{21, 23} 5- α redüktaz enziminin aktivitesi bağ dokusu ve kemikte büyüme ve tamire katkıda bulunur ve enflamasyonda tamirle alakalı büyüme faktörlerine cevaben insan dişeti dokusunda ve periodontal membranda artar.¹⁸⁻²¹ Buna karşılık 5- α redüktaz enziminin periodontal sağlık ve hastalık ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir.

Bu bilgiler ışığında hipotezimiz, periodontal hastalık ile androjenetik alopesi

arasında bir ilişki olduğu, 5- α redüktazın bu ilişkide rol oynayabileceği ve bu enzim seviyelerinin periodontal hastalıkta etkin olan mikrobiyal ve iltihapsal mekanizmalarla bağlantılı olabileceğidir.

Bu çalışma için spesifik amaçlarımız:

1. Periodontal hastalıkla androgenetik alopesinin ilişkisinin epidemiyolojik olarak incelenmesi,
2. Periodontal tedaviye bağlı olarak dişetindeki 5- α redüktaz seviyelerinin incelenmesi,
3. İnsan dişeti fibroblast hücre kültürlerinin periodontal hastalık patogeneğinde etkin bir mikroorganizma olan *Porphyromonas gingivalis* ile enfekte edilerek, 5- α redüktaz enziminin seviyelerinin mRNA ve protein düzeyinde incelenmesi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulunun 10.02.2016 tarih 02/2016 sayı 7 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Araştırma kapsamında Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği'ne başvuran 20 yaş ve üzeri erkek kronik periodontitise sahip hastalar çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı, G*Power V.3.1.9. ile hesaplanmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası dokulardaki 5 α -redüktaz düzeyleri bağımlı gruplarda immunohistokimyasal yöntem kullanılarak, t testi ile karşılaştırılmak üzere %95 güven aralığı %80 power için değişim etki büyüklüğü 0.5 olacağı varsayımları ile 36 hastada periodontal tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere toplam 72 diş eti biyopsisi örneği alınması; androjenetik alopesi ve periodontitisi bir arada inceleyen epidemiyolojik kesitsel çalışma için popülasyondan %50'lik sıklık, %5 hata payı ve %95 güven aralığı ile 368 kişinin değerlendirilmesi gerektiği hesaplandı. Dişeti fibroblast hücre kültürü çalışmalarında her deney en az üç kez tekrar edildi.

Uygun kriterlere sahip gönüllülerin secimi

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Araştırmaya katılmayı gönüllü olarak kabul etmek.
- 20 yaş ve üzeri olmak.
- Sistemik olarak herhangi bir hastalığa sahip olmamak.
- Radyoterapi ya da kemoterapi almıyor olmak.
- Düzenli kullanılan herhangi bir ilacın olmaması veya madde bağımlısı olmamak.
- Kronik periodontitise sahip olmak.
- Androjen hormon replasman tedavisi almıyor olmak.

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

- Araştırmaya katılmayı kabul etmemek.
- Akut enfeksiyöz hastalığa sahip olmak (akut hepatit, AIDS, tüberküloz).
- Kanser hastası veya sistemik herhangi bir hastalığa sahip olmak.
- Radyoterapi ya da kemoterapi görüyor olmak.
- Düzenli ilaç kullanmak ya da madde bağımlısı olmak.
- Koopare olmamak.

3.1. Periodontal Hastalık ve Androgenetik Alopesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi İçin Epidemiyolojik Çalışma Planı

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların isim ve soy isim baş harfleri, yaşları, telefon numaraları kayıt altına alınarak; aydınlatılmış hasta onam formu imzalatıldı.

Periodontal ölçümler NHANES III kriterlerine göre gerçekleştirildi.

NHANES III kriterlerine göre;

- Her bir hastadan, rastlantısal olarak bir üst yarım çenede, bir alt yarım çenede ölçümler yapıldı. Seçilen çenelerde 3. büyük azılar hariç tutularak tüm dişlerin bulunması göz önüne alındı.
- Her bir dişte mesio-bukkal ve mid-bukkal noktalarda klinik ataçman kaybı ve sondalama derinliği ölçüldü.
- Klinik ataçman kaybı, mine-sement birleşiminden cep tabanı arasındaki mesafe olarak.
- Sondalama derinliği, serbest gingival marjinden cep tabanını arasındaki mesafe olarak kaydedildi.

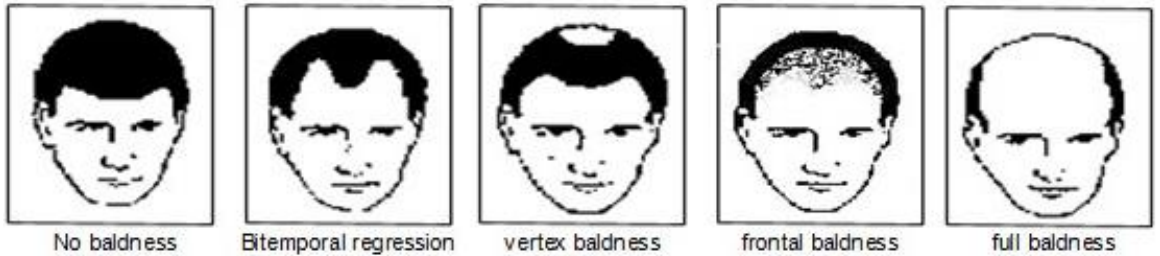
Bu ölçümlerin sonuçlarına göre hastalar:

- a. Şiddetli periodontitis grubu: 2 veya daha fazla interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere 6mm ve üzeri klinik ataçman kaybı; 2 veya daha fazla

interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere 5 mm ve üzeri sondalama derinliğine sahip hastalar.

- b. Orta şiddetli periodontitis grubu: 2 veya daha fazla interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere 6 mm den az 4 mm ve 4 mm'den fazla klinik ataçman kaybı; 2 veya daha fazla interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere 5 mm ve üzeri sondalama derinliğine sahip hastalar.
- c. Hafif periodontitis grubu: 2 veya daha fazla interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere 4 mm'den az 3 mm'den fazla klinik ataçman kaybı; 2 veya daha fazla interproksimal alanda aynı dişte olmamak üzere veya tek bir alanda 4 mm ve üzeri sondalama derinliğine sahip hastalar olmak üzere gruplara ayrıldı.

Periodontal ölçümleri yapılan hastalarda androjenetik alopesi durumu Norwood-Hamilton skalası kullanılarak belirlendi ve aşağıdaki şekle göre hastalar 1. 2. 3. 4. 5. grup olarak ayrıldı.¹¹⁷



Şekil 3.1. Norwood-Hamilton skalası

3.1.1. Periodontitis Hastalarından Gingival Biyopsi Örneklerinin Alınması

Periodontal tedaviye başlanmadan önce periodontitisli diş eti dokusundan punch yöntemi ile diş eti biyopsisi alındı. Komşu dişte kron/köprü protezi olan, endodontik ya da ortodontik diş eti deformasyonuna sahip yapışık diş eti bölgelerinden biyopsi alınmadı. Biyopsi işlemi için belirlenen bölgenin %0.05'lik adrenalin içeren artecain ile infiltratif olarak lokal anestezisi sağlanarak diş eti dokusundan 2-3 milimetre çapında

örnek alındı. Biyopsi örnekleri alındıktan hemen sonra fosfat tampon salin çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve %4'lük paraformaldehitte parafine gömülünceye kadar saklandı. Periodontal tedavi sonrası iyileşme gösteren (kanama indeksi: 0) dişeti bölgelerinde de yukarıdaki protokol takip edilerek biyopsi örnekleri alındı.

3.1.2. Dişeti Biyopsi Örneklerinin Parafine Gömülmesi

Dişeti biyopsi örnekleri takip kasetleri içerisine yerleştirildi ve parafine gömülmesi için aşağıdaki protokol uygulandı:

- Dokular iki kez %70'lik etanol içerisinde 1 saat
- Bir kez %80'lik etanolde 1 saat
- Bir kez %95'lik etanolde 1 saat
- Üç kez %100 Etanolde 1,5 saat
- İki kez ksilende 1,5 saat işleme tabi tutuldu
- 58-60°C'deki parafin mumu takip kasetlerine uygulanarak gingival biyopsi örnekleri parafin içerisine gömüldü.

3.1.3. Dişeti Biyopsi Örneklerinin İmmunohistokimyasal Olarak Boyanması

İmmünohistokimya (IHC), belirli bir antijene özgü bir antikoru kullanarak doku kesitlerinde, spesifik antijenleri tanımlamak için uygulanan bir yöntemdir. Antijen-antikor etkileşimlerinin tespiti ya flüoresan bir sekonder antikor ile veya enzime konjugesini takip ederek görselleştirilebilecek bir madde etiketleyerek elde edilebilir.¹¹⁸

Dişeti biyopsi örneklerinin immunohistokimyasal olarak boyanması için Anti-SRD5A1 ve Anti-SRD5A2 antikorları (Abcam plc, USA) kullanıldı, her boyama grubunda negatif kontrol için parafine gömülmüş prostat dokusu da dişeti biyopsi örnekleriyle aynı boyama protokolüne dahil edildi.

- Parafin bloklardan 5 µm kalınlıkta kesitler alındı,
- Kesitler 80°C'deki etüvde 10 dk bekletilerek deparafinize edildi.

- 5 dakika ksilen, 1 dakika alkol içerisinde bekletildi.
- 5 dakika reaksiyon tamponu ile yıkandı.
- Antijen geri kazanımı için sitrat tampon (pH=6) içerisine yerleştirildi ve mikrodalga fırında iki kez 5'er dakika orta güç seviyesinde, bir kez de 5 dakika orta-yüksek güç seviyesinde kaynatıldı.
- Mikrodalgadan çıkarıldı ve sitrat tamponu içerisinde soğuması beklendi.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- %0.004'lik H₂O₂ eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklendi.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- %1 lik BSA (bovine serum albumin, fraction V) bloklama için eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında beklenildi.
- %1 lik BSA uzaklaştırıldı.
- 16ug/1ml olacak şekilde primer antikor dilue edildi, lamlara uygulandı ve 4°C deki buzdolabında bir gece bekletildi.
- Primer antikor uzaklaştırıldı.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- 30 dk ultraView Universal HRP multimer oda sıcaklığında uygulandı.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- UltraView Universal DAB chromogen ve ultraView Universal DAB H₂O₂ 1:1 oranında lamellere eklendi ve 8 dakika beklendi.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı.
- UltraView Universal DAB Copper eklendi 4 dakika beklenildi.
- 5 dk reaksiyon tampon solüsyonu ile yıkandı
- Hematoxylin (Ventana) eklendi ve 8 dakika beklenildi.
- Hematoxylin uzaklaştırıldı. 10 saniye tampon ile yıkandı.

- Bluing ajani eklendi 4 dk beklenildi.
- Bluing uzaklaştırıldı.
- Lamlar alkol ve ksilen ile muamele edildi ve lamel ile kapatıldı.

3.1.4. Dişeti biyopsi örneklerinin hematoksilin-eozin ile boyanması

- Parafin bloklardan 5µm kalınlıkta kesitler alındı,
- Lamlar 80°C deki etüvde 10 dk bekletilerek deparafinize edildi ve rehidratasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.
- 2 kez ksilen içerisinde 10 dakika
- 2 kez %100 alkol içerisinde 5 dakika
- %95 lik alkol içerisinde 2 dakika
- %70 lik alkol içerisinde 2 dakika
- %50 lik alkol içerisinde 2 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı.
- Lamlar Harris hematoksilin çözeltisinde 8 dakika bekletildi.
- 5 dakika distile su ile yıkandı
- Lamellere %1 lik HCl asit ile muamele yapıldı ve pembe renk değişimi gözlemlendiği anda %0,2 lik amonyak çözeltisine batırılıp çıkarıldı.
- 3 er kez 5 dakika distile su ile yıkandı
- 30 saniye Eozin çözeltisi içinde bekletildi.
- Dehidratasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.
- 2 kez %95 lik alkol içerisinde 5 dakika
- 2 kez %100 alkol içerisinde 5 dakika
- 2 kez ksilen içerisinde 2 dakika bekletildi.
- Ksilen bazlı kapatıcı ile lameller kapatıldı.

3.1.5. İmmunohistokimyasal Boyamaların ImageJ İle Değerlendirilmesi

40× büyütmede gingival biyopsi kesitlerinin rastlantısal olarak seçilen 3 bölgesinden resimler alındı. Alınan resimlerde immunohistokimyasal olarak pozitif boyanan ve esik boyama değerine sahip fibroblast hücre nükleuslarının toplam alanı, seçilen tüm alana oranı ImageJ programı kullanılarak yüzdesel olarak hesaplandı.

3.2. Periodontal Hastalık ve Androgenetik Alopesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi İçin Dişeti Fibroblast Hücre Kültürü Çalışma Planı

3.2.1. Fibroblast Hücrelerinin İzolasyonu, Kültüre Edilmesi ve Pasajlanması

- Dişeti dokusu hücre kültürünü mikoplazmik enfeksiyonlardan korumak için borik asit ile temizlendi,
- Lokal anestezi altında 2×1×1 mm boyutunda gingiva bisturi kullanılarak diş etinden alındı, nutritional medium (Gibco™, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) içerisine yerleştirildi ve hücre kültürü laboratuvarına aktarıldı. Diş eti dokusu mikroskop altında de-epitelize edildi ve küçük parçalar halinde kesilerek, iki kez %1 antibiyotik (100 U·mL⁻¹ penicillin, 100 µg·mL⁻¹ streptomycin) ve %1 amphotericine içeren “Eagle’s minimum essential medium alfa modifikasyonu” ile yıkandı.
- Dişeti dokusu boş 75mL hücre kültürü flaksına (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) yerleştirildi ve fibroblast hücrelerinin tabana yapışması için 30 dakika beklenildi.
- Temel medium dikkatlice eklendi.
- Hücre kültürü flaksı %5 karbondioksit ve 37°C deki hücre kültürü inkübatörüne yerleştirildi.

- Temel medium (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) her üç günde bir değiştirilerek gingival fibroblast hücrelerinin büyümesi faz kontrast invert mikroskop ile takip edildi.
- Fibroblast hücreleri flaks içerisinde %80-85 yoğunluğa ulaştıktan sonra, 3 kez 5mL fosfat buffer salin (PBS) (Biochrom, Berlin, Germany) ile yıkandı.
- 3 mL % 0.10 tripsin-etilen-di-amin-tetra-asetik asit (trypsin-ethylene-di-amine-tetra-acetic acid) (Trypsin-EDTA) (Biochrom, Berlin, Germany) fibroblast hücrelerinin üzerine eklendi ve 1 dakika hücre kültürü inkübatöründe bekletilerek hücrelerin flaks yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 10 mL temel medium (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) ilave edilerek 75mL lik hücre kültürü flaksının tabanı yıkandı. Dişeti fibroblast hücrelerini içeren solüsyon, steril Falcon 50 mL polipropilen konikal tüpe (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) aktarıldı.
- 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde kalan gingival fibroblast hücreleri, 1mL temel medium (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) ile karıştırıldı.
- Fibroblast hücrelerinin canlı olup olmadığının belirlenmesi için Trypan Blue (Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) kullanıldı.
- Canlı dişeti fibroblast hücre sayısı *thoma lamı* kullanılarak sayıldı.
- 30 hücre $\times$ cm⁻² yoğunluk göz önüne alınarak gingival fibroblast hücreleri kültürü flakslarına ekildi ve %5 karbondioksit ve 37°C deki hücre kültürü inkübatörüne yerleştirildi.
- Seri pasajlama yapılarak, hücreler 7. Pasaja kadar getirildi.

- 7. Pasajda 3 mL %0.10 tripsin-etilen-di-amin-tetra-asetik asid (trypsin-ethylene-di-amine-tetra-acetic acid) (Tripsin-EDTA) (Biochrom, Berlin, Germany) fibroblast hücrelerinin üzerine eklendi ve 1 dakika hücre kültürü inkübatoründe bekletilerek hücrelerin 75 ml'lik flaks yüzeyinden ayrılması sağlandı.
- 10 mL temel medium (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) ilave edilerek 75mL lik hücre kültürü flaksının tabanı yıkandı
- Dişeti fibroblast hücrelerini içeren solüsyon, steril Falcon 50 mL polipropilen konikal tüpe (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) aktarıldı.
- 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde kalan dişeti fibroblast hücreleri, 1mL temel medium (DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, ABD) ile karıştırıldı.
- Fibroblast hücrelerinin canlı olup olmadığının belirlenmesi için Trypan Blue (Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) kullanıldı.
- Canlı hücre sayısı *thoma lamı* kullanılarak sayıldı.
- 36 adet 100 mm lik hücre kültürü dishlerine 1×10^6 ; 9 adet 24'lük hücre kültürü well-platelerinin tabanına coverslip yerleştirilerek 1×10^3 hücre olacak şekilde fibroblast hücreleri ekildi.
- Dişeti fibroblast hücrelerinin dish tabanına yapışması için 8 saat beklenildi.
- 18 adet hücre kültürü dishi *Porphyromonas gingivalis* A7436 ile infekte edilmek üzere özel hücre hooduna alındı.

3.2.2. *Porphyromonas gingivalis* A7436 Bakteri Kùltürünün Elde Edilmesi

- İçerisinde dondurulmuş *P. gingivalis* bulunan flakon açıldı ve kanlı agar üzerine ekim yapılarak 37°C ve %80 N₂, %5 H₂ ve %15 CO₂ ortama sahip olan anaerobik chamber içerisinde 1 hafta inkube edildi.
- 1 hafta sonra, çoğalan bakteriler tekrar pasajlandı.
- oalmalarının 3. gününde dişeti fibroblast hücrelerinin enfekte edilmesinde kullanılmak üzere toplandılar ve 3 mL PBS içerisinde özdürüldüler.
- 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildiler.
- Tüpün tabanında oluşan bakteri paleti bozulmadan PBS uzaklaştırıldı.
- 1ml PBS ile bakteriler tekrar suspend edildi.
- Spektrofotometre ile OD₆₀₀=1 olacak şekilde bakteri yoğunluğu tespit edildi.
- MOI (Multiplicity of infection) 100 olacak şekilde gerekli olan bakteri hacmi hesaplandı.
- Hücre kùltürleri *P. gingivalis* ile 24 saat hücre inkübatöründe enfekte edildi.

3.2.3. Real-time PCR için Trizol RNA İzolasyon Protokolü

- 18 adet hücre kùltürü dishi (9 enfekte+9 enfekte olmayan) fume hood'a alındı.
- RNA izolasyonu için TRIzol reagent kullanıldı.
- Fibroblast hücre kùltürü süpernatantlarından 1 ml toplandı ve -80°C'ye aktarıldı.
- 1 ml TRIzol reagent fibroblast hücrelerinin bulunduğu dishlerin üzerine uygulandı, kazıyıcı yardımı ile hücreler kazındı ve toplanarak 2 ml ependorf tüplerine alındılar.
- Vorteks yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkube edildi.

- Ependorf tüpleri buz içerisine yerleştirildi ve üzerine 200 µl kloroform ilave edildi ve vorteks yapıldı.
- 3 dakika oda sıcaklığında inkube edildiler
- 12.000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası tüplerin içerisindeki şeffaf katman yeni steril ependorf tüplerine aktarıldı. Pembe katman kimyasal atık konteynırına boşaltıldı.
- 500 µl isopropanol tüplerin üzerine eklendi ve 10 saniye çalkalandı.
- 10 dakika oda sıcaklığındaki karanlık ortamda inkube edildi.
- 12.000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- Tüplerin dibinde oluşan paletlere zarar verilmeden isopropanol uzaklaştırıldı.
- 1mL 4°C %75 Etil alkol peletlerin üzerine eklendi ve RNA paleti etil alkol içerisinde yüzünceye kadar vorteks yapıldı.
- 7,400 g de 4°C de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Tüplerin dibinde oluşan paletlere zarar vermeden %75 lik Etil alkol uzaklaştırıldı.
- Tekrar 1mL 4°C %75 lik Etil alkol peletlerin üzerine eklendi.
- 7,400×g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı
- Tüplerin dibinde oluşan paletlere zarar verilmeden %75 lik Etil alkol uzaklaştırıldı ve tüpler içerisindeki etil alkolün uzaklaşması için 10-30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı.
- RNA peletleri tüp içerisinde oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.2.4. RNA Miktarının, Kalitesi ve Saflığının Değerlendirilmesi

RNA kalitesinin ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop 1000 spektrofotometresi RNA-40 modunda kullanıldı.

- 1 µl RNase-free su ile kalibrasyon yapıldı.

- RNA paletlerinin çözülmesi için 20 µl RNase-free su eklendi.
- 10 dakika 55-60°C'deki su banyosunda inkube edildi.
- Tüpler buza aktarıldı.
- Örnekler vorteks yapıldı
- Örneklerden 1 µl alındı ve NanoDrop ile ölçüm yapıldı.

1 µl'de en az 2000 µg RNA olmasına ve 260/280 değeri için 1.9'dan 260/230 değeri 2.0'dan büyük değerler elde edilmiş olması reverse transcription için gerekli görüldü.

3.2.5. Reverse Transkripsiyon-cDNA sentezi

cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems™) kullanıldı. Kitin Standart protokolü uygulandı.

- Her bir örnekten 1 µg RNA içeren hacim alındı reverse transkriptaz tüpleri içerisine aktarıldı ve RNase free water eklenerek 10 µl total örnek hacmi oluşturularak tüpler etiketlendi.
- Aşağıda verilen High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitinin standart protokolü uygulanarak her bir örnek için 10 µl master mix hazırlandı (Tablo 3.1):

Tablo 3.1. Master mix karışımı

100mM dNTP mix	0.8 µl
10x RT buffer	2.0 µl
10x Random primers	2.0 µl
RNase-free water	3.2 µl
Reverse transcriptase	1 µl
RNase inhibitor	1 µl
Toplam	10 µl

- Etiketlenmiş olan her bir reverse transkriptaz tüpü içerisine 10 µl master mix eklendi ve yavaşça karıştırıldı.
- Tüpler thermo cycler a yerleştirildi ve aşağıdaki reaksiyon zinciri takip edildi.
- 25°C’de 10 dk
- 37°C’de 120 dakika
- 85°C’de 5 dakika
- 4°C’de reaksiyon sonlandırılıncaya kadar bekletildi.
- Reaksiyon sonucu 50ng/1 µl konsantrasyonda cDNA elde edildi.

3.2.6. Step One Plus Real Time PCR

1988 yılında "Thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Bu gelişme ile gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve de devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek "Real Time" (eşzamanlı) olarak değerlendirmek mümkündür.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, günümüzde nükleik asit miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir metottur. "Real-time PCR" da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probaların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir.¹¹⁹

Gerçek zamanlı PCR çok hassas ve güvenilir bir metottur. Konvansiyonel PCR "plato fazında" değerlendirilirken, gerçek zamanlı PCR esnasında veri "logaritmik büyüme fazında" tespit edilmektedir. Gerçek zamanlı PCR cihazları, her polimeraz zincir reaksiyonunda floresansın tespit edilmesini sağlayan fluorometre ve "thermal

cycler" dan meydana gelmektedir. Çalışmaya ait floresan veriler RT-PCR cihazına bağlı bir bilgisayarda toplanmaktadır. Grafik haline getirilen bu veriler gerçek zamanlı PCR analizi için geliştirilen özel yazılımlarla analiz edilmektedir. Ct (threshold cycle) değişkeni, tespit edilen floresan ışıyım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtmektedir (Real Time Amplification on the Rotor Gene Real Time Summary Verison 1,7). Mutlak ve göreceli miktar analizi, nicel RT-PCR verilerinin analizinde kullanılmaktadır. Göreceli miktar analizinde kullanılan metotlar arasında iki standart eğri ve karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ metodu bulunmaktadır. RT-PCR verileri bir iç kontrolle normalize edilmelidir. Bu genler genellikle deney koşulları altında değişmeyen ekspresyona sahip olan house-keeping genlerdir.¹²⁰

PCR, periodontolojide standart bir teşhis ve araştırma aracı haline gelmiştir. Farklı immün ve enflamatuar belirteçler mRNA ekspresyon seviyesinde ve ayrıca genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde tanımlanabilir, böylece periodontal hastalığın altında yatan mekanizmalar hakkında daha derin bir öngörü sağlanır.¹²¹

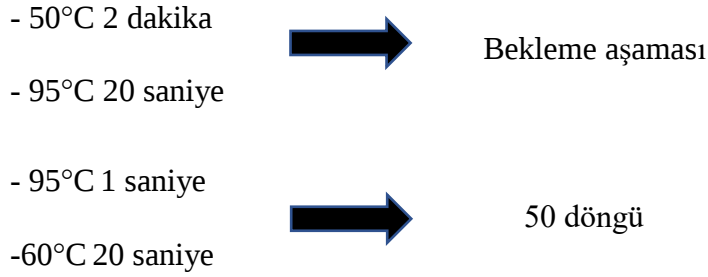
5-alpha redükteaz enziminin tip 1 ve tip 2 mRNA ekspresyonunun belirlenmesi için, SRD5A1 ve SRD5A2 TaqMan® Gene Expression Assay leri (Applied Biosystems™) kullanıldı, internal kontrol olarak ise β -aktin gen ekspresyonu kullanıldı.

Her bir örnek için PCR plate de iki adet örnek havuzu oluşturuldu.

Tablo 3.2. PCR palet havuzundaki solüsyon içerikleri

Reagent	Her bir havuz hacmi
SRD5A1/ SRD5A2/ β -aktin Assay	1 μ l
Master Mix	10 μ l
RNase-free water	8 μ l
cDNA	1 μ l
Toplam	20 μ l

Step One Plus Real Time PCR ayarları aşağıda gösterildiği şekilde Fast Run ayarında yapıldı.



Real Time PCR dan elde edilen CT değerlerinden ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ değerleri kullanılarak RQ değerleri elde edildi.

3.2.7. Dişeti Fibroblast Hücrelerinin İmmünohistokimyasal Boyanması

İmmünohistokimya, 1942'de Albert Coons ve iş arkadaşlarının karaciğer hücrelerindeki pnömokokal antijeni lokalize etmek için flüoresan özelliğine sahip bir antikor kullanması ile ortaya çıkmıştır.¹²²

Antikorlarla hücrelerin etiketlenmesi işlemi olan immünohistokimya, hücre popülasyonunun belirli bir moleküler markere göre homojen veya heterojen olup olmadığını belirlemenin en iyi yoludur. İmmünohistokimya, hücrelerin tek tek, bir koloni veya kültür içinde görselleştirilmesine izin verir ve böylece belirli kültür koşullarında kültür içindeki belirli bir markerin ekspresyonunun dağılımının genel bir değerlendirmesini sağlar. Bu nedenle, bir popülasyondaki (immünohistotlar, PCR ve mikrodiziler gibi) tek tek hücreleri ayırt edemeyen biyokimyasal analizleri tamamlamak için değerli bir araçtır. Süspansiyondaki bir hücre grubunun antijenlerinin seviyelerini tespit eden flow-sitometrenin aksine, immünohistokimya, antijenin subselüler lokalizasyonunu ortaya çıkarır ve hücre morfolojisini göz önüne alır. İmmünohistokimyanın başarısı, uygulanan tekniğin yanı sıra kullanılan antikorların kalitesine de bağlıdır.¹²³

İmmunositokimyasal boyama için Anti-SRD5A1 (ab110123) ve Anti-SRD5A2 (ab27469) antikorları (Abcam plc, USA) kullanıldı. Aşağıdaki basamaklar takip edildi.

Fiksasyon

- İçerisinde 1×10^3 gingival fibroblast hücresi bulunan 24'lük well plateler inkübatörden çıkarıldı ve süpernatantlar uzaklaştırıldı.
- Fibroblast hücrelerinin fiksasyonu için, pH=7.4 olan PBS içerisindeki %4 lük paraformaldehit dişeti fibroblast hücrelerinin üzerine uygulandı ve 10 dakika oda sıcaklığında beklenildi.
- Fibroblast hücreleri 0°C deki PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.

Permabilizasyon

- %0,1–0.25 Triton X-100 içeren PBS dişeti fibroblast hücrelerinin üzerine uygulandı.
- PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı

Bloklama ve immün boyama

- Dişeti fibroblast hücreleri PBST (PBS+ %0.1 Tween 20) içerisindeki %1 BSA ve 22,52 mg/mL glycine ile 10 dakika inkübe edildi.
- Solüsyon uzaklaştırıldı.
- PBST içerisinde %1 lik BSA da primer antibody (Abcam plc, USA) 1/125 oranında dilue edilerek gingival fibroblast hücreleri üzerine eklendi ve bir gece 4°C de inkübe edildi.
- Solüsyon uzaklaştırıldı ve PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
- Karanlık ortamda seconder antibody %1'lik BSA içerisinde 1/500 de dilue edildi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Solüsyon karanlık ortamda uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.

Arka plan boyama

- Karanlık ortamda 1 µg/mL DAPI 1 dakika uygulandı.
- PBS ile hücreler yıkandı.

Coversliplerin kapanması

- Bir damla kapatıcı medium coverslip üzerine damlatıldı ve lam üzerine çevrilerek kapatıldı.
- Karanlık ortamda -20 ile 4°C da saklandılar.

3.2.8 İmmunositokimyasal Boyamaların ImageJ ile Değerlendirilmesi

ImageJ programı kullanılarak *P. gingivalis* ile enfekte olan ve olmayan her bir gruptaki dişeti fibroblast hücrelerinin alan, entegre yoğunluk ve arka plan yoğunlukları ölçüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak *düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF)* değeri hesaplandı.

$$(CTCF) = \text{Entegre yoğunluk} - (\text{seçilen hücrenin alanı} \times \text{toplam arka plan yoğunluk ölçümlerinin ortalaması})$$

3.3. Hücre Kültürü Süpernatantlarında IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, IFNγ, MCP-1 Miktarlarının Bio-Plex Luminex ile Belirlenmesi

Luminex® testleri, hücre kültürü süpernatları, serum veya plazma numunelerindeki multianalit profilini mikro küreler kullanarak belirler. Mikro küreler farklı renk kodlarına sahiptir ve özgül antikorlar, ligandlar ve nükleik asitleri içeren proteinler mikro kürelere bağlanabilir. Luminex için kullanılan kitlerde, farklı bir hedefe yönelik her antikor, farklı bir tek spektral adrese sahip mikro kürelere kovalent olarak bağlanır.

Luminex sisteminde boncuklar bir numune ile inkübe edilir. Yıkama işleminden sonra, boncuklar tüm hedeflere karşı bir biyotinlenmiş antikor karışımı ile inkübe edilir.

Başka bir yıkamadan sonra, boncuklar, raportör streptavidin-PE ile inkübe edilir.

Örnekte mevcut olan hedefler için, aşağıdakilerden oluşan bir sandviç üretilir:

Ekli hedefe özgü antikor + hedef + biyotinile edilmiş hedefe özgü antikor + streptavidin muhabiri içeren boncuk.

İkili bir lazer sistemi kullanılarak, her bir sandviç tanesinin imzası tanımlanır ve boncukla ilişkilendirilen analitin varlığı ve yoğunluğu aynı anda tespit edilir. Bu, örnekteki hedeflerin kimliği ve konsantrasyonu hakkında bilgi verir. Luminex özellikle farklı koşullar altındaki çoklu hedeflerin konsantrasyonlarındaki değişiklikleri aramada güçlüdür.

IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 miktarlarının belirlenmesinde milliplex map human cytokine/chemokine magnetic bead panel 96 well assay kiti kullanıldı

3.3.1. Fibroblast hücre kültürü süpernatantlarının hazırlanması

- Debrislerin uzaklaştırılması için toplanan fibroblast hücre kültürü süpernatantları 1000 $\times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildi.

3.3.2. Immunoassay için reaktiflerin hazırlanması

3.3.2.1. Antikor-İmmobilize beadlerin Hazırlanması

- İçerisinde beadler bulunan şişe 1 dakika vortekslendi.

3.3.2.2. Kalite kontrollerinin hazırlanması

- 250 μ L deiyonize su ile Kalite Kontrol 1 ve Kalite Kontrol 2'yi sulandırıldı.
- Şişeler birkaç kez ters-düz edildi ve vortekslendi.
- 5-10 dakika bekletildikten sonra polipropilen mikro santrifüj tüplerine aktarıldılar.

3.3.2.3. Yıkama tamponunun hazırlanması

- 10X Yıkama tamponu oda sıcaklığına getirildi ve vortekslendi.
- 540 mL deiyonize su içerisine 60 mL 10 $\times$ yıkama tamponu eklendi.

3.3.2.4. İnsan sitokin standardının hazırlanması

- 250 µL deiyonize su ile İnsan Sitokin Standardı karıştırıldı ve tüm analitler için 10,000 pg / mL'lik bir standart konsantrasyonu elde edildi.
- Flakon 10 saniye vortekslendi
- Şişe 5-10 dakika bekletildi ve ardından standart uygun şekilde etiketlenmiş bir polipropilen mikrofüj tüpüne aktarıldı.
- Çalışma standartlarının hazırlanması için,
- Beş polipropilen mikrofüj tüpünü 2.000, 400, 80, 16 ve 3.2 pg / mL şeklinde etiketlendi.
- Beş tüpün her birine 200 µL assay buffer (test tamponu) eklendi.
- 2.000 pg / mL tüpe 10,000 pg / mL sulandırılmış standarttan 50 µL aktarıldı ve iyice karıştırıldı.
- 400 pg / mL'lik tüpe, 2000 pg / mL standarttan 50 µL aktarıldı ve iyice karıştırıldı.
- 80 pg / mL'lik tüpe, 400 pg / mL standarttan 50 µL aktarıldı ve iyice karıştırıldı.
- 16 pg / mL'lik tüpe, 80 pg / mL standarttan 50 µL aktarıldı ve iyice karıştırıldı.
- 3.2 pg / mL'lik tüpe, 16 pg / mL standarttan 50 µL aktarıldı ve iyice karıştır.
- 0 pg / mL'lik standart (Arka plan) test tamponu olarak kullanıldı.

3.3.3. Immunoassay prosedürü

- Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına (20-25 °C) gelmesi için bekletildi.
- 96'lik plakanın her kuyucuğuna 200 µL yıkama tamponu eklendi ve plakanın üzeri kapatıldı. Oda sıcaklığında (20-25 °C) 10 dakika boyunca bir plaka çalkalayıcısında çalkalandı.
- Plaka ters çevrildi ve yıkayıcı tampon uzaklaştırıldı.

- Her bir standart veya kontrolden 25 µL uygun kuyucuklara eklendi. Test tamponu 0 pg / mL standart (arka plan) için kullanıldı.
- Numune kuyucuklarına 25 µL Test Tamponu eklendi.
- Arka plan, standartlar ve kontrol kuyularına 25 µL temel hücre kültürü mediumu eklendi.
- Belirlenen kuyucuklara 25 µL hücre kültürü örneği eklendi.
- Boncukların olduğu şişe vortekslendi ve her bir kuyucuğa 25 µL eklendi.
- Plakanın üzeri kapatıldı ve bir gece 4°C de plaka çalkalayıcısında bekletildi.
- Plaka iki kez plaka yıkayıcısında yıkandı.
- Her kuyuya 25 µL oda sıcaklığındaki tespit antikorları eklendi ve üzeri folyo ile kaplanarak, oda sıcaklığında (20-25°C) 1 saat boyunca bir plaka çalkalayıcıda çalkalanarak inkube edildi.
- Tespit antikorları içeren her bir kuyucuğa 25 µL Streptavidin-Phycoerythrin eklendi ve üzeri folyo ile kaplanarak, oda sıcaklığında (20-25°C) 30 dakika boyunca bir plaka çalkalayıcıda çalkalanarak inkube edildi.
- Plaka iki kez plaka yıkayıcısında yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 150 µL Sheath Fluid eklendi ve 5 dakika boyunca bir plaka çalkalayıcıda yeniden süspanse edildi.
- Luminex® 200TM'de çalışma plakası okutuldu.

3.4. İstatistiksel Analiz

IBM SPSS Statistic v21 kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Her bir deney en az 3 kez tekrar edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir. Epidemiyolojik çalışmada androjenetik alopesi ile periodontal durum arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için tanımlayıcı istatistikler uygulandı. Verilerin normal dağılıma sahip olup olmadığı "Shapiro-Wilks" testi ile tespit edilmiştir. 5-alfa

redükteaz tip-1 ve tip-2 için real time PCR verilerinin istatistiksel değeriendirilmesinde bağımsız grup t-testi (Independent Samples t Test); dişeti biyopsi örneklerinde 5-alfa redükteaz tip-1 enziminin immunohistokimyasal verilerinin değeriendirilmesi için bağımlı örneklem t-testi (Paired samples t-test); fibroblast hücre kültürlerinde immunositokimyasal boyamaların değeriendirilmesi için Mann-Whitney U testi; IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 değerieleri için bağımsız grup t-testi (Independent Samples t-Test); IL-1 β değeri için Mann-Whitney U testi uygulandı.



4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik Çalışma Bulguları

Çalışmaya alınan 368 hastanın 135'i (%36.7) sağlıklı gruptayken (ya da kontrol grubunda) 77'si (%20.9) hafif periodontitis, 79'u (%21.5) moderate periodontitis ve 77'si (%20.9) ileri periodontitis grubundadır.

Çalışmaya katılan tüm hastalarda ait yaş ortalaması 36.5 ± 11.2 olarak bulunmuştur. Çalışma gruplarında yaş ortalamaları incelendiğinde sağlıklı grupta yaş ortalamasının diğer gruplara göre düşük olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0.05$). Diğer gruplarda yaş ortalamaları istatistiksel olarak benzerdir (Tablo 1).

Tablo 4.1. Çalışma gruplarında yaş dağılımları.

	Ortalama	Standart Sapma	Minimum-Maksimum
Sağlıklı	32,2	8,8	20-61
Hafif periodontitis	37,0	12,1	23-72
Orta periodontitis	38,8	11,4	22-75
İleri periodontitis	41,4	11,1	20-67

Hastalarla ilgili elde edilen diğer veri olan alopesi skoruna (kategorilerine) ait frekanslar ve yüzdelere özetlenmiştir. Hastalarda görülen skorlar incelendiğinde en yüksek oranın 2 değerine ait olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Tablo 4.2. Hastalarda Alopesi skorlarının dağılımı.

	Sayı (n)	Yüzde (%)
0	3	0,8
1	90	24,5
2	150	40,8
3	11	3,0
4	72	19,6
5	42	11,4
Toplam	368	100,0

Alopesi skorlarının grup bazında değişimleri incelenmiş ve alopesi skoruna ait tanımlayıcı istatistikler sunulmuştur (Tablo 3)(Grafik 1). Gruplar arasında alopesi skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p<0.001$). Farklılığı belirlemek adına yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda periodontitis düzeylerinde alopesi skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmazken sağlıklı grupla diğer gruplar arasında farklılığa rastlanmıştır. Sağlıklı grupta alopesi skoru, hafif periodontitis grubuna ($p=0.021$), orta periodontitis grubuna ($p=0.019$) ve ileri periodontitis grubuna göre ($p<0.001$) daha düşük bulunmuştur.

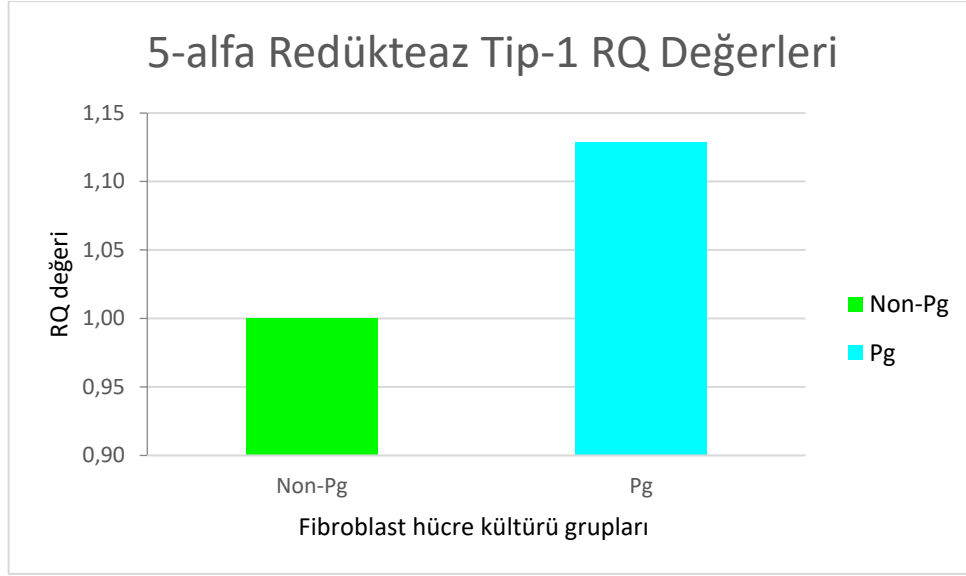
Tablo 4.3. Çalışma gruplarında alopesi skorunun dağılımı.

	Ortalama	Standart Sapma	Minimum-Maksimum	p
Sağlıklı	2,1	1,3	0-5	<0.001
Hafif periodontitis	2,6	1,3	1-5	
Orta periodontitis	2,6	1,3	0-5	
İleri periodontitis	2,9	1,4	1-5	

4.2. Real Time PCR Bulguları

4.2.1. 5-alfa Redükteaz Tip 1 Enzimi mRNA Bulguları

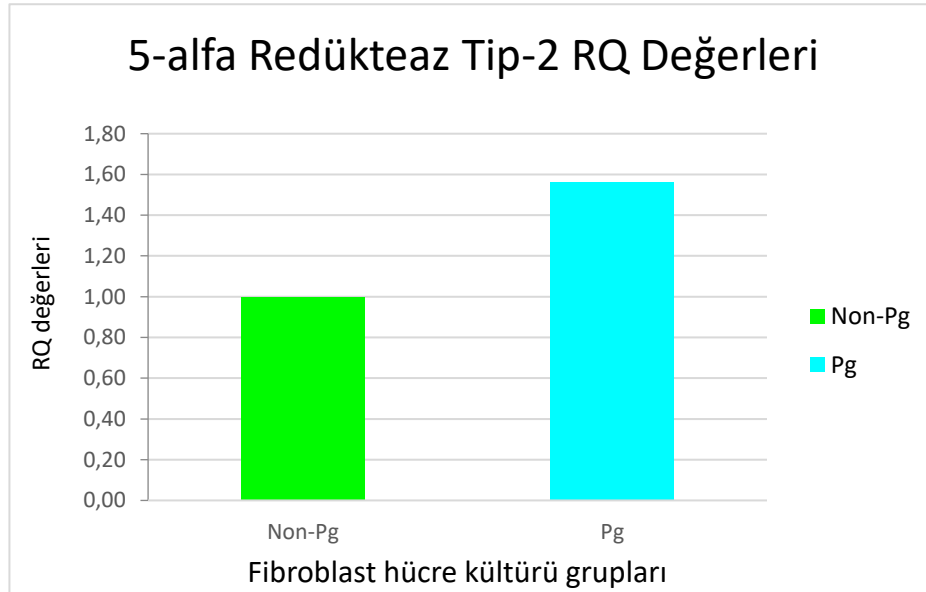
P. gingivalis ile enfekte edilen ve edilmeyen gingival fibroblast hücre kültürü grupları karşılaştırıldığında, RQ değerlerinin enfekte grupta daha yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).



Sekil 4.1. 5-alfa redükteaz tip-1 enzimi mRNA bulguları.

4.2.2. 5-alfa Redükteaz Tip 2 Enzimi mRNA Bulguları

5-alfa redükteaz tip 2 enzimi için, RQ değerleri *P. gingivalis* ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürü grubunda, enfekte edilmeyen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

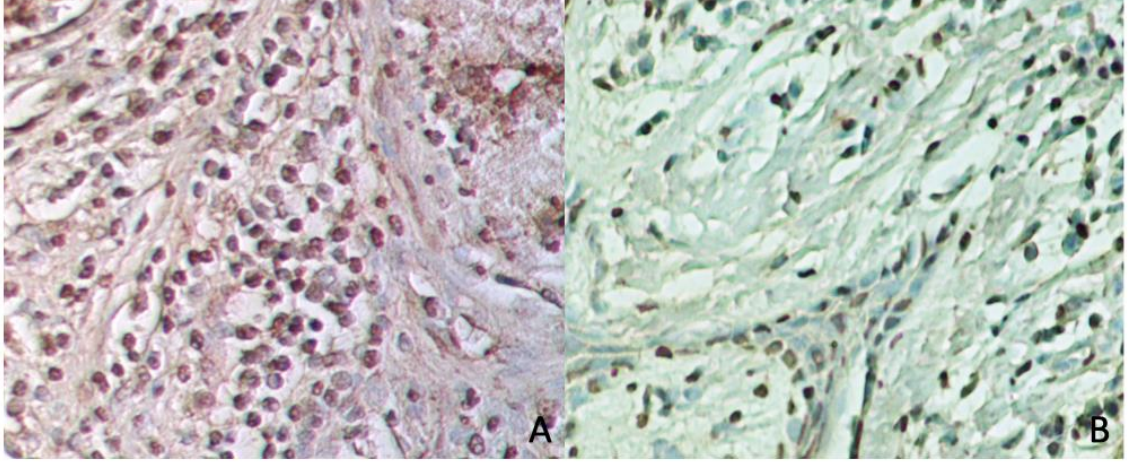


Sekil 4.2. 5-alfa redükteaz tip-2 enzimi mRNA bulguları.

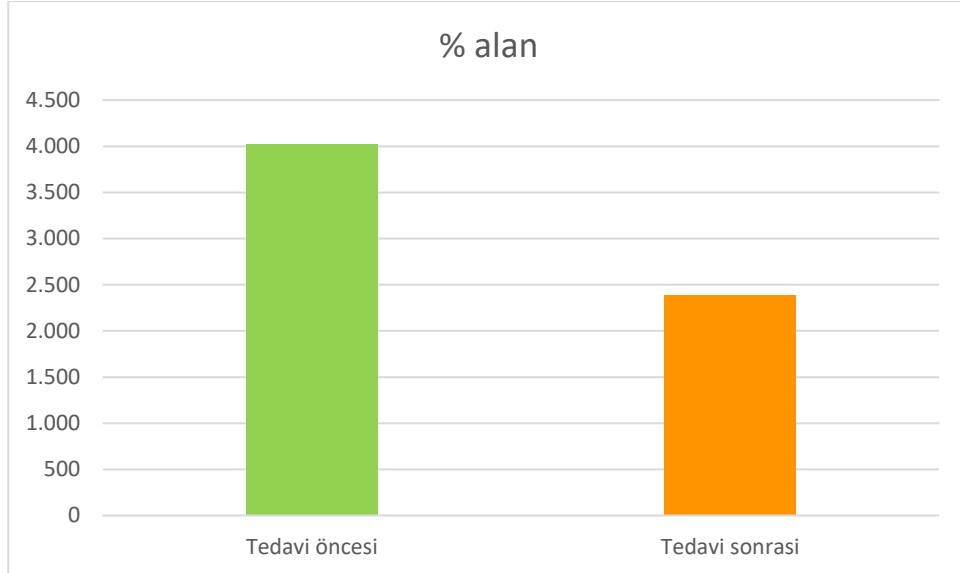
4.3. Dişeti Biyopsi Örneklerinde İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. 5-alfa Redükteaz Tip-1 Enzim Bulguları

Periodontal tedavi öncesi alınan diş eti biyopsilerinde Anti-SRD5A1 antikoruna ile pozitif boyanan fibroblast hücre oranının, periodontal tedavi sonrası alınan biyopsilere göre daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.3. (A) Periodontal tedavi öncesi alınan biyopsi örneği ile (B) Periodontal tedavi sonrası alınan biyopsi örneklerinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri.

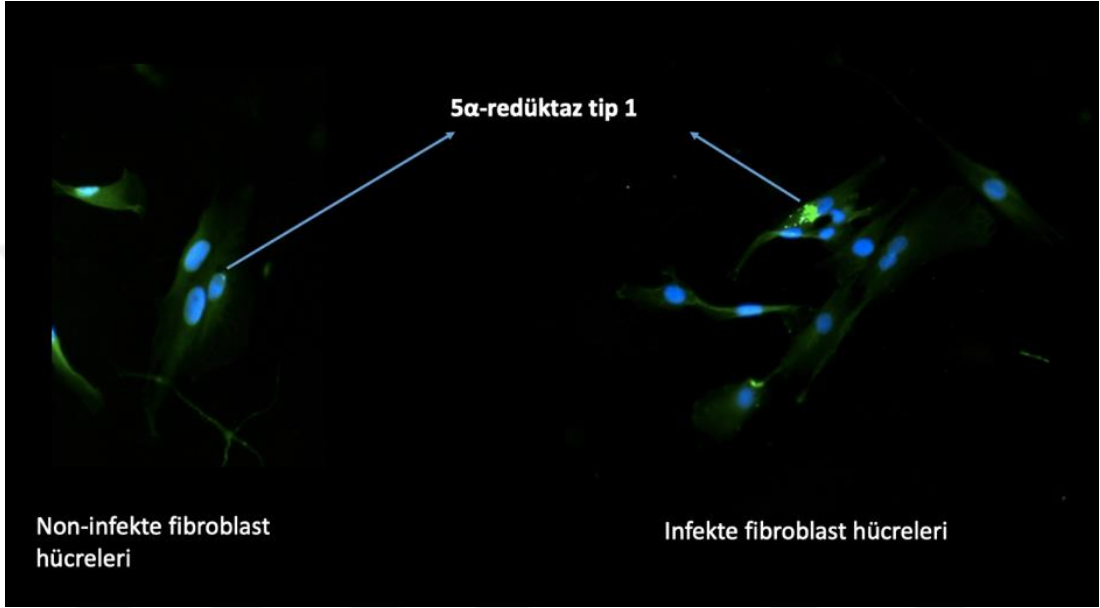


Şekil 4.4. Tedavi öncesi ve sonrası diş eti biyopsi örneklerinde 5-alfa redükteaz tip 1 enzim bulguları.

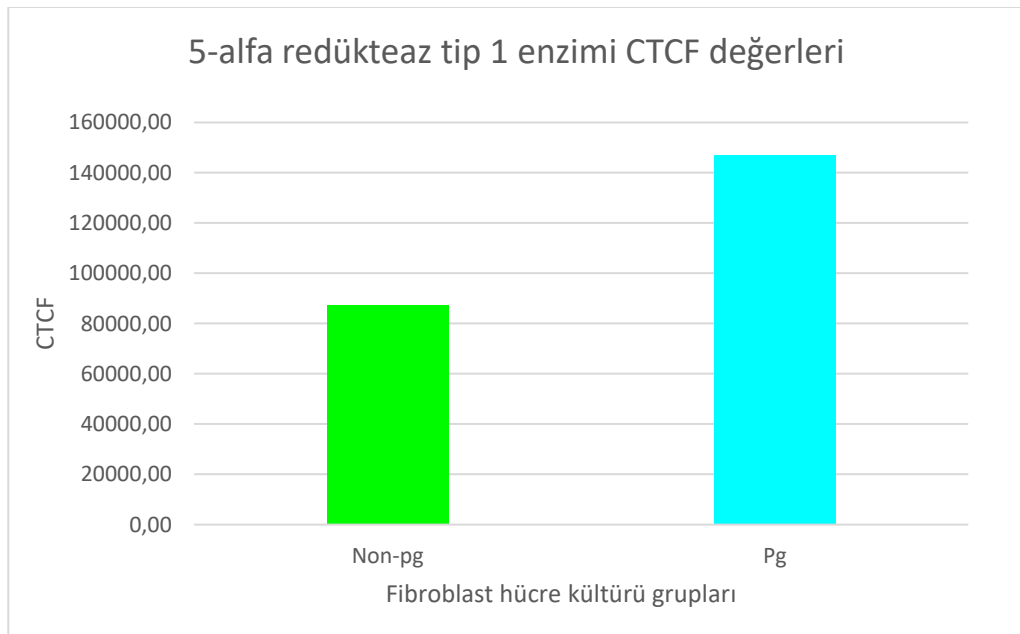
4.4. Dişeti Fibroblast Hücrelerinde İmmunositokimyasal Bulgular

4.4.1. 5-alfa Redükteaz Tip-1 Enzim Bulguları

Doğrulanmış toplam hücre floresansı (corrected total cell fluorescence (CTCF)) değeri *P. gingivalis* ile enfekte edilen gingival fibroblast hücre kültürü grubunda enfekte edilmeyen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$).



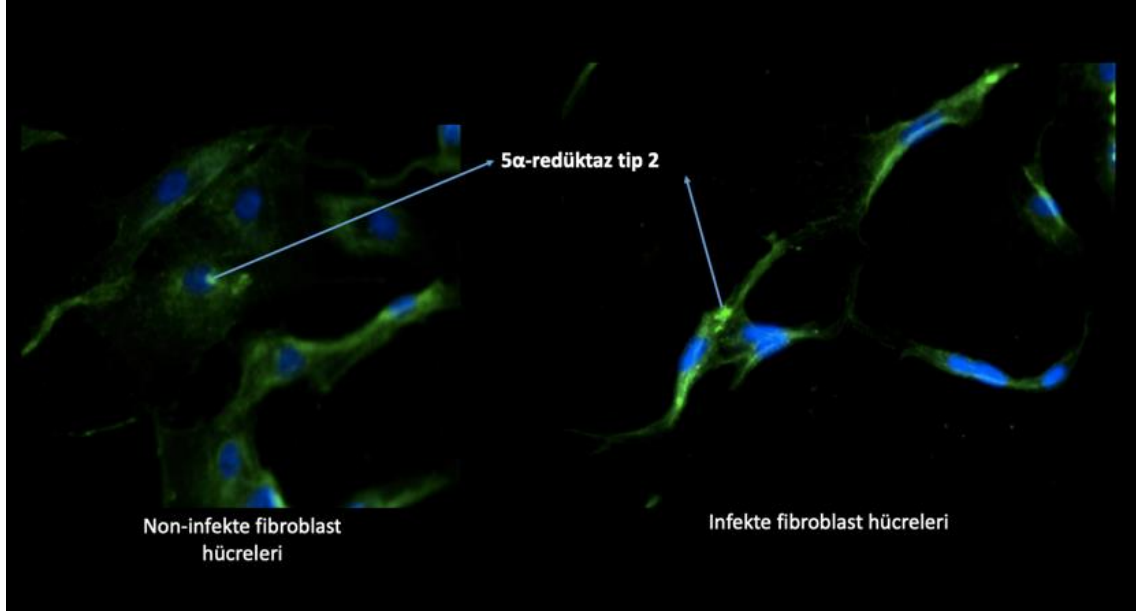
Şekil 4.5. İmmunositokimyasal yöntem ile boyanan gingival fibroblast hücrelerinde 5-alfa Redükteaz Tip-1 görüntüsü



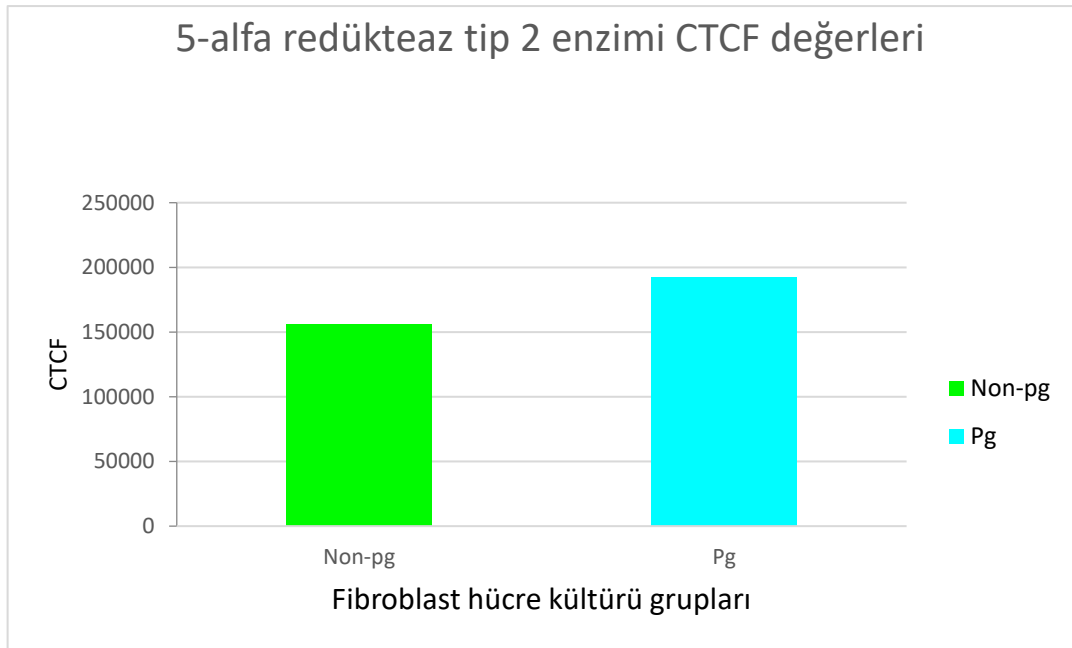
Sekil 4.6. 5-alfa redükteaz tip-1 enzimi CTCF değerleri.

4.4.2. 5-alfa Redükteaz Tip 2 Enzim Bulguları

P. gingivalis ile enfekte edilen gingival fibroblast hücre kültürü grubunda enfekte edilmeyen gruba göre doğrulanmış toplam hücre floresansı (corrected total cell fluorescence (CTCF)) değeri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.7. İmmunositokimyasal yöntem ile boyanan gingival fibroblast hücrelerinde 5-alfa Redükteaz Tip-2 görüntüsü.

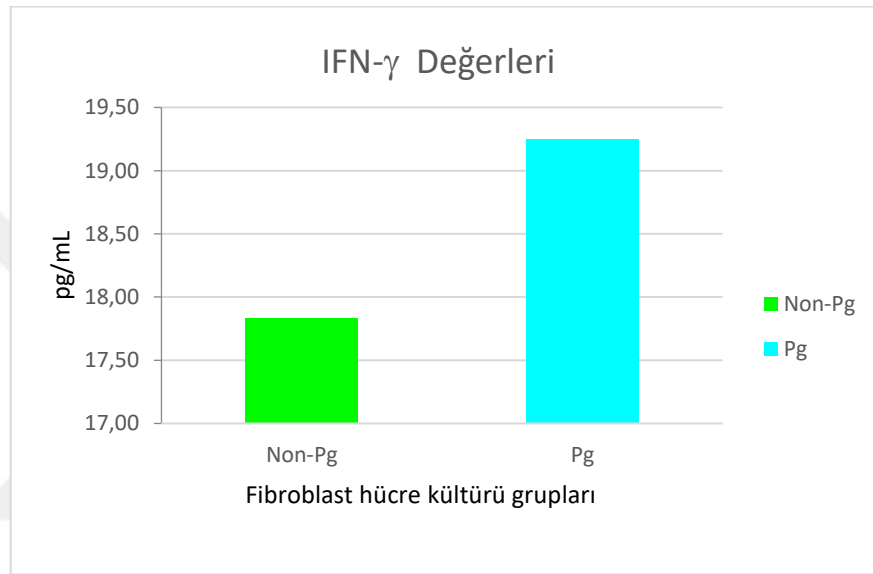


Sekil 4.8. 5-alfa redükteaz tip-2 enzimi CTCF değerleri.

4.5. Dişeti Fibroblast Hücre Kültürü Süpernatantlarında Biyokimyasal Bulgular

4.5.1. IFN- γ Bulguları

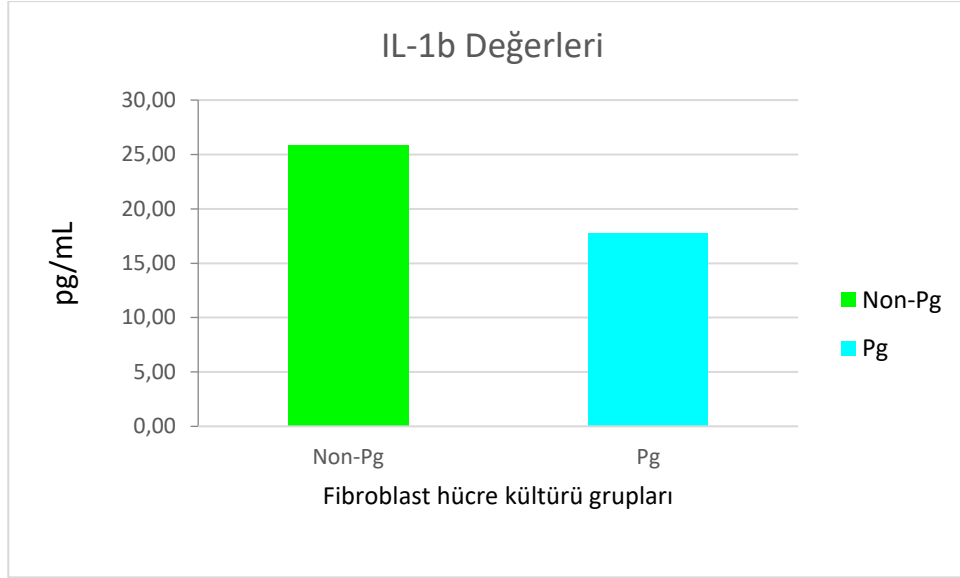
P. gingivalis ile enfekte edilen ve edilmeyen gingival fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki IFN- γ miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Sekil 4.9. IFN- γ değerleri.

4.5.2. IL-1 β Bulguları

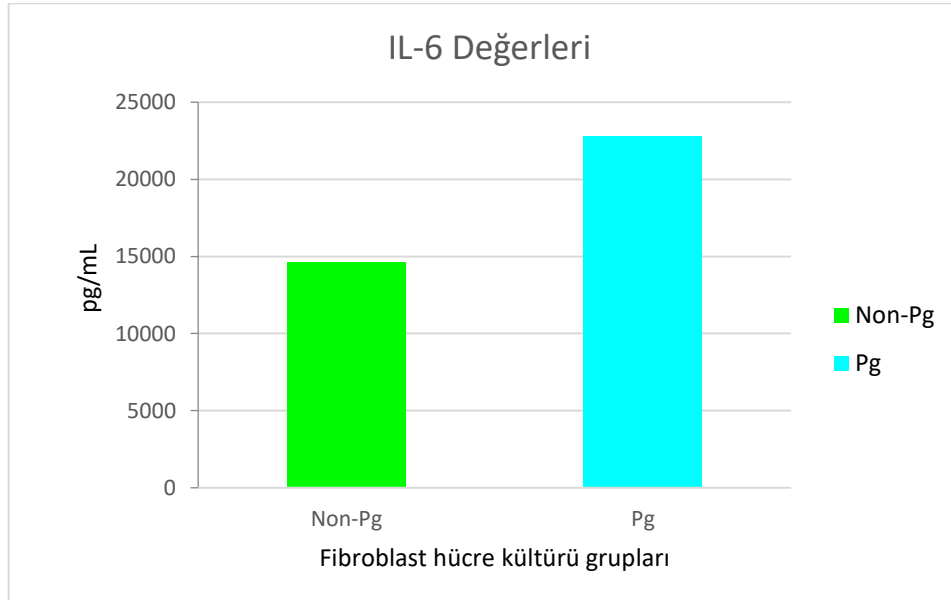
P. gingivalis ile enfekte edilen ve edilmeyen dişeti fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki IL-1 β miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Sekil 4.10. IL-1 β değerleri.

4.5.3. IL-6 bulguları

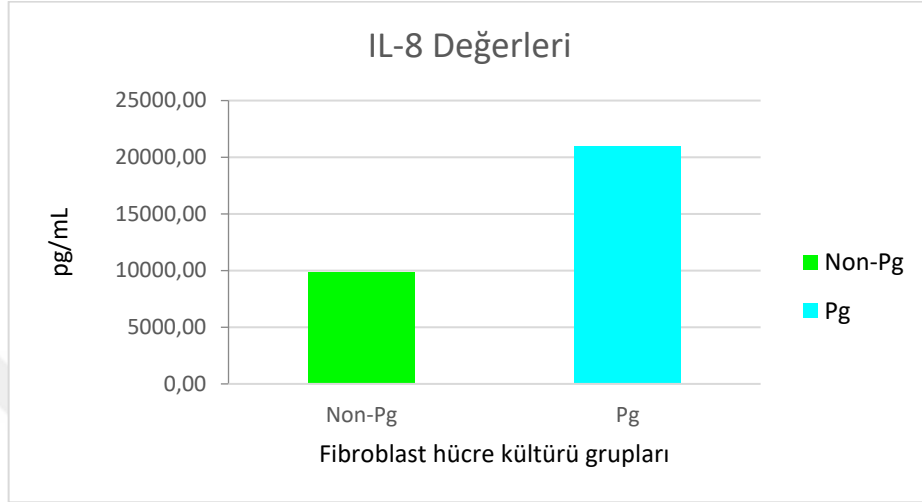
P. gingivalis ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki IL-6 miktarı, enfekte edilmeyen gruptakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$)



Sekil 4.11. IL-6 değerleri.

4.5.4. IL-8 bulguları

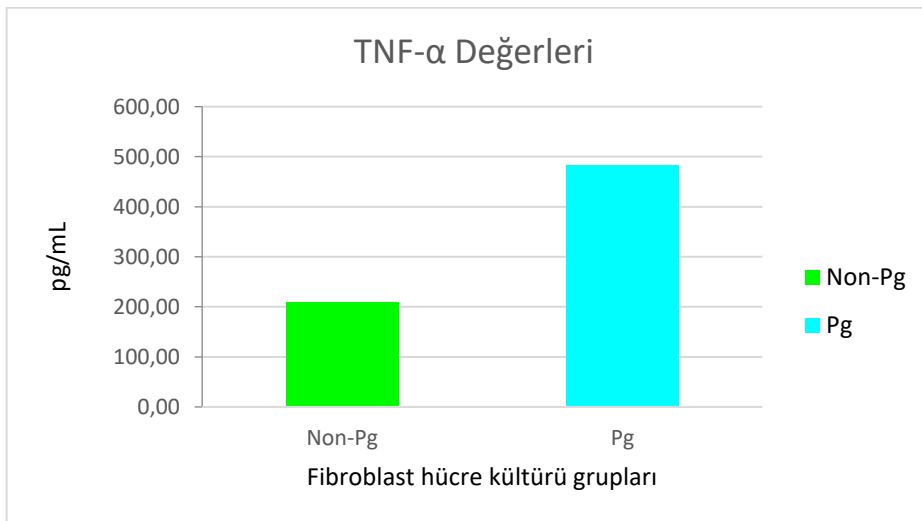
P. gingivalis ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki IL-8 miktarı enfekte edilmeyen gruptakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$)



Sekil 4.12. IL-8 değerleri.

4.5.5. TNF- α Bulguları

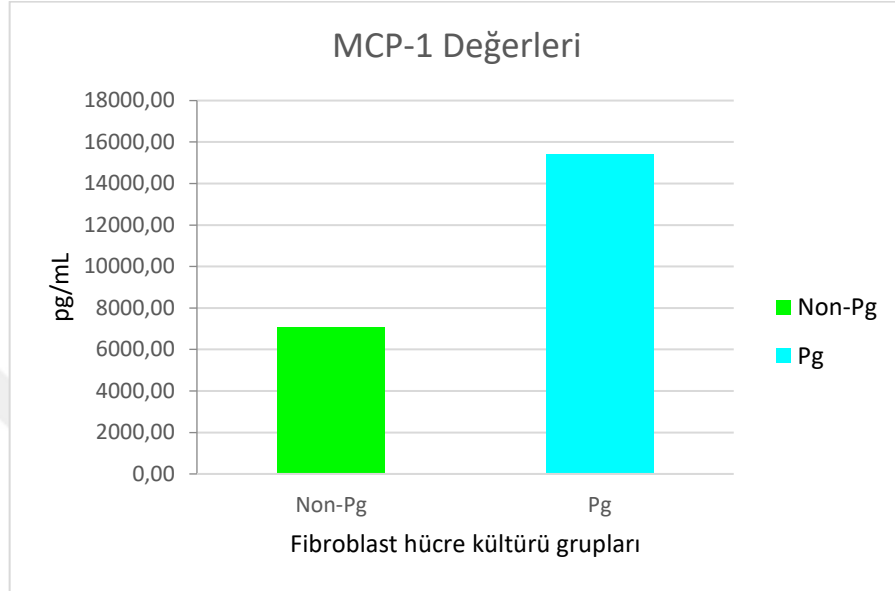
P. gingivalis ile enfekte edilen fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki TNF- α miktarı enfekte edilmeyen gruptakilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Sekil 4.13. TNF- α değerleri.

4.5.6. MCP-1 Bulguları

P. gingivalis ile enfekte edilen ve edilmeyen gingival fibroblast hücre kültürü gruplarının süpernatantlarındaki MCP-1 miktarları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Sekil 4.14. MCP-1 değerleri.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile periodontal hastalık ve androgenetik alopesi arasındaki ilişki, epidemiyolojik, klinik ve *in vitro* deney düzenekleri ile incelenmiştir.

Periodontal hastalık dişeti, alveolar kemik ve periodontal ligamenti etkileyen ve mikrobiyal dental plak tarafından başlatılan kronik enflamatuvar bir hastalıktır.^{1, 124} Periodontal hastalıklar, gingivitis ile başlar ve periodontal ligament ve alveolar kemik yıkımıyla sonuçlanan periodontitise dönüşür. Kronik periodontitis ağırlıklı olarak yetişkinleri etkiler ve dünya nüfusunun %10-15'i periodontitisten etkilenmektedir.^{33, 34}

Androgenetik alopesi, en sık görülen saç dökülmesi sebebidir ve başlıca etiyolojik faktörleri genetik ve hormonlardır. AGA insidansı ve prevalansı yaşa ve ırka bağlıdır.^{87, 98-100} Androgenetik alopesi ile sistemik hastalıkların ilişkisini inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. 1972 yılında ilk kez Cotton ve ark.²⁸ AGA'nın kardiovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olabileceğini öne sürmüş ve kardiovasküler hastalık oluşumu ile saç dökülmesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir.²⁸ Daha sonraki birçok çalışmada AGA'nın, insülin direnci, anormal serum lipid profilleri ve obezite gibi birçok hastalıkla ilişkisi gösterilmiştir.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile frontal saç kaybına sahip olan erkeklerde myokard enfarktüs riskinin arttığı gösterilmiştir.³⁰ Ayrıca androgenetik alopesiye sahip hastalarda azalmış antioksidan aktivite tespit edilmiş olup bu durum vücuttaki oksidatif stresi arttırmaktadır.¹¹¹ Periodontitis ile sistemik hastalıkların ilişkisi klinik periodontolojide önemli bir yere sahiptir. Periodontal hastalıklar ile diabetes mellitus, metabolik sendrom ve obezite arasındaki ilişki pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır.¹⁰⁶⁻¹¹⁰ Buna karşılık periodontal hastalıklar ile AGA arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada iltihapsal bir hastalık olması nedeniyle periodontal hastalığın aynı zamanda iltihapsal bir kökeni olabileceği düşünülen AGA ile bağlantılı olabileceği hipotezini

kurguladık. Bu açıdan periodontitis ile androjenetik alopesi arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk epidemiyolojik çalışma tarafımızca yapılan bu tez çalışmasıdır. Elde ettiğimiz istatistik sonuçlarına göre androjenetik alopesi ile periodontal hastalık arasında bir bağlantı mevcuttur.

Testosteron seviyesi farklı ırk ve popülasyonlardaki erkeklerde çok farklı değişiklikler göstermektedir.⁸⁸ Testosteron, periodontitis ile ilişkilidir ve testosteron seviyesindeki artış veya azalışın immun yanıtı etkilemesi ile alveol kemiği kaybına sebep olduğu düşünülür.¹⁷ Steffens ve arkadaşları tarafından yapılan 755 erkeğin dahil edildiği, testosteron seviyesi ile periodontal durumun değerlendirildiği bir çalışmaya göre, periodontal hastalığın şiddeti ile kan testosteron seviyesi arasında ilişki vardır.⁵ AGA'lı erkeklerin çoğunda normal androjen seviyesi bulunmasına rağmen, lokal olarak daha fazla testosteron ve dihidrotestosteron (DHT) üretilebilir.^{101,102} Testosteron, sitoplazmada 5- α redüktaz (5 α R) ile daha güçlü bir androjen hormon olan DHT'ye dönüştürülür.⁸⁷ 5- α redüktaz, androjenetik alopesiden de sorumludur.²⁶ Dişeti ve periodontal membran fibroblast hücreleri de 5- α redüktaz enzimine sahiptir.^{21, 23} 5- α redüktaz enziminin aktivitesi periodontal dokularda yenilenmeye katkı sağlar ve enflamasyonda tamirle alakalı büyüme faktörlerine cevaben insan diş eti dokusunda ve periodontal membranda artar.¹⁸⁻²¹

5- α redüktaz enzimi ile periodontal hastalıkların ilişkisini inceleyen sınırlı sayıda literatür olmakla beraber; PCR, immunohistokimyasal ve immunositokimyasal yöntemler kullanarak fibroblast hücre kültüründe ve insan dişeti dokusunda 5- α redüktaz enzimi ve periodontal hastalıkları inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda 5- α redüktaz enziminin aktivitesi, karbon işaretli androstenedion kullanılarak tespit edilmiştir.²⁵ Bu çalışmalarda 5- α redüktaz enzimlerinin mRNA ekspresyonu ve hücredeki miktarı değerlendirilmemiştir.

Kronik enflamasyona sahip diş eti dokusundan elde edilen fibroblastlarda artmış androjen metabolizması bulunmuştur.²² İnsan dişeti fibroblast hücre kültürü ile yaptığımız çalışmamızda, *P. gingivalis* ile enfekte edilen grupta kontrol grubuna göre artmış 5- α redüktaz tip-1 ve tip-2 enzim mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir. 5- α redüktaz tip-2 mRNA ekspresyon miktarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 5- α redüktaz tip-1 mRNA ekspresyon miktarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum 5- α redüktaz tip 1 enziminin androjen hormon metabolizmasından bağımsız dokulardaki (beyin, karaciğer) hücreler tarafından salgılanmasıyla ilgili olabilir.⁹⁷

Anabolik androjenik steroid kullanan erkeklerde, periodontitisin daha şiddetli olduğu ve kandidanın bazı türlerini de içeren periodontopatojenlerin prevalansının daha yüksek olduğu bulunmuştur.¹⁶ Progesteron ve estradiolun, *in vitro* ortamda *P. intermedia*'nın çoğalmasını stimüle ettiği gösterilmiştir.¹²⁵ Bu durum periodontitisin şiddetinin artmasında immun yanıtın yanında periodontopatojenlerin sayısal artışıyla da ilgili olabilir. Bu çalışmada *P. gingivalis* A7436'in insan dişeti fibroblast hücrelerindeki 5- α redüktaz tip-1 ve tip-2 enzim miktarları üzerinde etkili olabildiği gösterilmiştir. Bu bulgu dişeti dokusunda artan testosteron ve DHT miktarı kırmızı kompleks bakterilerin sayısındaki artışı etkiliyor olabilir.

Clark ve Soory²⁴ yaptıkları bir çalışmada *T. denticola* ATCC 33520'nin optimum pH bağlı olarak memeli 5- α redüktaz tip 2 enzimine benzeyen fonksiyonel bir proteini kodladığını göstermektedir. Çalışmamızda *P. gingivalis* A7436'in *T. denticola* ATCC 33520'nin bu genetik özelliğine sahip olup olmadığı ve *P. gingivalis*'in diğer suşlarının 5- α redüktaz enzimleri üzerine etkileri incelenmemiştir.

Soory ve Ahmad²⁵ tarafından yapılan insan dişeti hücrelerindeki 5- α redüktaz enzim aktivitesinin bakteriyel enfeksiyonlara karşı yanıtının karbon işaretli

androstenedion kullanılarak incelendiği bir diğer çalışmada, periodontal patojenlerin (*P. intermedia*, *P. gingivalis* ve *A.actinomycescomitans*) 5- α redüktaz enzim aktivitesini artırdığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda insan dişeti fibroblast hücre kültürlerindeki 5- α redüktaz tip-1 ve tip-2 enzimlerinin *P. gingivalis*'e karşı, mRNA ekspresyonu gerçek zamanlı PCR kullanılarak tespit edilmiştir. *P.gingivalis*' le enfekte olan ve olmayan gruplar arasında 5- α redüktaz tip-1 mRNA ekspresyonunda artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiş; 5- α redüktaz tip-2 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. İmmunositokimyasal yöntemle değerlendirilen 5- α redüktaz tip-1 ve tip-2 enzim miktarları *P.gingivalis* ile enfekte olan grupta enfekte olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Bu, çalışmamızın Soory ve Ahmad²⁵ tarafından yapılan çalışmayı desteklediğini göstermiştir.

Minosiklin ve finasteridinin 5- α redüktaz aktivitesini azalttığı bilinmektedir. Sorry ve Viridi¹²⁶ tarafından yapılan bir çalışmada dişeti fibroblast hücrelerine uygulanan 5- α redüktaz enzim inhibitörlerinin enflamasyonu azalttığını göstermişlerdir, biz çalışmamızda her ne kadar 5- α redüktaz enzimi inhibitörü içeren bir deney oluşturmamış olsak da periodontitisteki konak cevabını azaltmak için bu ilaçların kullanılabileceği sonucu çıkarılmaktadır.¹²⁶

Periodontitisli hastalardan, periodontal tedavi öncesi ve sonrası alınan dişeti biyopsilerinde immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak 5- α redüktaz enzim miktarının değerlendirildiği çalışmamızda, 5- α redüktaz tip 2 enziminin prostat dokusu kullanılan kontrol boyamalarında ve dişeti dokularında boyaması gerçekleştirilememiştir, bu durum kullanılan antikorun immunohistokimyasal boyamalardan ziyade immunositokimyasal boyamalara daha uygun olmasından kaynaklanmakla beraber antikor uygulanmadan önce mevcut dokuların hazır hale

getirilmesinde uygulanan protokollerle ve uygulayıcı hatalarıyla alakalı olabilir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz immunohistokimyasal ve immunositokimyasal bulgular 5- α redüktaz tip-1 enzimi için örtüşmektedir.

IL-1 ve IL-6, osteoklastların sayısını ve aktivitesini düzenleyen ve bu nedenle kemik yıkımı ile ilişkili olan önemli sitokinlerdir.¹²⁷ Literatürde erkek sıçanlarda deneysel periodontitis yapılan bir çalışmada hem yüksek hem de düşük testosteron seviyesinin kemik kaybına sebep olduğu sonucuna varılırken, düşük testosteron seviyesinin diş eti dokusunda IL-1 β yı artırdığını; yüksek testosteron seviyesinin ise RANKL seviyesinde farklılık oluşturduğu bulunmuştur.¹⁷ Literatürlerde insanlarda, sitokinler ve testosteron arasındaki ilişki konusunda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Kesitsel bir çalışmada, yaşlı erkeklerde testosteron ve çözülebilir IL-6 (sIL-6r) reseptörü arasında ters bir korelasyon gösterilmiştir; ancak IL-6, IL-1, TNF gibi diğer markerlar için korelasyon bulunamamıştır.¹²⁸ Yaşlı erkeklerde yapılan bir diğer çalışmada, 4 haftalık hipogonadizm indüksiyonunun hem IL-6 hem de sIL-6r'yi arttırdığını; ancak bu sonuçların hipogonadizmin ilerleyen dönemlerinde devam etmediği rapor edildi.^{129, 130} Malkin ve ark.¹³¹ tarafından yapılan bir çalışmada, hipogonadal erkeklerde testosteron replasman tedavisinin, IL-1 β ve TNF' yi anlamlı şekilde azalttığı, ancak IL-6 düzeyleri üzerinde bir etkisi olmadığı gösterildi.¹³¹ Testosteron replasman tedavisi bitirildikten 2 hafta sonra IL-6'da anlamlı bir artış ve TNF seviyelerinde azalma olduğu bildirildi.¹³² *In vitro*, insan dişeti fibroblast hücrelerinde yaptığımız çalışmamızda, *P. gingivalis* ile enfekte olan deney grubunun süpernatantlarındaki IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 miktarları enfekte olmayan gruba göre daha yüksekti; ancak IL-1 β miktarı *P.gingivalis* ile enfekte grupta azalmıştı. Bu veriler 5- α redüktaz enzimlerinin mRNA ekspresyonu ile IFN- γ , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 miktarları arasında bir paralellik olduğunu

gösterirken, IL- β seviyesi ile ters orantılı bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir ve Malkin ve ark. tarafından yapılan çalışmayı destekler niteliktedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasına göre;

- Periodontal tedavi ile biyofilm miktarı ve buna paralel olarak da dişeti kanama indeks değeri azalmıştır.
- Periodontal hastalıklı, dişeti dokularında 5- α redüktaz enzim miktarı artar.
- Androgenetik alopesi vakalarında 5- α redüktaz enzim miktarı ilgili dokularda yüksektir.
- Periodontal hastalıklar ile androgenetik alopesi arasında pozitif ilişki mevcuttur ve bu konuyla ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- Periodontal tedavi ile dişeti dokularda bulunan 5- α redüktaz enzim miktarı azaltılabilir.

KAYNAKLAR

1. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's Clinical Periodontology, 9th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2014:67
2. Graves DT, Kang J, Andrianakaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*, 2012;15:117-132.
3. Nanci A, Bosshardt DDJP. Structure of periodontal tissues in health and disease. *J Periodonto*,. 2006;40:11-28.
4. Ojanotko-Harri A, Hurttia H, Harri MP. Role of granulation tissue and fibroblasts in gingival testosterone metabolism in the rat in vitro. *J. steroid Bioche*, 1986;25:689-693.
5. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. *J Periodontol*, 2015;86:1116-1125.
6. Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, Giwercman YL, Giwercman A. Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. *PLoS One*, 2013;8:e61466.
7. Hak AE, Witteman JC, de Jong FH, et al. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002;87:3632-3639.
8. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes care*, 2004;27:1036-1041.
9. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J, Metabolism. Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008;93:68-75.

10. Meier C, Nguyen TV, Handelsman DJ, et al. Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *Arch Intern Med*, 2008;168:47-54.
11. Mellström D, Johnell O, Ljunggren Ö, et al. Free testosterone is an independent predictor of BMD and prevalent fractures in elderly men: MrOS Sweden. *J Bone Miner Res*, 2006;21:529-535.
12. Selvin E, Feinleib M, Zhang L, et al. Androgens and diabetes in men: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes care*, 2007;30:234-238.
13. Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, Mckinlay JB. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes care*, 2000;23:490-494.
14. Genco RJ, Borgnakke WSJP. Risk factors for periodontal disease. *J Periodontol*, 2013;62:59-94.
15. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol*, 2004;89:3313-3318.
16. Brusca MI, Verdugo F, Amighini C, Albaina O, Moragues MD. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota. *Clin Oral Investig*, 2014;18:1579-1586.
17. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res*, 2014;46:193-200.
18. Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology*,

- 1989;124:1576-1578.
19. Sultan C, Oliel V, Audran F, Meynadier J. Free and total plasma testosterone in men and women with acne. *Acta Derm Venereol*, 1986;66:301-304.
 20. Kasasa SC, Soory M. The response of human gingival fibroblasts to interleukin-1 in their metabolic conversion of two androgenic substrates. *Arch Oral Biol*, 1995;40:979-981.
 21. Kasasa SC, Soory M. The effect of interleukin-1 (IL-1) on androgen metabolism in human gingival tissue (HGT) and periodontal ligament (PDL). *J Clin Periodontol*, 1996;23:419-424.
 22. Sooriyaamoorthy M, Gower DJ. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1989;16:201-208.
 23. Southern AL, Rappaport SC, Gordon GG, Vittek J, Metabolism. Specific 5 α -dihydrotestosterone receptors in human gingiva. *J Clin Endocrinol Metab*, 1978;47:1378-1382.
 24. Clark DT, Soory M. Steroid 5 α -reductase activity of *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol*, 2007;22:326-332.
 25. Soory M, Ahmad S. 5 α -reductase activity in human gingiva and gingival fibroblasts in response to bacterial culture supernatants, using [14C] 4-androstenedione as substrate. *Arch Oral Biol*, 1997;42:255-262.
 26. Asada Y, Sonoda T, Ojio M, et al. 5 α -reductase type 2 is constitutively expressed in the dermal papilla and connective tissue sheath of the hair follicle in vivo but not during culture in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001;86:2875-2880.
 27. Springer K, Brown M, Stulberg DL. Common hair loss disorders. *Am Fam Physician*, 2003;68:93-102.
 28. Cotton SG, Nixon JM, Carpenter R, Evans D. Factors discriminating men with

- coronary heart disease from healthy controls. *Br Heart J*, 1972;34:458.
29. Schnohr P, Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G. Gray hair, baldness, and wrinkles in relation to myocardial infarction: the Copenhagen City Heart Study. *Am Heart J*, 1995;130:1003-1010.
 30. Lotufo PA, Chae CU, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE. Male pattern baldness and coronary heart disease: the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med*, 2000;160:165-171.
 31. Łysek R, Jankowski P, Polak M, et al. Association between central and peripheral blood pressure and periodontal disease in patients with a history of myocardial infarction. *Pol Arch Med Wewn*, 2016;126:41-47.
 32. Gotsman I, Lotan C, Soskolne WA, et al. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol*, 2007;78:849-858.
 33. Amano A. Host-parasite interactions in periodontitis: subgingival infection and host sensing. *Periodontol 2000*, 2010;52:7-11.
 34. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17038.
 35. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*, 2018;89:9-16.
 36. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89:17-27.
 37. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol*, 2018;89:28-45.
 38. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Periodontol*, 2018;89:85-102.

39. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 2018;89:237-248.
40. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol*, 2018;89:183-203.
41. Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 2018;89:103-119.
42. Needleman I, Garcia R, Gkraniias N, et al. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Periodontol*, 2018;89:120-139.
43. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Periodontol*, 2018;89:140-158.
44. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 2018;89:S173-S182.
45. Cortellini P, Bissada NF. Mucogingival conditions in the natural dentition: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol*, 2018;89:204-213.
46. Fan J, Caton JG. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol*, 2018;89:214-222.
47. Ercoli C, Caton JG. Dental prostheses and tooth-related factors. *J Periodontol*, 2018;89:223-236.
48. Armitage GCJP. The complete periodontal examination. *J Periodontol*,

- 2004;34:22-33.
49. Taba M, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, 2005;49:551-571.
 50. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2013;27:3754-3759.
 51. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *J Periodontol*, 1994;5:78-111.
 52. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *J Periodontol*, 2005;38:9-12.
 53. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *J Periodontol*, 2005;38:72-122.
 54. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *J Periodontol*, 2004;36:14-26.
 55. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FEJP. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *J Periodontol*, 2006;42:80-87.
 56. Socransky SS, Haffajee ADJP. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *J Periodontol*, 2002;28:12-55.
 57. Socransky SS, Haffajee ADJP. Periodontal microbial ecology. *J Periodontol*, 2005;38:135-187.
 58. Van Winkelhoff AJ, Winkel EGJP. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *J Periodontol*, 2005;39:40-52.
 59. How KY, Song KP, Chan KG. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 2016;7.
 60. Bodet C, Chandad F, Grenier DJM, Infection. Inflammatory responses of a

- macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Infect Immun*, 2006;8:27-35.
61. Hajishengallis G, Lambris JD. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology*, 2012;217:1111-1116.
 62. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, 2008;61:577-587.
 63. Mahanonda R, Seymour G, Powell L, Good M, Halliday J. Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 1991;6:221-227.
 64. Casarin R, Ribeiro ÉDP, Mariano F, Nociti Jr F, Casati M, Gonçalves R. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, 2010;45:635-642.
 65. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Prohulske-Fox AJ. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000;187:139-144.
 66. Baek KJ, Ji S, Kim YC, Choi Y. Association of the invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. *Virulence*, 2015;6:274-281.
 67. Sandros J, Karlsson C, Lappin D, Madianos P, Kinane D, Papapanou P. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res*, 2000;79:1808-1814.
 68. Holdsworth SR, Gan P-Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care

- About. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015;10:2243-2254.
69. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 2007;45:27.
 70. Copray J, Mantingh I, Brouwer N, et al. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol*, 2001;118:203-211.
 71. Jeanjean A, Moussaoui S, Maloteaux J-M, Laduron P. Interleukin-1 β induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience*, 1995;68:151-157.
 72. Schweizer A, Feige U, Fontana A, Müller K, Dinarello CJA, actions. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E 2 levels. *Agents actions*, 1988;25:246-251.
 73. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Probst L, Haffajee A, Socransky S. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1991;18:548-554.
 74. Bozkurt FY, Berker E, Akkuş S, Bulut Ş. Relationship between interleukin-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. *J Periodontol*, 2000;71:1756-1760.
 75. Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res*, 1999;5:3711-3721.
 76. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 1992;258:1798-1801.
 77. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung

- cancer in SCID mice. *J Clin Invest*, 1996;97:2792-2802.
78. Peters I, Helps C, Hall E, Day M. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods*, 2004;286:203-217.
 79. Richter GW, Solez K. Cytokine-Induced Pathology: Inflammatory Cytokines, Receptors, and Diseases, , 1st ed. San Diego, Academic Press, 2013:73-96
 80. Berglundh T, Liljenberg B, Lindhe J. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J Periodontol*, 2002;29:705-709.
 81. Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kurkcu M, Karacay S. Effects of interferon-gamma on bone remodeling during experimental tooth movement. *Angle Orthod*, 2007;77:135-141.
 82. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BEJJo, research c. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 2009;29:313-326.
 83. Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes MLJJon. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol*, 1994;50:101-107.
 84. Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int*, 1992;42:95-101.
 85. Davey RA, Grossmann M. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *Clin Biochem Rev*, 2016;37:3.
 86. Zouboulis CC. The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones (Athens)*, 2004;3:9-26.
 87. Lolli F, Pallotti F, Rossi A, et al. Androgenetic alopecia: A review. *Endocrine*,

- 2017;57:9-17.
88. Mazur A. The age-testosterone relationship in black, white, and Mexican-American men, and reasons for ethnic differences. *Aging Male*, 2009;12:66-76.
 89. Vandenput L, Ohlsson C. Sex steroid metabolism in the regulation of bone health in men. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010;121:582-588.
 90. Ohlsson C, Vandenput L. The role of estrogens for male bone health. *Eur J Endocrinol*, 2009;160:883-889.
 91. Khosla S. New insights into androgen and estrogen receptor regulation of the male skeleton. *J Bone Miner Res*, 2015;30:1134.
 92. Michael H, Härkönen PL, Väänänen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2005;20:2224-2232.
 93. Scopacasa F, Horowitz M, Wishart J, Morris H, Chatterton B, Need A. The relation between bone density, free androgen index, and estradiol in men 60 to 70 years old. *Bone*, 2000;27:145-149.
 94. Ucer S, Iyer S, Bartell SM, et al. The effects of androgens on murine cortical bone do not require AR or ER α signaling in osteoblasts and osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2015;30:1138-1149.
 95. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C, Jr., Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone*, 2015;81:683-690.
 96. Cavallo JA, Kaplan SA. Medical Aspects of the Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms/Benign Prostatic Hyperplasia: 5-Alpha Reductase Inhibitors. In: Morgia G, Russo GI (eds). *Lower Urinary Tract Symptoms and Benign Prostatic Hyperplasia*, 1st ed. London, Elsevier, 2018:189-206.

97. Russell DW, Berman DM, Bryant JT, et al. The molecular genetics of steroid 5 alpha-reductases. *Recent Prog Horm Res*, 1994;49:275-284.
98. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man: types and incidence. *Ann N Y Acad Sci*, 1951;53:708-728.
99. Severi G, Sinclair R, Hopper J, et al. Androgenetic alopecia in men aged 40–69 years: prevalence and risk factors. *Br J Dermatol*, 2003;149:1207-1213.
100. Yip L, Zaloumis S, Irwin D, et al. Gene-wide association study between the aromatase gene (CYP19A1) and female pattern hair loss. *Br J Dermatol*, 2009;161:289-294.
101. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem*, 1991;266:9912-9918.
102. Poór V, Juricskay S, Telegdy E, methods b. Urinary steroids in men with male-pattern alopecia. *J Biochem Biophys Methods*, 2002;53:123-130.
103. Sasmaz S, Senol M, Ozcan A, et al. The risk of coronary heart disease in men with androgenetic alopecia. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 1999;12:123-125.
104. Matilainen V, Koskela P, Keinanen-Kiukaanniemi S. Early androgenetic alopecia as a marker of insulin resistance. *Lancet*, 2000;356:1165-1166.
105. Hirsso P, Rajala U, Hiltunen L, Jokelainen J, Keinanen-Kiukaanniemi S, Nayha S. Obesity and low-grade inflammation among young Finnish men with early-onset alopecia. *Dermatology*, 2007;214:125-129.
106. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*, 2001;6:99-112.
107. Watanabe K, Cho YD. Periodontal disease and metabolic syndrome: a qualitative

- critical review of their association. *Arch Oral Biol*, 2014;59:855-870.
108. Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 2010;81:1708-1724.
 109. Suvan J, D'Aiuto F, Moles DR, Petrie A, Donos N. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*, 2011;12:e381-e404.
 110. Winning L, Linden G. Periodontitis and systemic disease: association or causality? *Curr Oral Health Rep*, 2017;4:1-7.
 111. Prie B, Iosif L, Tivig I, Stoian I, Giurcaneanu C. Oxidative stress in androgenetic alopecia. *J Med Life*, 2016;9:79.
 112. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 1974;186:1213-1215.
 113. Jenkins E, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson J, Russell D. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *J Clin Invest*, 1992;89:293-300.
 114. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 1991;354:159.
 115. Leyden J, Dunlap F, Miller B, et al. Finasteride in the treatment of men with frontal male pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol*, 1999;40:930-937.
 116. Dallob A, Sadick N, Unger W, et al. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994;79:703-706.
 117. Norwood OT. Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J*,

- 1975;68:1359-1365.
118. Drew CP, Shieh WJ. Immunohistochemistry. In: Rupprecht C, Nagarajan T. (eds). Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2, USA, Elsevier, 2015:109-115.
 119. Günel T, Gen anlatımının kantitatif analizi Real-time PCR. *J Med Sci*, 2007;27:763-767.
 120. Livak K, Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 2001; 25: 402-8.
 121. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol*, 2016;20:128.
 122. Burry R. Controls for immunocytochemistry: An update. *J Histochem Cytochem*, 2011;59:6-12.
 123. Nourse JL, Ziaieian B, Palmer T, Schwartz PH, Flanagan LA. Immunocytochemical analysis of human stem cells. In: Peterson S, Loring J (eds). Human Stem Cell Manual, 2nd ed. China, Elsevier, 2012:249-270.
 124. Gotsman I, Lotan C, Soskolne WA, et al. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol*, 2007;78:849-858.
 125. Kornman KS, Loesche W. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*, 1982;35:256-263.
 126. Soory M, Viridi H. Effects of the anti-androgen finasteride on 5 α -reductase activity in human gingival fibroblasts in response to minocycline. *J Clin Periodontol*, 1998;25:67-73.
 127. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host

- response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, 2011;3:5304.
128. Maggio M, Basaria S, Ble A, et al. Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006;91:345-347.
129. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O'fallon W. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002;87:1550-1554.
130. Maggio M, Blackford A, Taub D, et al. Circulating inflammatory cytokine expression in men with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy. *J Androl*, 2006;27:725-728.
131. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004;89:3313-3318.
132. Yialamas MA, Dwyer AA, Hanley E, et al. Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007;92:4254-4259.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Yelda ÖZKAN Doğum Tarihi: 15.02.1988 Doğum Yeri: ERZURUM Medeni Hali: Bekâr Uyruğu: T.C Adres: Atatürk Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalı Tel: 05314328878 E-mail: yerdaoalkan@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum İbrahim Hakkı Fen Lisesi Lisans: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: 86
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Türk Periodontoloji Derneği The European Federation of Periodontology

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURULU

Sayı : 07

10/ 02 / 2016

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

01.02.2016 tarihli yazınız ekinde gönderilen Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Recep ORBAK'ın danışanlığında Arş. Görv. Dt. Yelda ÖZKAN'nın yürüteceği **"Androjen hormon metabolizmasında görev alan 5α-redüktazın periodontal hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi"** konulu doktora tezi çalışması ile ilgili etik kurul başvurusu kurulumuz tarafından incelenmiş olup, konu ile ilgili alınan karar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz ve rica ederim.

Prof. Dr. Abubekir HARORLI

Etik Kurul Başkanı



Eki: Etik Kurul Kararı

Adres: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı ERZURUM

Tel : (442) 2360942



T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURULU

Oturum Tarihi: 10.02.2016

Oturum Sayısı: 02/2016

KARAR

SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Recep ORBAK
Araştırmanın Açık Adı	Androjen hormon metabolizmasında görev alan 5α-redüktazın periodontal hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi
Karar No	7.
Alınan Karar	Sorumlu Araştırmacı Prof. Dr. Recep ORBAK'ın danışanlığında Arş. Görv. Dt. Yelda ÖZKAN'nın yürüteceği "Androjen hormon metabolizmasında görev alan 5α-redüktazın periodontal hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi" konulu doktora tezi çalışmasının, Sağlık Bakanlığı tarafından yayımlanan 19 Ağustos 2011 tarih ve 28030 sayılı "Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik" hükümlerine bağlı kalınarak yapılmak şartıyla kabul edilmesinde bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.



Prof. Dr. Nuran YANIKOĞLU

Prof. Dr. Abubekir HARORLI
Etik Kurul Başkanı



Prof. Dr. Yusuf Ziya BAYINDIR

Prof. Dr. Kezban Meltem ÇOLAK TOPÇU

Yrd. Doç. Dr. Ali KİKİ