

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

**PLAĞA BAĞLI GİNGİVİTİSLİ, KRONİK PERİODONTİTİSLİ VE
PERİODONTAL OLARAK SAĞLIKLI BİREYLERİN DİŞ ETİ OLUĞU SIVISI
VE TÜKRÜK ÖRNEKLERİNDE NİTRİK OKSİT VE TÜMÖR NEKROZİS
FAKTÖR ALFA SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Hatice YAĞIZ

**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Varol ÇANAKÇI**

Doktora Tezi

ERZURUM 2006

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1.ÖZET	II
2.SUMMARY	V
3.GİRİŞ VE AMAÇ	1
4.GENEL BİLGİLER	4
4.1 Plağa bağlı gingivitis	4
4.2 Kronik periodontitis	6
4.3 Diş eti oluğu sıvısı	8
4.4 Tükrük	12
4.5 Reaktif oksijen türleri	14
4.6 Nitrik Oksit	16
4.7 Periodontal hastalık ve Nitrik Oksit	21
4.8 Sitokinler	22
4.9 TNF-α	23
5. MATERYAL VE METOD	26
6. BULGULAR	38
7. TARTIŞMA	46
8. SONUÇLAR	55
9. KAYNAKLAR	57
10. EKLER	67

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; plağa bağlı gingivitisli, kronik periodontitisli ve periodontal açıdan sağlıklı bireylerden elde edilen diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürük örneklerinde nitrik oksit (NO) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) seviyelerinin saptanması, ayrıca bun moleküllerin bir birleri ile ve periodontal hastalığın klinik parametreleri ile olası ilişkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmaya, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine farklı nedenlerden dolayı müracaat eden toplam 55 birey dâhil edildi. Çalışma protokolüne göre bireyler üç gruba ayrıldı. Periodontal olarak sağlıklı 15 birey I.Grubu, plağa bağlı gingivitisli 20 hasta II.Grubu ve kronik periodontitisli 20 hasta III. Grubu oluşturdu. Çalışmamıza dâhil edilen tüm bireylere çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verildi ve imzalı onayları alındı. Araştırma kapsamına alınan bireylerin ilk önce klinik muayeneleri yapıldı. Her bir bireyin periodontal durumunu saptamak amacıyla Silness ve Løe'nin plak indeksi (PI), Løe ve Silness'in gingival indeksi (GI) kullanıldı. Ayrıca klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalama derinliğine (SD) bakıldı.

Çalışmaya dâhil edilen tüm bireylerden DOS ve tükürük örnekleri alındı. Bireylerden DOS elde edilmesinde standart Periopaper stripler[®], kullanıldı ve bu şeritlerdeki DOS hacmi, özel olarak programlanmış Periotron 8000[®] cihazı ile ölçüldü. Tükürük örnekleri uyarılmamış tükürük olarak alındı. Tüm DOS ve tükürük örnekleri, NO seviyeleri ve TNF- α seviyelerinin tespiti için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ELISA yöntemi kullanılarak çalışıldı. Çalışmamızda elde edilen bulguların gruplar arası karşılaştırmalarda bağımsız örnekler

için Varyans ve Student *t*-testi kullanıldı. Laboratuvar bulguları ve klinik parametreler arası ilişkiyi analiz etmek için de Spearman rank korelasyon testi kullanıldı.

Bu çalışmada sağlıklı bireylere göre gingivitisli ve periodontitisli bireylerde DOS miktarının arttığı ve bu artışın da hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olduğu tespit edildi. DOS total NO seviyeleri kontrol grubunu oluşturan (I.Grup) periodontal açıdan sağlıklı bireylerde, plağa bağlı gingivitisli (II.Grup) ve kronik periodontitisli (III.Grup) hastalarından daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Yine DOS NO konsantrasyon seviyelerinin kontrol grubunda oluşturan (I.Grup) periodontal açıdan sağlıklı bireylerde, plağa bağlı gingivitisli (II.Grup) ve kronik periodontitisli (III.Grup) hastalarından önemli derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi ve gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0.001$). DOS NO konsantrasyon değerleri ile klinik parametreler arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı negatif korelasyonlar bulundu ($p < 0.001$). DOS TNF- α total seviyeleri ise en yüksek kronik periodontitis grubunda (III.Grup), en düşük olarak ise kontrol grubunda (I.Grup) bulundu. DOS TNF- α total seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0.05$). Ancak DOS TNF- α total seviyeleri ile klinik parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edilemedi ($p > 0.05$). Tükürük NO ve TNF- α seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ($p > 0.05$).

Sonuç olarak; periodontal olarak sağlıklı (kontrol grubu) bireylerde hem total DOS NO hemde DOS NO konsantrasyon seviyeleri hastalıklı bireylere oranla daha yüksek bulundu. Periodontal hastalıklı bireylerde DOS NO konsantrasyon seviyeleri ile hastalığın klinik parametreleri arasında negatif korelasyon saptandı. Periodontal hastalıklı bireylerde DOS TNF- α total seviyelerindeki artış periodontal hastalığın iyi bir

göstergesi olabilir. Tükürük NO seviyeleri ile periodontal hastalıklar arasında bir ilişki bulunamadı. Benzer şekilde tükürük TNF- α seviyeleri ile periodontal hastalıklar arasında bir ilişki bulunamadı.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the levels of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in gingival crevicular fluid (GCF) and saliva of subjects with plaque induced gingivitis, chronic periodontitis and healthy periodontal tissues. Also the association of these molecules between each other and with clinical parameters was evaluated.

The subject population was consisted of 55 volunteers which were attended University of Atatürk ,Faculty of Dentistry for different causes. According to the study protocol the subjects were divided to three groups. Group I consisted of 15 periodontally healthy subjects, whereas 20 subjects with plaque induced gingivitis were classified as group II and 20 subjects with chronic periodontitis were classified as group III. The protocol of investigation was explained to each individual and received his or her approval. Firstly, clinical examination was performed in each individual. To determine clinical condition of each individual, plaque index (PI) (Silness&Løe), gingival index (GI) (Løe&Silness), clinical attachment level (CAL) and probing depth (PD) were measured.

GCF and saliva samples were obtained from all individuals. GCF samples were collected with standard Periopaper strips and the GCF amount on these strips was measured with Periotron 8000 which was specially programmed. Saliva samples were collected as unstimulated saliva. All GCF and saliva samples were investigated in the laboratory of Biochemistry Department of Medicine Faculty, Atatürk University to detect NO and TNF- α levels using ELISA. The samples were investigated The study sites were upper anterior teeth for the periodontally healthy group and from the locally

effected sites for the other groups. However for minimizing the contamination risk upper sites were preferred. The NO levels obtained from the GCF were measured with using a commercial colorimetric nitrate/nitrite kit also TNF- α levels were measured with using a commercial ELISA kit. Varyans and Student *t*-test were used for intergroup comparison while Spearman rank correlation test was used for analysis of relationship between clinical parameters and laboratory results.

In this study, amounts of GCF were increased in group II and group III when compared with the group I and this increase was directly proportional with severity of disease. The GCF total NO amount was higher in group I when it is compared with group II and group III ($p < 0.05$). The GCF concentration NO level was significantly higher in group I when it is compared with group II and group III ($p < 0.001$). There was a significantly negative correlation between GCF NO concentration levels and clinical parameters ($p < 0.001$). The GCF total TNF- α levels was significantly highest in group III and significantly higher in group II than group I ($p < 0.05$). However, there was no significantly positive correlation between GCF total TNF- α levels and clinical parameters ($p > 0.05$). Salivary NO and TNF- α levels were not have significantly differences amount all groups ($p > 0.05$).

In conclusion, Both GCF total NO amount and GCF NO concentration levels periodontally healthy subjects were found higher than these in periodontally diseased subjects. Increased GCF total TNF- α level may be a good marker for periodontal diseases. There was no relationship between salivary levels of NO and periodontal diseases. Similarly, there was no relationship between salivary levels of TNF- α and periodontal diseases.

GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontal hastalık, dünyada sık görülen ve toplumun her kesimini değişik oranlarda etkileyen, dişin destek dokularına yayılarak büyük oranda diş kayıplarına yol açan yaygın ve kronik seyirli bir hastalıktır.¹⁻⁴ Periodonsiyumun en yaygın görülen ve araştırılan hastalıkları plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis gibi iltihabi yapıya sahip kronik durumlardır.⁵ Gingivitis olarak başlayan hastalık tedavi edilmediği takdirde, mikrobiyal dental plaktaki patojen bakterilerin kalitatif ve kantitatif olarak gelişmesi ve bununla beraber kişinin savunma yeteneğinin de azalması sonucu ataşman kaybı ve cep oluşumu ile karakterize kronik periodontitise dönüşebilmektedir.^{1,3-5}

Periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılan klinik ölçümler hastalığın şiddeti hakkında bilgi verirken hastalığın aktivasyonunun belirlenmesinde kullanılamazlar.⁶ Periodontal hastalık aktivasyonunun belirlenebilmesi için konak doku cevabının analiz edilmesi gereklidir.⁶ Birçok çalışmada diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürüğün biyokimyasal ve immünolojik analizlerinin periodontal hastalık aktivasyonunun saptanmasında faydalı olabileceği vurgulanmıştır.⁶⁻⁸

DOS; dişetin seruma benzer ekstraselüler bir sıvısı olup epitel tabakasını geçerek dişeti oluğundan ağız içine akar. DOS esas olarak mikrovasküler sızıntıdan kaynaklanmaktadır. DOS'a hücreler arası sıvı ve hücrel sitoplazma sıvısı eklenir. DOS dişeti oluğundaki bakteri ve konak hücrelerinin metabolik elementlerini de içerir.⁶⁻

11

Tükürük; proteinler, glikoproteinler, elektrolitler, küçük organik moleküller ve kandan geçen bileşiklerden oluşan heterojen bir sıvıdır. Tükürük, büyük tükürük bezleri olan submandibular, sublingual ve parotid bezlerinin salgıları, küçük tükürük bezlerinin

salgıları ve DOS'un karışımından oluşur. Tükürük sekresyonu; farklı uyarılardan, günün farklı zamanlarından, diyetten, yaştan, cinsiyetten, hastalık durumlarındaki değişikliklerden ve çeşitli farmakolojik ajanlardan etkilenir. Tükürük bir kısmı çiğneme esnasında üretilirken yaklaşık % 60'lık kısmı dinlenme pozisyonunda üretilir. Uyku esnasında büyük tükürük bezlerinden akış hemen hemen durur. Tükürükte yer alan proteinler kan plazma konsantrasyonunun %3'ü kadardır ve birçoğu antibakteriyel özelliklere sahiptirler. Bu proteinler, nonimmunglobülinler ve IgA, lizozim, laktoferrin ve peroksidaz gibi sekretuar antikorları içerir.

Periodontal olarak sağlıklı ve hastalıklı bireylerin DOS ve tükürük örneklerinde biyokimyasal ve immünolojik analizler sonucu bazı iltihabi mediatörlerin, enzimlerin ve reaktif radikallerin seviye ve/veya miktarlarında değişimler olduğu bildirilmiştir.⁶⁻⁵

Reaktif bir radikal aynı zamanda toksik ve kirletici bir gaz olan nitrik oksit (NO), pek çok fizyolojik ve patolojik aşamalarda anahtar rol oynayan bir moleküldür. NO, direkt veya indirek yoldan bazı iltihabi sitokinlerin üretimini etkileyerek hem periodontitis hem de alveoler kemik kaybı patogenezinde rol oynayabilir. Organizmada tümör nekrozis faktör $-\alpha$ (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) ve interlökin-1(IL-1) gibi sitokinlerin stimülasyonu ile NO üretiminin arttığı bildirilmiştir^{12,13}. Lipopolisakkaritler ve endotoksinler gibi bakteriyel ürünlere cevap olarak konak doku monosit ve makrofajlarından salgılanan iltihabi sitokinlerin periodonsiyumun yıkımından sorumlu olduğunu gösteren deliller vardır.¹²⁻¹⁵

TNF- α , makrofajlar ve monositler tarafından üretilen polipeptid bir sitokindir. İltihabi cevapta multipotent bir düzenleyici olarak rol oynar ve potent bir piyrogen olarak da işlev görür. TNF- α , iltihabi ajanlar ve doku yaralanmaları gibi uyarılara cevap vererek, nötrofilleri aktive ederek, vasküler endotelyal hücrelerin özelliklerini

değiştirerek ve lokal kan pıhtılaşması oluşturarak tümörüsidal aktiviteyi artırır. Ayrıca tüm vücutta dolaşarak çeşitli tip hücrelerin metabolik aktivitelerini düzenler.^{16,17}

Daha önce periodontal hastalıklı bireylerin tükürük, bakteri plağı ve dişeti dokusu örneklerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda NO seviyeleri saptanmış ve NO'in TNF- α gibi iltihabi sitokinlerle ilişkisi belirtilmiştir.^{12,13} Bu çalışmalarda benzer çalışmaların DOS örneklerinde yapılması tavsiye edilmiş olmasına rağmen literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanamadı. Çalışmamızın amacı; periodontal açıdan sağlıklı, plağa bağılı gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylerin DOS ve tükürük örneklerinde NO ve TNF- α seviyelerinin saptanması ve periodontal hastalıkların klinik parametreleri ile olası ilişkilerinin araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

Periodontal hastalık, insanlarda görülen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Hastalık basit bir dişeti iltihabı ile başlayıp tüm periodonsiyuma yayılabilir. Hastalığın yaygın iki formu vardır.⁵ Plağa bağlı gingivitis geri dönüşümlü, kronik periodontitis ise diş kaybına sebep olabilen geri dönüşümsüz bir hastalıktır. Bu hastalıkların ortaya çıkmasında mikrobiyal dental plağın ana etyolojik faktör olduğu yaklaşık 50 yıldır bilinmektedir.¹⁸⁻²⁰ Bununla birlikte çeşitli sistemik hastalıklar, kötü alışkanlıklar, genetik faktörler ve stres gibi etkenlerin periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesinde risk faktörü olarak rol aldığı düşünülmektedir. Bu risk faktörlerinin bireysel olarak periodontitise yatkınlığı önemli derecede etkilediğini öngören deliller vardır. Ancak gingivitise yatkınlığı gösteren çalışmalar sınırlıdır.²¹

4.1 Plağa bağlı gingivitis

Plağa bağlı gingivitis, dişeti kenarında plak birikimi sonucunda meydana gelen iltihabi bir hastalıktır. Dişeti kenarında plak varlığı, dişetinde renk ve kontur değişimi, dişeti oluşunda ısı değişimi, dişeti iltihabının artması, provakasyonda kanama, ataşman kaybının ve kemik kaybının olmaması, dişetinde histopatolojik değişikliklerin olması ve plağın uzaklaştırılması ile hastalığın geri dönüşümlü olması gibi özelliklere sahiptir.^{2,5,22,23} Bu klinik belirtiler ve semptomların şiddeti, bireyler arasında ve aynı bireyde çeşitli bölgeler arasında değişebilir. Plağa bağlı gingivitisteki histopatolojik değişiklikler; epitel tabakada hücre proliferasyonu, bağlantı epiteline komşu kan damarlarında vaskülit, kollojen tiplerindeki değişikliklerle birlikte kollojen lif ağında yıkım, fibroblastların sitopatolojik değişimi ve ilerleyici iltihabi infiltrattır.²³ İltihabi

dişeti dokusunun gözle değerlendirilen belirtileri bu histopatolojik doku değişiklikleri ile uyumludur.²⁴

Mikrobiyal dental plağın gingivitis sebebi olduğunun 1960'larda Løe ve arkadaşları¹⁹ tarafından kesin olarak doğrulanmasından sonra, gingivitis gelişiminde plağın etyolojik rolü çeşitli araştırmacılar tarafından desteklenmiştir. Mekanik yollarla ya da kimyasal antimikrobiyal ajanların kullanılması ile plağın azaltılması veya ortadan kaldırılması, hastalığın gerilemesine sebep olur.^{5,23,25} Bireyler arasında gingivitise yatkınlığı, plağın birikme oranını etkileyen lokal faktörler ve dental plağın mikrobiyal içeriğindeki farklılıklar da etkiler. Bununla birlikte plağa bağlı gingivitis oluşumunu sistemik pek çok faktör etkileyebilir.^{5,23} Armitage² tarafından 1999 yılında yapılan periodontal hastalıkların en son sınıflandırması, plağa bağlı gingivitisin sistemik faktörler tarafından etkilendiğini göstermektedir. Bu sistemik faktörler; metabolik, genetik, çevresel ve diğer faktörler olarak gruplandırılabilir.⁵ Plağa bağlı gingivitis etkileyen metabolik faktörler arasında hamilelik, puberta, diyabet ve menstruasyon yer alırken, Down Sendromu ve Papillon-Lefevre sendromu en çok incelenen genetik faktörlerdir.²⁶ Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar, spesifik IL-1 genotipinin deneysel gingivitise yatkınlığı artırdığını göstermektedir.²⁷ Sigara kullanımı gingivitis oluşumunu etkileyen ve en iyi bilinen çevresel faktördür. Bununla beraber vitamin C eksikliği gibi beslenme problemleri, antibiyotikler, kalsiyum kanal blokerleri, kortikosteroidler, siklosporin, NSAID'lar ve fenitoin gibi ilaçlar da gingival iltihabi cevabı etkileyebilmektedir.^{5,23} Tüm bunlara ilaveten immün yetersizlik, lösemi, AIDS²⁸ ve fiziksel stress durumları gingivitis oluşumunu etkileyen diğer faktörler olarak gruplandırılabilirler.⁵

4.2 Kronik Periodontitis

Kronik periodontitis; gingivitis ile başlayan ve tedavi edilmediği takdirde hastalığın ilerlemesi sonucu ataşman ve kemik kaybıyla karakterize kronik iltihabi bir hastalıktır.^{1,3,4} Her kronik periodontitisin öncesinde gingivitisin varlığı zorunlu olmakla beraber, her gingivitis vakası uzun yıllar tedavi edilmemiş olsa bile kronik periodontitis ile sonuçlanmaz.

Kronik periodontitis klinik olarak; dişetinde renk değişikliği, stiplinglerin kaybolması, keskin olmayan yuvarlak hatlı dişeti kenarı ile dikkati çeker. Bununla beraber; spontan veya kolayca başlatılabilen dişeti kanaması sıklıkla görülür.^{3,4} Çeşitli derinliklerde ceplere rastlanılır ve hem yatay hem de dikey yönde kemik kaybı gözlenir. Kemik kaybının aşırı olduğu ilerlemiş vakalarda sıklıkla mobilite vardır.^{1,3,4} Kronik periodontitis genellikle ağrısızdır. Bu durum hastaların tedavi ihtiyacı duymalarına büyük bir engel teşkil eder. Bazen açığa çıkmış kök yüzeyinin sığağa veya soğuga karşı hassas olması veya çürük gözlenmesiyle ağrı şikâyetleri olabilir. Lokalize künt ve bazen de çeneye yayılan bir ağrı mevcuttur.^{1,3,4} Dişetinde ödem ve kaşıntı hissi vardır. Akut ağrı periodontal apsenin görülmesi ile ortaya çıkar. Periodontal cep varlığı ve dişeti kenarında kronik iltihabi değişikliklerle karakterizedir. Bu klinik bulgular kemik kaybının varlığı ile orantılı bir şekilde radyografik olarak da tespit edilebilir.^{1,3,4}

Kronik periodontitis, etkilediği bölgenin büyüklüğüne bağlı olarak lokalize ve generalize olmak üzere iki grupta tanımlanır. Etkilenmiş dişlerin sayısı tüm dişlere oranla <30% ise lokalize; >30% ise generalize dir.^{1,3,4} Ancak bazı bölgeler diğer bölgelere nispetle daha fazla etkilenebilir. Örneğin plak kontrolünün güç olduğu bölgelerde hastalığın şiddeti artar. Hastalık genellikle generalize seyirlidir.^{1,3,4} Lokalize ve generalize tipleri kendi içinde üç alt gruba ayrılır; klinik ataşman kaybı 1-2 mm.

arasında ise hafif, 3-4 mm. arasında ise orta, 5 mm'den fazla ise şiddetli olarak isimlendirilir.

Kronik periodontitisin ana etkeninin mikrobial dental plak olduğu bilinmektedir.^{1,3,4,29} Mikrobiyal dental plağın kalitatif ve kantitatif yapısı kötü ağız hijyeni ile yakından ilişkilidir. Bakteriyal virülans faktörler, direkt olarak konak dokularının yıkımına sebep olabildikleri gibi, konak dokudan doku yıkımına sebep olan biyolojik medyatörlerin salınımına da sebep olabilirler. Konak cevabının bir parçası olarak üretilen ve doku yıkımına katkıda bulunan medyatörler; proteinazlar, sitokinler ve prostoglandinlerdir.

Bununla beraber çoğu kronik iltihabi hastalık gibi, bu hastalığında başlaması ve ilerlemesinde lokal nedenler, sistemik nedenler, çevresel nedenler ve genetik nedenler olmak üzere 4 ana faktör rol oynar.^{3,29-32} Lokal faktör olarak bakteri plağı en önemli etken iken; restorasyonlar, dişin anatomik yapısı gibi plak retansiyonunu neden olan lokal etkenler de önem arz eder. Sistemik faktörlerden diabetes üzerinde durulurken, çevresel faktörlerden sigara kullanımına dikkat çekilmiştir. Ayrıca genetik faktörlerin önemi üzerinde de durulmuştur.^{3,29-32}

Kronik periodontitis her yaşta görülebilir ancak; ilk bulguları sıklıkla adolesent çağda gözlenir. Kronik periodontitisin ilerleme hızı oldukça değişkenlik göstermesine rağmen hastalık genellikle yavaş seyirlidir.^{1,3,4} Hastalığın ilerleme hızı ağzın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülebilir. Bazı bölgelerde uzun süre pasif kalırken bazı bölgelerde hızlı bir aktivite gösterebilir. Periodontal hastalığın aktif olarak tespit edildiği bölgelerde; plak birikiminin fazla olduğu ve biriken plağın uzaklaştırılmasının güç olduğu rapor edilmiştir.⁶ Konakçı savunma faktörleri de hastalığın şiddetinde önemli bir rol oynar.^{1,3,4} Dişeti dokusundaki mikroorganizmalar ile konak savunma

mekanizması arasında her zaman bir denge mevcuttur. Bu denge mikroorganizmalar lehine bozulacak olursa, yavaş seyirli olan hastalık şiddetlenerek daha fazla kemik yıkımına ve nihayetinde diş kaybına sebep olur.^{1,3,4}

Kronik periodontitis ve plağa bağlı gingivitis gibi periodonsiyumun iltihabi rahatsızlıklarında gözlenen bir diğer önemli değişim ise biyolojik sıvılarla ilişkilidir. Özellikle oral biyolojik sıvılar olarak bilinen DOS ve tükürüğün miktarı veya içeriğinde önemli değişiklikler meydana geldiği vurgulanmıştır.⁶⁻⁸ Bu nedenle mevcut periodontal durumun tespit edilmesinde DOS ve tükürüğün biyokimyasal analizi faydalı olabilir. Bir başka deyişle DOS ve tükürük gibi biyolojik sıvılarda TNF- α ve NO gibi iltihabi mediatörlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler periodonsiyumdaki iltihabi aktivitenin iyi bir göstergesi olabilir.

4.3 Diş eti oluğu sıvısı (DOS)

DOS; seruma benzer dişetin ekstraselüler sıvısı olup dişetin epitel tabakasını geçerek dişeti oluğundan ağız içine akar. DOS esas olarak mikrovasküler sızıntıdan kaynaklanmaktadır. Sıvıya ayrıca hücreler arası sıvı ve hücrel sitoplazma eklenir. DOS dişeti oluğu bölgesindeki bakteri ve konak hücrelerinin metabolik elementlerini de içerir.⁶⁻¹¹

Genel olarak inanılan görüş DOS'un iltihabi bir sıvı olduğudur.^{9,10} DOS ile ilişkili başlangıçtaki araştırmalar, DOS oluşumunu dişeti oluğu ve bağlantı epitelinin altındaki bağ dokusundaki iltihabi değişikliklerle ilişkilendirmişlerdir.^{13,34,35} Bu değişiklikler aslında kimyasal ve mekanik yollarla oluşan kan damarlarındaki permeabilite artışıdır. Bu erken çalışmalar parenteral sirkülasyona katılan maddelerin DOS'ta yer aldığını göstermişlerdir.^{10,34,35} Daha sonra köpeklerde yapılan deneyler, DOS akışının çiğneme veya diş fırçalama ile uyarıldığını ayrıca intravenöz histamin

enjeksiyonunu ve iltihab gelişimini takiben belirgin derecede arttığını göstermektedir.³⁶ Bu veriler, kimyasal ve mekanik bazı irritasyonların DOS üretimi için gerekli olduğu ve bu nedenle DOS'un patolojik bir fenomen olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna vermektedir. Pashley ve arkadaşları³⁷ ise DOS'un ozmotik meylin bir sonucu olarak dişeti oluşuna aktığı hipotezini savundular. DOS'un içeriğine ilişkin yapılan çalışmalar, bu sıvının içeriğinin dişetinin iltihabı ile değiştiği hipotezini savunmaktadır.^{36,38} Bununla beraber sağlıklı dişeti olduğundan toplanan küçük sıvı hacimleri sağlıklı ekstrasellüler sıvıya benzer bir içeriğe sahiptir. DOS, içerisinde bulundurduğu plazma proteinleri ile diş etinin dişi daha sıkı kavramasına yardımcı olur, diş eti oluşunu yıkayarak temizler ve antibakteriyel bir etkiye sahiptir.⁹ Ayrıca DOS, antibiyotikler gibi sirkülasyonda bulunan maddeleri ve konak kaynaklı antibakteriyel maddeleri dişeti oluşu bölgesine taşır. Tabiki bahsedilen işlevleri içerisinde en önemli olanı DOS'un yıkama fonksiyonudur.⁹

DOS, saatte birkaç mikrolitre gibi küçük bir akış hızına sahiptir. Ağız boşluğuna günde 0,5-2.4 ml DOS akışı olur. DOS epitelyal hücreler arası boşluğa oradan da diş eti oluşuna geçiş yapar.¹⁰ DOS hacminin ve akış oranının ölçümü, kanama ve renk değişimi gibi subjektif ölçümlerden ziyade iltihabın iyi bir erken belirticisi olabilir (Tablo 1). Sağlıklı bir periodonsiyumda DOS ya hiç yok ya da çok azdır. Cimasoni'nin³⁹ 1983 ve Borden ve arkadaşlarının⁴⁰ 1977 yılında yaptıkları çalışmalar, DOS akış oranının iltihabın şiddeti ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir. DOS akış oranı, gingivitis ve periodontitis gibi iltihabi periodontal hastalıklarda, sert gıdaların çiğnenmesi, diş eti masajı, oral kontraseptif ajanların kullanımı, ovulasyon, menstruasyon, hamilelik ve periodontal tedaviler esnasında oluşan travma durumlarında artar.

Tablo 1: DOS periotron değerleri ve gingival inflmasyon derecesi arasındaki ilişki

<u>Periotron değeri</u>	<u>Gingival inflmasyon seviyesi</u>	<u>Gingival indeks</u>
0-20	sağlıklı	0
21-40	hafif	1
41-80	orta	2
81-200	şiddetli	3

DOS'taki bakteriyel ürünler ve konak doku kaynaklı ürünler periodontal hastalıkların teşhis ve patogeneğinde belirti olarak çeşitli çalışmalarda ölçülmüştür. DOS'ta konak doku cevabının göstergesi olan moleküllerin önemli bir kısmı nötrofiller ve monosit/makrofajlardan kaynağını alırlar.⁶ DOS'ta saptanan nötrofil medyatörleri, lökotrien B₄ (LTB₄), platelet aktive edici faktör (PAF), tromboksan B₂, elastaz, kollojenaz ve bir grup antioksidan enzimlerdir.⁴¹⁻⁴³ Ayrıca monosit/makrofajlar, PGE₂, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi iltihabi medyatörleri salgırlarlar.^{44,45} Periodontal bağ dokusunun yıkımının bir göstergesi olarak DOS'ta hidroksprolin ve pridinolin gibi kollojen yıkım ürünleri de bulunur (Tablo 2).⁶

DOS'ta konak doku cevabından kaynaklanan moleküllerin bir kısmının miktarının artışı^{41,42} bir kısmının ise miktarında azalma olması⁴³ periodontal hastalık göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2: DOS'ta saptanabilen moleküller

Enzimler	Lizozim, MMP-8, MMP-2, MMP-9, MMP-13, Nötral proteaz, Dipeptidilpeptidaz, Alkalın fosfataz, Aspartat aminotransferaz, Miyeloperoksidaz, Kreatin kinaz, Laktat dehidrojenaz, Elastaz, β -Glukoronidaz, Katepsin G, D, B, Plazminojen, Gingipain, Süperoxide dismutaz, Glutation peroxidase.
Proteinler	Laktoferrin, Sistatinler, Neopterin, β -NAH, TIMP, osteopontin, kalprotectin, hyaluronik asit, kondroitin sülfat, endotelin, proteoglikan, trombomodulin, transferin, C-reaktif protein, α -2 makroglobülin, α -1 antitripsin, osteocalcin, osteonektin, hyolüronan, fibronektin, ICTP, α -1-EPI, NTx, E-selektin, nörokinin_A, MRP-8, kalsitonin, albümin
İmmünglobülinler	IgA, IgG, IgM, IgE
Sitokinler	VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-2, INF- α , IL-10, RANTES, IL-8, IL-1ra, IL-4, IL-6, TGF- β , HGF, EGF
Diğerleri	PAF, Lökotrien B ₄ , Tromboksan B ₂ , Hidroksiprolin, Lİpoksin A, Keratin, Substans P, PGE ₂ , Glukoz, ICAM-1, Metilglioksal, Laktik asit, Propiyonik asit, Butirik asit, Filloquinin, Volatile sülfür bileşikleri, Glutasyon, Hidroksisilpridinolin

DOS'un toplanmasında, yapılan çalışmanın hedefine bağlı olarak çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Çünkü her bir tekniğin kendisine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Bu tekniklerin de farklı araştırmacılar tarafından uygulanan çeşitli modifikasyonları söz konusudur.¹⁰ Bu teknikler;

- Gingival yıkama metodu
- Kapiller tüpler veya mikropipetler ile toplama
- Emici kağıt şeritler
- Dişin etrafına oluk içine yerleştirilen iplikler

Filtre kâğıt şeritlerle sıvının toplanması da metod olarak ikiye ayrılır;

- İntrakrevikular teknik: Kağıt şerit dişeti oluğu içerisine sığ ve derin olarak iki şekilde yerleştirilebilir. Bu teknik daha sık kullanılır.

- Ekstrakrevikular teknik: Travmayı en aza indirmek için kağıt şerit dişeti oluşu üzerinde seyrederek.

4.4 Tükürük

Tükürük, büyük ve küçük tükürük bezlerinin salgıları, gingival sıvı, serum, kan hücreleri, bakteri ve bakteri ürünleri, soyulmuş epitel hücreleri, virus, mantar, gıda ve bronşial sekresyon artıklarını içeren karma bir sıvıdır. Renksiz, kokusuz, tatsız, hafif bulanık ve az kıvamlı olup özellikleri aşağıdaki gibidir:

Özgül ağırlık	:1.002- 1.008
PH	: 5.75-7.05
Donma Noktası	: -0.2-0.4 santigrad derece
Günlük üretim	:1000-1500 ml
Su	: 994 g/l
Organik maddeler	: 2-5 g/l
İnorganik maddeler	: 2 g/l
Osmolitesi	: 50-300 osm/L arasında değişmektedir.

Tükürük bezleri, büyük ve küçük; salgı sistemlerine göre basit ve karma; salgıların yapısına göre seröz, müköz ve karışık; olarak sınıflandırılır. Seröz bezler ince, enzimden zengin, sulu salgı; müköz bezler ise viskoz, yapışkan bir salgı üretmektedirler. Karışık bezler, müközden seröze değişen hücrelerin oranına bağlı olarak inceden kalına değişen bir tükürük üretirler. Büyük tükürük bezleri; parotis, submandibular ve sublingal bezlerdir. Parotis bezi seröz salgı üretip bu salgıyı stemon kanalı ile ağız içine boşaltır. Submandibular bezler hem seröz hem de müköz salgı üretirler. Salgısı parotis bezinden daha viskozdur, Warton kanalı ile ağız içine açılır. Sublingual bezin salgısı submandibular bezin salgısından daha koyu olup, bu salgı "Rivinus kanalları" olarak isimlendirilen 8-10 kanal aracılığı ile ağız boşluğuna akar. Küçük tükürük bezleri ise tükürüğün %10'unu üretirler. Sert damağın ön kısmı ve dişeti hariç ağız mukozasının her yerinde bulunurlar. Müköz ve immünglobülinden zengin

tükrük üretirler. Tükrük bezleri otonom sinir sisteminin kontrolü altında olup, tükrük salgısı hem sempatik hem de parasempatik sistemin uyarılması ile meydana gelir.

Tükrük içeriğini tükrüğün akış hızı etkiler. Akış hızının artması protein, sodyum, klorid ve bikarbonat seviyelerini artırırken magnezyum ve fosfat seviyelerini düşürür. Tükrüğün akış hızı paratiroidizm, diş çıkarma, gastrik salgılamının artması, mental reterdasyon, familial otonomik disfonksiyon durumlarında artar. Diabet, alkolizm, malnutrisyon, akut supuratif parotitis ve tükrük bezi taşları tükrük akışını artırır. Tükrük temizleme, remineralizasyon, gıdaların yutmaya hazırlanması, tat alma, konuşma fonksiyonu, tamponlama fonksiyonu gibi fonksiyonlara sahiptir (Tablo 3).

Tablo 3: Tükrüğün ağızın sert ve yumuşak dokuları üzerine etkileri:

Kayganlaştırma	Musin, prolin, su
Antimikrobiyal	Proteinler; lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz, musin, cytatin, histatin, sekretuar IgA, tiosiyanat, hipotiyosiyanat, peroksidaz
Lavaj- temizlik	Su
Tamponlama	Bikarbonat ve fosfat iyonları, üre, protein
Remineralizasyon	Kalsiyum, fosfat, anyonik prolin rich protein
Gıdanın hazırlanması	Su, musin
Sindirim	Amilaz, lipaz, ribonükleaz, proteaz
Tat alma	Su, gustin
Konuşma	Su, musin

Tükrük periodontal açıdan önemli bir sıvıdır. Ağız içerisini yıkar ve oral mukozayı sararak dış etkenlerden korur. Ağız kuruluğu olan bireylerde ve ağız solunumu yapan bireylerde tükrüğün koruyucu etkisi azalmıştır. Bu nedenle bu bireylerde diş çürüklerine ve periodontal hastalıklara meyil artmıştır. Ayrıca birçok ağız hastalıklarının ve periodontal hastalıkların teşhisinde tükrüğün içeriğindeki moleküller hastalık göstergesi olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılan tükrük molekülleri:

Enzimler	Proteinler	İmmünglobülinler	Diğerleri
Elastaz Amilaz Dipeptidilpeptidaz Alanin aminopeptidaz Arginaz B- Glukoronidaz Myeloperoksidaz Lizozim MMP-1 MMP-8 Chitinaz Katepsin G	Laktoferrin TIMP VEGF HGF Fibronektin Albümin Cystatins C,S,A,SN Neopterin α -2-makroglobülin α -1-antitripsin Keratin C-reaktif protein Komplement C3 IL-6 EGF	IgA IgG IgM	PAF 8-OHdG Üre Askorbat Kortizol Nitrit Hyaluronik asit Kondroitin sülfat

4.5 Reaktif oksijen türleri (ROS)

İnsan periodontal hastalıkları, patojenik bakteriler ve konak doku cevabı arasındaki karmaşık etkileşimin bir sonucu olarak dişin destek dokularında hasar ile ortaya çıkan iltihabi bozukluklardır. İltihabi periodontal hastalıklar esnasında patojenik mikroorganizmalara karşı konak cevabının asıl medyatörlerinin PNL'ler olduğuna dair çeşitli deliller mevcuttur. Son zamanlarda yaygın olan görüş, İltihabi periodontal

hastalıklar esnasında PNL'lerin reaktif oksijen türlerinde (ROS) yer aldığı bir grup antibakteriyel faktör ürettiğini göstermektedirler. Bakteriyal faktörleri elimine etmek için doku içerisinde ROS'un aşırı üretimi konak dokuyada zarar vermektedir. ROS'un neden olduğu doku yıkımı; DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, protein hasarı, anti-proteaz gibi önemli enzimlerin oksidasyonu ve monosit ve makrofajlardan pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını gibi mekanizmalar yoluyla gerçekleşir.⁴⁶ ROS türleri moleküler oksijenden derive olan bir grup kimyasal reaktif moleküldür. Oksidatif hasara yol açan ROS'lar, serbest oksijen radikalleri ve non-radikaller olarak ikiye ayrılırlar. Serbest radikal bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip bağımsız olarak bulunabilen moleküldür. Dokulardaki inflamatuvar yaralanmalarda rol oynayan en önemli ROS'lar; süperoksit radikal (O_2^-), hidroksil radikal (OH^\cdot), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorit (HOCl) ve singlet oksijendir.⁴⁷

ROS türleri oldukça kısa yarılanma ömürlerine sahip olmalarına rağmen serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatarak doku hasarına sebep olabilirler. Bu yüzden vücut bir grup koruyucu antioksidan mekanizma içerir.^{46,48} Bu mekanizmalar oksidanların veya ROS türlerinin zararlı etkilerini uzaklaştırırlar ve ROS türlerinin canlıda sebep olduğu hasarı tamir ederler. Başlıca antioksidanlar; Tokopherols (vitamin E), askorbik asit (vitamin C), carotenoids (vitamin A), ürik asit, ubiquinone, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve sisteindir.

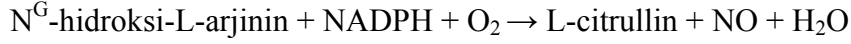
Reaktif türlerin periodontal hastalık patogenezindeki rolünü tam olarak saptamak için periodontal hastalık bulunan bölgelerden alınan doku örneklerinde, tükürkte ve DOS'ta oksidasyon ürünlerinin daha detaylı analizi yapılmalıdır. Son zamanlarda ROS türlerinden NO'nun periodontal hastalıklı bireylerin tükürük ve dişeti dokusu örneklerinde yapılan analizler önemli sonuçlar vermiştir.

4.6 Nitrik Oksit (NO)

Önceleri toksik ve kirletici bir gaz olarak görülen nitrik oksit (NO), pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte anahtar rol oynayan kısa ömürlü bir moleküldür.^{12,47,49-52} 1772’de Joseph Priestley bu gaza “nitrous air” ismini verdi. NO, 1980’lerin başlarında bakterisidal bir ajan olarak değerlendirildi. 1987’de ise endotelial derived relaxing faktörün (EDRF) işlevlerinden sorumlu bir kimyasal olduğu keşfedildi.^{12,49} Bu bulguyu takiben NO ile ilgili çalışmalar arttı. Başlangıç raporları NO’nun vasküler tonusu düzenlemedeki rolü üzerine yoğunlaşmasına rağmen, çok geniş fizyolojik ve patolojik işlevleri olduğu daha sonraları açığa çıkarılmıştır. Serbest haldeki NO, eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikaldir ve ROS türlerinin pek çok özelliklerine sahiptir.^{47,52,53} Bu yüzden çeşitli hücresel reaksiyonları ve biyolojik fonksiyonları etkileyebilir.^{52,53} NO, dokuların genel patofizyolojisinde hem yararlı hem de zararlı etkilere sahiptir⁴⁷. NO, konak savunması ve homeostazisteki faydalarının yanında, pek çok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogeneğinde zararlı yönde rol almaktadır.^{12,49-53} NO serbest gaz olması sebebiyle, hücreler arasında, hücre içinde ve hücre membranları boyunca hareket edebilir ve böylece hücreler arası etkileşimde rol alır⁴⁷. Bununla beraber diğer hücre içi mesajıcılardan farklı olarak NO, reseptörlere bağlanmaz, yarılanma ömrü saniyelerle sınırlıdır, etkileri lokal ve geçicidir.^{12,49,51-55} NO’nun zararlı etkilerinin kalıcı ve uzun süreli olabilmesi için diğer reaktif türlerle etkileşip yeni bir reaktif tür oluşturması gerekir⁴⁷.

NO memeli hücrelerinde bir aminoasit olan arjininin oksidasyonu ile şekillenir.^{12,49-56} NO formasyonu, L-arjinin ve oksijen atomlarının terminal guanidino nitrojen atomlarından birininin bir grup enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-citrullin ve NO’ya okside edilmesiyle gerçekleşir. Gereken elektronlar flavin adenin

dinükleotid ve flavin mononükleotid içeren NADPH'dan derive edilir ve bir ko-faktör olarak tetrahidrobiopterin (T₄BPT) varlığını da gerektirir.⁵³



Her biri farklı genlerde üretilen ve keşfedilme sıralarına göre adlandırılan 3 ayrı NOS izoformu vardır. İzoformlardan ikisi yapıcı, diğeri ise indüklenebilir bir enzimdir. İndüklenebilen izoform(iNOS) kalmoduline sıkı bir şekilde bağlanır ve protein salınımı ile düzenlenir. Yapıcı izoformlar orijinal olarak endotel hücreleri (ecNOS) ve nöronlarda (ncNOS) lokalize olurlar ve aktiviteleri kalmodulin aracılığı ile etkilenen artan hücre içi kalsiyum seviyesine bağlıdır. iNOS, sitokinlerce aktive edilen makrofajlar ve diğer pek çok hücre tarafından üretilen, kalsiyumdan bağımsız, sitosolik bir enzimdir.^{12,49-51} iNOS, üretimi için hem mRNA hem de protein sentezi gerektiren transkripsiyonal kontrol altındadır. Negatif feed-back mekanizması ile işleyen NOS aktivitesi ekzojen NO ile inhibe edilir.⁵⁷ Hücre tipine spesifiklik gerektirmeyen kompleks ve üst üste NOS izoformları salgılanması sebebi ile, hücre orjinini spesifikleştirmeyen ve farklılaşan NOS genlerinin miktarını dikkate alan sayısal bir NOS sınıflandırması önerilmektedir.⁵³ Bu sayısal sınıflamada ncNOS → Tip I NOS'u, iNOS→ Tip II NOS'u ve ecNOS→ Tip III NOS'u ifade etmektedir (Tablo 5).

Son zamanlarda NO üretiminin yeni bir nonenzimatik yolu, inorganik nitritin kimyasal redüksiyonunu şeklinde tanımlanmaktadır. Bu yol, başta gastrointestinal sistem olmak üzere çeşitli sistemlerde gösterilmektedir. Oral bakteriler, diyetle alınan nitratı nitrik okside daha fazla dönüşen nitrite indirgerler. Yutulan tükürük nitritinin midede asitlenmesi antimikrobiyal özelliklere sahip NO meydana getirir. Bu şekildeki

konak ve bakteri arası etkileşim ağız ve bağırsakta patojenlere karşı konak savunmasına katkıda bulunabilir.⁵³

Tablo 5: Nitrik oksit sentaz izoformlarının özetlenmesi

İzoform	Aktivite	İlk tanımlandığı hücre	Yerleşim	Üretilen NO kons.
Tip I NOS	Ca ²⁺ bağımlı	Nöronlar	Genellikle membrana bağlanır	Pikomolar
Tip II NOS	Ca ²⁺ Bağımsız	Makrofaj/Monositler	Sitozol	Nanomolar
Tip III NOS	Ca ²⁺ bağımlı	Endotelyal	Genellikle membrana bağlanır	Pikomolar

Tablo 6: Nitrik oksit sentaz izoformlarının düzenlenmesi

NOS II Upregülasyonu	NOS II Downregülasyonu	Bulunduğu Hücreler
IL-1, IFN- γ , TNF- α , Granülosit/makrofaj stimüle edici faktör, LPS, sinerjik cevap-LPS/ IFN- γ	Glukokortikoidler, TGF- β , NO, IL-10, IL-4	Makrofajlar, Hepatositler, Kondrositler, Endotelyal, Fibroblastlar, Osteoblastlar, Osteoklastlar, Keratinositler

NOS-II, çeşitli immünolojik stimuluslarla uyarılan pek çok hücre tipi tarafından üretilir.(Tablo 6) Yapıcı NOS izoformlarının(NOS-I ve NOS-III) arttığı dokular hızlı, geçici ve pikomolar konsantrasyonlarda küçük miktarlarda NO üretirler.^{53,58} NOS-II, bir kez indüklendiğinde uzun zaman periyodunda daha fazla miktarda ve sitotoksik NO üretmesi ile yapıcı izoformlardan ayrılır. Yüksek NO seviyesinin sitotoksik potansiyeli bir cevap elde etmek yani NOS-II gen ekspresyonu sağlamak için primer ve uyarıcı olan INF- γ , IL-1 TNF- α ve LPS ile sıkı bir şekilde kontrol edilir.⁵³

Farklı dokulardaki hücreler, çeşitli antioksidanların varlığı ile ilişkili olarak NO'ya farklı cevaplar gösterebilirler. Ayrıca, farklı hücre tiplerinin NO üretme veya NO'ya karşı koyma potansiyelleri hücrenin türüne, sitokin/growth faktör ve NO miktarına, diferansiyasyon derecesine ve hedef hücrenin hassasiyetine veya rezistansına bağlı olarak değişir.⁵³

NO için baskın olan hücre içi hedefler; metal ve thiol içeren proteinler, demir-sülfür kompleksleri, oksijen ve diğer serbest radikallerdir.^{12,49-51} Bazal şartlar altında düşük NO seviyeleri vasokonstriksiyona olanak veren vasküler bir tonus sağlayacak şekilde sürekli salınır. Hücre içi hedefler, plazma membran transportu ve uyarıcı proteinler, mitokondri ve hücre çekirdeğidir. DNA'da meydana gelen NO'ya bağlı hasarlar; DNA sarmalında kopmalar, aminoasit değişimi ve ribo nükleotid redüktazın inhibisyonudur. NO'ya bağlı olarak meydana gelen ciddi DNA hasarı, apoptozis ve nekroz yolu ile hücre ölümünü de tetikleyebilir. NO'nun aşırı üretimine bağlı meydana gelen apoptotik hücre ölümünün insan kondrositlerinde, β -islet hücrelerinde ve periodontal ceplerin apikalindeki keratinositlerde görüldüğü rapor edilmiştir.^{51,53}

NO reaksiyonları, pek çok biyomolekülün oksidasyonu, nitrasyonu (NO_2 ilavesi), nitrozasyonu (NO^+ ilavesi) ve nitrosilasyonuna (NO) yol açar.^{51,53} En önemli NO etkileşimleri, moleküler oksijen, süperoksit radikal (O_2^-) ve genel olarak proteine bağlanan demir, bakır ve magnezyum gibi metallerelemdir. NO, bu metalloproteinleri aktif hale getirebilir veya aktif alanlarda metal bağlayarak aktivasyonlarını engelleyebilir.⁵³ Ortamda demir (Fe) bulunmadığı durumlarda NO ve süperoksit radikal (O_2^-) reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluştururlar.^{51,53} Bununla beraber, NO ve süperoksit radikalden herhangi birinin aşırı üretimi bu reaksiyonu inhibe eder. Moleküler seviyede

peroksinitrit en tehlikeli reaktif moleküldür.^{47,53} Bu nedenle araştırmacılar peroksinitritin NO'dan daha zararlı olduğunu öngörmektedirler.⁴⁷

Diğer yandan oksijen mevcudiyetinde NO stabil değildir. NO ve oksijen molekülleri arasındaki etkileşim, nitrojen dioksit, dinitrojen trioksit ve dinitrojen tetraoksit gibi reaktif nitrik oksit türlerinin oluşmasına yol açar;⁵¹



NO etkileşimlerinin toksizite ile sonuşlanıp sonuşlanmaması hücrelerin iç çevrelerine ve üretilen NO konsantrasyonlarına bağlıdır.^{12,51,53}

Periodontitiste yer alan doku yıkım medyatörleri, IL-1 β , TNF- α ve PGE₂'dir.⁷⁶ Proinflamatuvar medyatörlerin uzun süreli üretimi NO üretiminde artmaya ve doku katabolizması için önemli olan PGE₂ senteziyle sonuçlanan COX-II stimülasyonuna yol açabilir.^{12,47}

İltihabi cevap büyük oranda kendi kendini sınırlar. Bununla beraber, periodontal hastalıklarda olduğu gibi kronik iltihabın gelişimi doku yıkımına katkıda bulunan başka faktörleri devreye sokar.⁵⁹ Yumuşak doku yıkımının esas olarak plazmin ve matriks mettalloproteinazlar (MMPs) tarafından oluşturulduğu bilinmektedir. ROS türlerinin ise bu doku yıkımına ekstraselüler matriks komponentlerinin depolarizasyonu, lipid peroksidasyonu, antiproteaz gibi enzimlerin oksidasyonu, DNA hasarı ve proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu gibi mekanizmalarla sebep olduğu belirtilmektedir.^{47,53}

Fibroblastlar, bağ dokusu turn-overında ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynarlar. NO, genellikle antiproliferatif etki gösterir. Düşük NO seviyeleri kollojen

sentezi için gerekli olurken daha yüksek NO seviyeleri kollojen sentezini baskılar. NO fibroblast proliferasyonunu artırırken, NOS-II induksiyonu fibroblast proliferasyonunu inhibe eder ve apoptozis oluşturabilir. Dişeti fibroblastlarında yüksek miktarda NOS-II üretimi, iyileşme cevabında azalma ile sonuçlanabilir ve periodontitis için karakteristik olacak şekilde doku yıkımı/doku tamiri oranında yıkım lehine katkıda bulunabilir.⁵³ Bu bulgular hücre-hücre, hücre-matriks ve biyomoleküller arasındaki karmaşık etkileşime dikkat çeker. Homeostazis, hücre ölümü ve hücre büyümesi arasındaki denge ile sağlanır ve NO, sitostazis ve apoptozis oluşturabilir.⁵¹ Böylece yaralanma ve iltihap esnasında olduğu gibi, interselüler çevredeki değişikliklerin NO seviyesinde değişikliklere sebep olması ve kalıcı fibroblastlarda NOS üretimini artırması olasıdır. Fibroblastlarca salgılanan NOS-II'nin önemi henüz yeterince açık değildir. Bu sebeple NO'nun bir doku yıkım medyatörü olduğuna dair deliller tartışmalıdır ve sitostatik/immünosupresif etkilerinden dolayı bazı durumlarda inflamasyona cevabın bozulmasında rol oynayabilir. Henüz direkt olarak doku katabolizmasından sorumlu tutulmamaktadır. NO'nun en net etkisi güçlü bir kemotaktik etkiye sahip olan TNF- α ile karşılıklı pozitif etkileşimidir. NO, iltihabi cevabın artmasında ve savunma hücrelerinin toplanmasında aracı olan moleküldür.⁵³

4.7 Periodontal Hastalık ve Nitrik Oksit

Günümüze kadar yapılan çalışmalar NO'nun periodontal hastalık, odontojenik kistler, periapikal infeksiyon, oral mukozal iltihabi hastalıklar, tükürük bezi hastalıkları ve oral karsinogenezis ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.⁴⁹ Bu güne kadar NO'nun periodontal hastalık ve sağlıktaki rolü net olarak açıklanmamıştır. Mevcut verilerden elde edilen bilgilere göre, NO, nörotransmizyon, vazodilatasyon, sitotoksizite ve immünregülasyon gibi periodontal hastalık patogenezi ile ilişkili pek çok biyolojik

fonksiyon için önemli bir moleküldür.^{53,60} NO direkt veya indirekt yoldan bazı proinflamatuvar sitokinlerin üretimlerini etkileyerek hem periodontitis hem de alveoler kemik kaybı patogeneğinde rol oynayabilir.⁴⁹ Periodontal lezyonlarda sitokin ve LPS indüksiyonunu takiben fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler ve PMNL'ler tarafından uzun süreli olarak yüksek miktarlarda NO üretilebilir. Akapov ve Kankanian⁶¹, periodontal açıdan sağlıklı bireylerin tükürüklerinin PMNL'lerde NO sentezini stimüle ederken gingivitisli ve periodontitisli hastaların tükürüklerinin PMNL'lerde NO sentezini uyardıklarını hatta baskıladıklarını rapor etmişlerdir. Diğer yandan NO üretiminin enflame periodontal dokularda arttığı da rapor edilmektedir.⁶² Bakteri plağı NOSII aktivasyonundan sorumlu olabilir, çünkü steril hayvanların diş eti dokularında herhangi bir NOSII aktivitesine rastlanmamıştır.⁶³ Daghigh ve arkadaşları⁶⁴, diş eti fibroblastlarının kronik periodontitiste sağlıklı diş eti dokularından önemli derecede daha fazla NOSII salınımı oluşturduklarını göstermişlerdir. Son zamanlarda yapılan in vitro bir çalışmada NOSII inhibitörlerinin diş eti fibroblastlarının NO üretimini azalttığı bulundu ve bu hastalığın tedavisinde NO'nun farmakolojik olarak inhibisyonunun terapötik açıdan değerli olabileceği öne sürüldü.⁵³

4.8 Sitokinler

Sitokinler, hücreden hücreye haberciler veya lokal hormonlar olarak tanımlanmaktadır.⁶⁵ Tüm sitokinler bir hücre tipi tarafından salınan ve üretilen küçük peptitler veya proteinlerdir. Bunlar başka bir hücre membranında yer alan spesifik reseptörlere bağlanabilirler.⁶⁵ Periodontitis, spesifik bakteriler tarafından başlatılır ve bu bakterilere karşı lokal konak cevabı lökosit toplanmasını ve sonrasında IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve TNF- α gibi sitokinlerin ve iltihabi medyatörlerin salınımını içerir.⁶⁶ Bu iltihabi medyatörler ve sitokinler periodontal hastalık patogeneğinde önemli roller

oyunlar. Sitokinler pek çok fizyolojik olayda önemli roller üstlenmelerine rağmen uygunsuz olarak salgılandıklarında patoloji oluşumuna da aracılık edebilirler.¹⁵ Hücre ölümüne sebebiyet verme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle sitokin aktivitesi çok dikkatli bir şekilde düzenlenir. Bu sitokinler için bir grup negatif düzenleyici mevcuttur. Bunlar; IL-4 ve IL-10 gibi anti iltihabi sitokinler, IL-1 reseptör antagonisti gibi inhibitörler, soluble IL-1 ve TNF reseptörleridir.⁶⁷ Periodontal hastalık esnasında olduğu gibi patolojik şartlar altında pro- ve anti-iltihab arasındaki denge proiltihabi aktivite lehinde değişir. Sitokinlerin en iyi bilinen örneği lökositler arasında mesaj taşıyan interlökinlerdir (IL). IL-1 ve TNF- α aktif makrofajlarda ve diğer hücrelerde üretilirler ve periodontal patolojide proiltihabi etkileri ile yer alırlar. Bu durum PGE₂'nin uyarılmasını ve kollojenaz üretimini kapsar. Bu sitokinler için monoklonal antikorlar üretilmiş olması sebebi ile ELISA yöntemi ile ölçülebilirler ve böylece klinik test sistemlerinde kullanılabilirler.⁶⁵

4.9 TNF- α

TNF, periodontal hastalık esnasında meydana gelen olayların bir kısmına aracılık eden bir sitokindir. TNF moleküler ağırlığı yaklaşık 17,000 kDa/monomer olan trimerik bir proteindir.⁶⁸ TNF indüksiyonu, kemotaktik sitokinler olarak rol oynayan kemokinler ve prostoglandinleri üreten siklooksijenazlar gibi sekonder medyatörlerin üretimini uyarır.^{14,69}

TNF'nin TNF- α ve lenfotoksin-alfa olarak da bilinen TNF- β olmak üzere iki farklı tipi vardır. Hücre yüzeyi yapısı açısından birbirine benzeyen iki farklı TNF reseptörü vardır: TNF reseptör-1 ve TNF reseptör-2. Bu reseptörler farklı sitoplazmik kısımlara sahiptirler ve bunun sonucu olarak farklı uyarılarla aktif hale gelirler.

Deneysel kanıtlar, TNF'in mikrobiyal patojenlere karşı dirençte rol oynadığını göstermiştir.⁶⁹

TNF- α , makrofajlar ve monositler tarafından üretilen ve “cachectine” olarak da bilinen bir polipeptid sitokindir. TNF- α , çeşitli hücre populasyonları üzerinde bir grup iltihabi ve immün düzenleyici etki gösterir.¹⁵ Periodonsiyumda birçok kaynaktan üretilen TNF- α , dişeti fibroblastlarını da içerecek şekilde fibroblastları uyararak periodontal hastalıklarda doku yıkımından sorumlu bir enzim olan kolojenaz üretimini ve kemik rezorpsiyonunu stimüle eder (Tablo 7).⁷⁰ TNF- α monositleri aktif hale getirir, platelet aktive edici faktörün ve IL-1 β 'nin üretimini stimüle eder.⁷¹

İmmün cevapta multipotent bir düzenleyici olarak rol oynar ve ayrıca potent bir piyrogen olarak işlev görür. TNF- α , iltihabi ajanlar ve doku yaralanmaları gibi uyarılara cevap vererek, nötrofilleri aktive ederek, vasküler endotelial hücrelerin özelliklerini değiştirerek ve lokal kan pıhtılaşması oluşturarak tümörisidal aktiviteyi artırdığı gibi, diğer hücrelerin metabolik aktivitelerini de düzenleyerek tüm vücutta dolaşır. TNF- α ayrıca kaşeksi (cachexia) ile sonuçlanan lipoprotein lipaz aktivitesini de inhibe eder. İmmün sistemdeki çeşitli işlevlerinden dolayı TNF- α pek çok hastalığın patogenezinde rol alabilir. TNF- α , eklemlerin ve diğer dokuların iltihabi hastalıklarının patogenezinde de önemli roller oynayabilir.⁷²

Tablo 7: Periodontal hastalıklarda hüresel TNF kaynakları

Monosit/ makrofajlar
Polimorfonükleer lökositler
Fibroblastlar(gingival ve periodontal ligament)
Epitelial hücreler
Endotelial hücreler
Osteoblastlar

Daha öncede bahsedildiği gibi periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılan klinik ölçümler hastalığın şiddeti hakkında bilgi verirken hastalığın aktivasyonunun belirlenmesinde kullanılamazlar.⁶ Periodontal hastalık aktivasyonunun belirlenebilmesi için konak doku cevabının analiz edilmesi gereklidir.⁶ Birçok çalışmada diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürüğün biyokimyasal ve immünolojik analizlerinin periodontal hastalık aktivasyonunun saptanmasında faydalı olabileceği vurgulanmıştır.⁶⁻⁸

Periodontal olarak sağlıklı ve hastalıklı bireylerin DOS ve tükürük örneklerinde biyokimyasal ve immünolojik analizler sonucu bazı iltihabi mediatörlerin, enzimlerin ve reaktif radikallerin seviye ve/veya miktarlarında değişimler olduğu bildirilmiştir.⁶⁻⁸ Periodontal hastalıklı bireylerin tükürük, bakteri plağı ve dişeti dokusu örneklerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda NO seviyeleri saptanmış ve NO'in TNF- α gibi iltihabi sitokinlerle ilişkisi belirtilmiştir.^{12,13} Bu çalışmalarda benzer çalışmaların DOS örneklerinde yapılması tavsiye edilmiş olmasına rağmen literatürde yapılmış bir çalışmaya rastlanamadı. Bu nedenle, çalışmamızın amacını; periodontal açıdan sağlıklı, plağa bağlı gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylerin DOS ve tükürük örneklerinde NO ve TNF- α seviyelerinin saptanması ve periodontal hastalıkların klinik parametreleri ile olası ilişkilerinin araştırılması oluşturdu.

MATERYAL VE METOD

Çalışmaya, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine farklı nedenlerden dolayı müracaat eden toplam 55 birey dâhil edildi. Çalışmanın protokolü gereği bireyler 3 gruba ayrıldı. Periodontal olarak sağlıklı 15 birey kontrol grubunu (I.Grup), plağa bağlı gingivitisli 20 hasta (II.Grup) ve kronik periodontitisli 20 hasta (III.Grup) çalışma gruplarını oluşturdu. Çalışmamıza dâhil edilen tüm bireylere çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verildi ve imzalı onayları alındı. Çalışma populasyonunun seçimi aşağıdaki kriterlere göre yapıldı:

- 1) Hastaların herhangi sistemik bir rahatsızlığının bulunmaması,
- 2) Hastaların sürekli antikonvülsan, immünsupressif, kalsiyum kanal blokerleri gibi ilaçlar kullanıyor olmaması,
- 3) Hastaların son altı ay içinde periodontal tedavi görmemiş olması,
- 4) Hastaların herhangi bir madde bağımlısı olmaması ve sigara içmemesi,
- 5) Hastaların hamile olmaması,
- 7- Hastaların akut ağrısı (pulpitis ve apikal apse) olmaması.

Araştırma kapsamına alınan hastaların ilk önce klinik ve radyografik değerlendirmeleri yapıldı. Her bir bireyin periodontal durumunu saptamak amacıyla Silness ve Loe'nin plak indeksi (Pİ) ve Loe ve Silness'in gingival indeksi (Gİ) kullanıldı. Ayrıca klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalama derinliklerine (SD) bakıldı. Tüm ölçümler hazırlanan anemnez formuna kaydedildi (Ekler). Pİ, Gİ, KAS ve SD ortalamaları için önce her bir dişin dört yüzeyinden elde edilen değerler toplanıp ortalamaları alınarak bir dişin ortalaması; daha sonra bu değerler toplanıp ortalamaları

alınarak da bireyin Pİ, Gİ, KAS ve SD ortalaması elde edildi. Klinik indeks skorları aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

Plak İndeksi Skorları: (Silness ve Loe 1964)⁷³

0: Dişeti bölgesinde bakteri plağı yok.

1: Çıplak gözle fark edilemeyen, ancak sond ucunun gingival sulkusta gezdirilmesiyle açığa çıkarılan plak varlığı.

2: Gözle görülür tarzda dişeti kenarında ve diş yüzeyinde orta dereceli plak varlığı.

3: Dişetinde ve diş yüzeyinde yoğun yumuşak birikintilerin mevcudiyeti.

Gingival İndeks Skorları: (Loe ve Silness 1963)⁷⁴

0: Sağlıklı dişeti.

1: Hafif iltihap, hafif renk değişikliği, hafif ödemle karakterize dişeti, sondalamada kanama yok.

2: Orta dereceli iltihap, dişeti parlak, kırmızı ve ödemlidir. Sondalamada kanama vardır.

3: Şiddetli iltihap, belirgin kırmızılık ve ödem vardır. Ülserasyonlar ve spontan kanamaya meyil mevcuttur.

Tüm klinik ölçümler, her bir dişin mezial, distal, lingual (palatinal) ve labial (bukkal) olmak üzere 4 yüzeyinden elde edildi. Ölçümlerde Williams'ın periodontal sondu kullanıldı. Ayrıca tüm hastaların ağızlarında mevcut olan dolgu, çürük, kuron, protezler ve eksik dişler anamnez formuna kaydedildi. Tüm hastalardan ortopantomografik radyogramlar alındı.

Diş Eti Oluğu Sıvısının Örneklenmesi

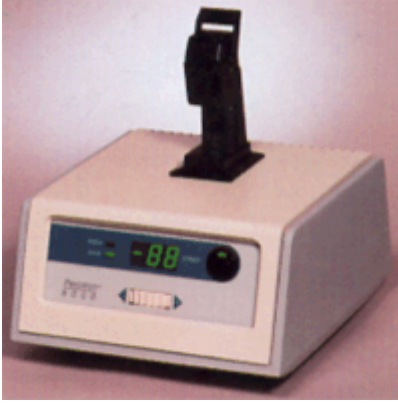
Diş eti oluğu sıvısı her bir hasta için daha önceden belirlenmiş dört farklı bölgeden alındı. Adult periodontitis grubunda (III.Grup) ise örnekleme yapılacak olan bölge yıkım ve iltihabın derecesine göre rastgele seçildi. Her bir diş bölgesi irritasyon

meydana getirmeden hava spreyi ile kurutuldu ve pamuk tamponlarla dikkatli bir şekilde izole edildi. Örneklerin tükürük ile kontaminasyonundan kaçınmak için tükürük emici kullanıldı. Standart kâğıt şerit (Periopaper®) sulkusun mezial ve distal orta noktalarına orta derecede direnç hissedilinceye kadar yerleştirildi. Her bir kağıt şerit sulkusta 30 saniye tutulduktan sonra toplanan DOS hacminin hesaplanması için zaman kaybetmeden daha önceden hacmi bilinen saf su ile kalibre edilmiş Periotron 8000®'e aktarıldı. 16 saniye içerisinde periotron değerleri okundu. Her bir hastadan 4 numune alındı. Her hasta için önceden numaralandırılmış 200 µl pH: 7.4 PBS içeren iki adet 2 ml'lik eppendorf tüp kullanıldı. İlk iki numune NO değerlendirilmesi yapılacak olan 1. tüpe, diğer iki numune ise TNF- α değerlendirmesi için kullanılacak olan 2. tüpe yerleştirildi. Oda sıcaklığında 30 saniye vortekslenildi ve hücresel elemanları ve plağı uzaklaştırmak için 5000 rpm de 10 dakika santrifüje edildi. Örnekler değerlendirilinceye kadar -80 °C de saklandı.

Periotron 8000®

Periotron kapasitör prensibine göre çalışır. Aletin parçaları arasına yerleştirilen ıslak bir filtre kâğıdı bandının elektriksel kapasitansını ölçer. Parçalar arasında karşıt yüklerin oluşturduğu elektrik alanı, parçalar arasındaki potansiyel farkını azaltan ve kapasitansını artıran molaküllerin polaritesini indükler. Böylece periotronun parçaları arasındaki polar moleküllerin sayısı ne kadar fazla ise kapasitansı da o kadar büyük ve periotron skoru da o kadar yüksek olur. Yeni bir model olan Periotron 8000'de ölçüm değerleri PERİO.EXE programı çalıştıran bilgisayara bir seri bağlantı sonucunda gönderilir. Ayrıca okunan periotron değerlerini mikrolitreye çeviren ML CONVRT. EXE isimli program da kullanımdadır.⁷⁵

Resim 1: Periotron 8000 Cihazı



Resim 2: Standart periopaper



Periotronun kalibrasyonu

Periotrondan okunan ham değerlerin bilgisayara daha önceden yüklenmiş olan ML CONVRT. EXE programı aracılığı ile hacimsel değeri olan μl 'ye dönüştürülmesi için kalibrasyon eğrisinin oluşturulması gereklidir. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturulması esnasında Hamillton şırıngasına çekilen 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ve 0.7 μl 'lik saf su hacimleri için ayrı ayrı olacak şekilde periotron değerleri ölçüldü. Bu işlem her bir hacim için üç kez tekrarlandı ve her hacim için elde edilen üç değerın ortalaması alınarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisi her 5 hastadan sonra yenilendi.

Tükrüğün Örneklenmesi

Her bir hastadan DOS örneklerinin alınmasını takiben tükrük örnekleri elde edildi. Bu örnekleme için tüm hastalara örnekleme yapılacağı gün diyet sınırlaması yapılmadan sabah kahvaltı etmeleri ve kahvaltıyı takiben daha önceden anlatıldığı şekilde dişlerini fırçalamaları söylendi. Yine hastalardan fırçalama işlemini takiben numuneleri elde edeceğimiz zamana kadar herhangi bir şey yiyip içmemeleri ve sakız çiğnememeleri tembihlendi. Hastalarda DOS numunelerinin alınmasını takiben ağızları bol

su ile çalkalatılarak tükürtüldü ve 10 dakika beklendi. Bu süre sonunda her bir hasta için daha önceden işaretlenmiş eppendorf tüpler hastalara verilerek direkt tüp içerisine olacak şekilde her hastadan yaklaşık 0.5 ml'lik tükürük örneği alındı ve eppendorf tüplerin kapağı derhal kapatılarak hücresel elemanları ve plağı uzaklaştırmak için 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Tüplerin tabanında oluşan çökeltiye dokunulmadan yüzeydeki sıvı pipetlenerek yine o hasta için işaretlenmiş farklı bir eppendorf tüpe alındı. Örnekler değerlendirilinceye kadar -80 °C de saklandı.

Nitrat+ Nitrit Analizi

NO Kiti İçeriği:

- 1- Nitrat/nitrit ölçüm tamponu
- 2- Nitrat redüktaz enzim preparatı
- 3- Nitrat redüktaz kofaktör preparatı
- 4- Nitrat standardı
- 5- Nitrit standardı
- 6- Greiss reajanı R1
- 7- Greiss reajanı R2
- 8- 96 well plate
- 9- Plate örtücü

Nitrat+ Nitrit Ölçümü

Ölçüm Öncesi Hazırlık

- 1- Assay Buffer (ölçüm tamponu):** Assay buffer tüp içeriğini saf su ile toplam hacim 100 ml olacak şekilde sulandırıldı. Bu assay buffer ölçümden önce gerekli ise numunelerin sulandırılması için kullanılır. Bu şekilde hazırlanan buffer yaklaşık olarak 2 ay boyunca +4 canticrat derecede sabit bozulmadan saklanabilir.
- 2- Nitrat Redüktaz (Tüp 2):** Tüp içeriği 1.2 ml'lik assay buffer ile tekrar oluşturuldu. Kullanım esnasında buz içerisinde saklandı. Kullanılmadığı

zamanlarda -20 santigrad derecede saklandı. Bu solüsyonun dondurulması ve eritilmesi bir kez ile sınırlandırıldı.

3- Enzim Kofaktörleri (Tüp 3): Tüp içeriği 1.2 ml'lik assay buffer ile tekrar oluşturuldu. Kullanım esnasında buz içerisinde saklandı. Kullanılmadığı zamanlarda -20 santigrad derecede saklandı. Bu solüsyonun dondurulması ve eritilmesi bir kez ile sınırlandırıldı.

4- Nitrat Standardı (Tüp 4) : Lipofilize edilmiş toza en az zarar verecek şekilde tüpün kapağı yavaşça açıldı. Tüp içeriği 1.0 ml'lik assay buffer ile tekrar oluşturuldu. Kapakta hiç toz artığı kalmayacak şekilde tüm tüp içeriği solüsyonun içine karıştırılarak vortekslendi ve +4 santigrad derecede saklandı. Bu esnada herhangi bir dondurma işlemine tabi tutulmadı.

5- Nitrit Standardı (Tüp 5) : Lipofilize edilmiş toza en az zarar verecek şekilde tüpün kapağı yavaşça açıldı. Tüp içeriği 1.0 ml'lik assay buffer ile tekrar oluşturuldu. Kapakta hiç toz artığı kalmayacak şekilde tüm tüp içeriği solüsyonun içine karıştırılarak vortekslendi ve +4 santigrad derecede saklandı. Bu esnada herhangi bir dondurma işlemine tabi tutulmadı.

6- Griess Reajanları R1 Ve R2 (Tüp 6 Ve 7) : Bu tüplere her hangi bir solüsyon yada assay buffer eklenilmedi. +4 santigrad derecede saklandı. Bu esnada herhangi bir dondurma işlemine tabi tutulmadı.

Nitrat + Nitrit Ölçümü

- 1- Kör olarak kullanılan welle 200 µl ölçüm tamponu ilave edildi. Bu welle daha sonra her hangi bir reajan eklenmedi.
- 2- Test wellerine 80 µl örnek dilusyonu eklendi

- 3- Wellerden her birine 10µl enzim kofaktör karışımı ilave edildi.
- 4- Wellerden her birine 10µl nitrat redüktaz karışımı ilave edildi.
- 5- Plate plate örtücü ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- 6- Daha sonra her bir welle 50µl Griess Reajanı RI eklendi.
- 7- Her bir welle derhal 50µl Griess Reajanı RII eklendi.
- 8- Renk oluşumu için oda sıcaklığında 10 dakika tutuldu.
- 9- Daha sonra her bir well içeriğine 600µl saf su ilave edilerek 540 nm absorbansta spektrofotometrede okundu.
- 10- Bu absorbans değerleri hazırlanan nitrat standart eğrisi ile konsantrasyon değerlerine çevrildi.

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda tükrük numuneleri değerlendirilirken saf su ile %50 oranında seyreltildi. Veriler rapor edilirken elde edilen değer 2 ile çarpıldı.

Tümör Necrosis Faktör- Alfa (TNF- α) Analizi

Kullanılan Reajanlar:

- 1- İnsan TNF- α 'sına karşı poliklonal antikor ile kaplanmış mikrowell plate
- 2- Biotin-Conjugate
- 3- TNF- α Standardı
- 4- Streptavidin-HRP
- 5- Sample Diluent
- 6- Wash Buffer Consentrate
- 7- Assay Buffer Consentrate
- 8- Substrat solüsyonu I
- 9- Substrat solüsyonu II
- 10- Stop solüsyonu
- 11- Plate kapatıcıları

Reajanların Hazırlanması

- 1- **Wash Buffer:** 50 ml'lik tp içeriği 1000 ml'lik bir silindir cam kap içerisine aktararak toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Final solusyonun pH'ı 7.4 'e ayarlandı. (Bu solusyon hazırlanmasını takiben 2-25 C^o de 30 gün saklanabilir.)
- 2- **Assay Buffer:** 5 ml'lik tp içeriğine 95 ml saf su ilave edilerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. (Bu solusyon hazırlanmasını takiben 2-8 C^o de 30 gün saklanabilir.)
- 3- **Biotin-Conjugate:** Assay buffer kullanılarak 1:100'lk dilüsyonu hazırlandı. Örneğin 30 µl Biotin-Conjugate, 3ml assay buffer ile hazırlandı. Bu solusyon hazırlandıktan sonra 30 dakika içinde kullanılmasına dikkat edildi.
- 4- **Streptavidin-HRP:** Assay buffer kullanılarak 1:100'lk dilüsyonu hazırlandı. Örneğin 60 µl Streptavidin-HRP, 6 ml assay buffer ile hazırlandı.
- 5- **TNF-α Standardı:** Tp içeriği işaretli kısma kadar saf ile tamamlandı ve çözülme olana kadar nazikçe çalkalandı.
- 6- **TMB Substrat Solusyonu:** Eşit hacimlerde substrat solüsyonu I ve substrat solüsyonu II metal içermeyen temiz bir kapta karıştırıldı. Zaman geçtikçe karışımın rengi sarı bir hal aldı. Bu rengin mavi olması bize kontaminasyon olduğunu gösterecekti. Bu solusyon, hazırlanmasını takiben birkaç dakika içinde kullanıldı.

Test Protokolü

- a-** Tüm re ajanlar kullanımdan önce köpükleşme olmayacak şekilde çalkalandı.
- b-** Kullanılacak well sayısı belirlendi.
- c-** Yaklaşık 300 µl'lik wash buffer kullanılarak tüm weller iki kez yıkandı ve well yüzeylerine zarar vermeden fazla sıvı weller nemli kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- d-** A1 weli kör olarak bırakıldı ve tüm standart wellere 100 µl sample diluent eklendi. Yine bu wellere sırası ile 100 µl TNF-α Standardı eklenerek karıştırıldı ve bu karışımdan 100 µl alınarak bir sonraki welle eklendi ve tüm standart wellere bu işlem uygulandıktan sonra en son wellden alınan 100 µl'lik karışım atıldı.
- e-** Kör olarak kullanılan welle 100 µl sample diluent ilave edildi.
- f-** Örneklerin konulacağı wellere 50'şer µl sample diluent ilave edildi.
- g-** Örnek için kullanılan wellere her birine her bir örnekten 50 µl ilave edildi.
- h-** Biotin-Conjugate hazırlandı.
- i-** Hazırlanan Biotin-Conjugate dilusyonundan kör için kullanılan well de dahil olmak üzere tüm wellere 50 µl ilave edildi.
- j-** Mikrowell striplerin üzerleri plate cover ile örtülerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- k-** Plate örtücü kaldırıldı ve wellerin içeriği boşaltıldı. C şıkkında anlatıldığı şekilde mikrowell stripler dört kez yıkandı. Derhal bir sonraki aşamaya geçildi.
- l-** Streptavidin-HRP hazırlandı.

- m-** K r için kullanılan well de dahil olmak üzere tüm wellere 100 l Streptavidin-HRP dilusyonu eklendi.
- n-** Mikrowell strip tekrardan plate örtücü ile kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- o-** TMB Substrat solusyonu hazırlandı.
- p-** Plate  rt c  kaldırıldı ve wellerin içeriği boşaltıldı. C  ikkında anlatıldığı şekilde mikrowell stripler dört kez yıkandı. Derhal bir sonraki aşamaya geçildi.
- q-** K r için kullanılan well de dahil olmak üzere tüm wellere 100 l TMB Substrat solusyonu karışımı eklendi.
- r-** Mikrowell strip tekrardan oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Bu süre içinde tüm wellerde sarı renk değişimi gözlendi.
- s-** Derhal k r için kullanılan well de dahil olmak üzere tüm wellere 100 l stop solusyonu eklenerek enzimatik reaksiyon sonlandırıldı. Sonuçlar stop solusyonunun eklenmesini takiben daha önceden proğramlanmış ELISA  nitesinde derhal değerlendirildi.
- t-** Primer dalga boyu 450 nm olan spektrofotometre kullanılarak her bir wellin absorbans değerleri okundu. Hem örneklerin hem de TNF-  standartlarının absorbans değerleri saptandı.
- u-** Makine, ordinat ekseninde her bir standart konsantrasyon için ortalama absorbansı, absis ekseninde ise bu absorbansa karŐılık gelen TNF-  konsantrasyonunu gösteren bir konsantrasyon eğrisi hazırladı ve örnek konsantrasyonları bu eğriye göre hesaplandı.

TNF- α miktarı, bu sitokin için özel olan enzim-linked immünoadsorbant assays (ELISAs) (Immuno Biological Laboratories, Hamburg) kullanılarak DOS'ta saptandı. TNF- α ELISA, hücre kültürü süpernatantlarında, insan serum, plazma ve diğer vücut sıvılarında insan TNF- α 'sının miktarsal olarak saptanması için enzim-linked immünoadsorbant ölçümüdür. TNF- α ELISA, sadece araştırmalarda kullanılır, teşhis ve tedavi amaçlı kullanılmaz.

Bu testte anahatları ile özetleyecek olursak; mikrowellere TNF- α poliklonal kaplayıcı antikor adsorbe edildi. Örnek ve standartlarda bulunan TNF- α , mikrowellere adsorbe edilen antikorlara bağlanır; biotin-conjugated monoklonal TNF- α antikor eklenir ve ilk antikor tarafından tutulan TNF- α 'ya bağlanır. İnkübasyon süresini takiben bağlanmayan biotin-conjugated TNF- α yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenir ve bu biotin-conjugated TNF- α 'ya bağlanır. İnkübasyon süresini takiben bağlanmayan Streptavidin-HRP yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve HRP ile reaktif olan substrat solüsyonu wellere eklenir. Örnekteki mevcut TNF- α miktarını gösteren renkli bir ürün şekillenir. Reaksiyon asit ilavesi ile sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülür. Yedi tane TNF- α standart solüsyonundan ve konsantrasyonu belirli TNF- α örneğinden bir standart eğri hazırlanır.

Tüm çalışma boyunca pipetleme yapılırken tekrarlanabilir pipettör kullanıldı. Her bir madde için farklı pipet ucu kullanıldı, her bir reajan pipetlenmeden önce birkaç kez pipetin ucuna çekilip geri boşaltıldı ve wellerde bulunan reajanlar içine pipetin ucu kesinlikle değdirilmedi.

Çalışmamızda elde edilen verilerin analizi "SPSS 11.0 for Windows" programında yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda bağımsız örnekler için Varyans ve

Student *t*-testi kullanıldı. Sitokin ve NO miktarları ve klinik parametreler arası ilişkiyi analiz etmek için de Spearman rank korelasyon testi kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol grubuna dahil edilen 15 bireyin (9'u bayan, 6 'sı erkek) yaşları 22-48 arasında olup, yaş ortalamaları 35.47 ± 11.30 idi. Plağa bağlı gingivitis grubunu oluşturan 20 hastanın (11'i bayan, 9'u erkek) yaşları ise 16-54 arasında değişirken, yaş ortalamaları 35.80 ± 10.48 ve kronik periodontitis grubunu oluşturan 20 hastanın (10'u bayan, 10'u erkek) yaşları ise 34-61 arasında değişirken yaş ortalamaları 41.50 ± 7.93 idi.

Araştırmamızda elde edilen bulgular hem klinik hem de laboratuvar verileri bakımından incelenmiştir. Ayrıca bu bulgular gruplar arasında karşılaştırılmalı olarak da değerlendirilmiştir.

Klinik Bulgular

Her üç grup ikişerli olarak birbirleri ile karşılaştırıldıklarında; yaş parametresi bakımından gruplar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Kontrol grubuna dâhil edilen periodontal olarak sağlıklı bireyler ile çalışma gruplarını oluşturan plağa bağlı gingivitisli ve kronik periodontitisli hastalardan elde edilen plak indeksi (PI), gingival indeks (Gİ), sondalama derinliği (SD) ve klinik ataşman seviyelerinin (KAS) ortalama değerleri ve bunların gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmaları Tablo 8'de toplu olarak verilmiştir.

Ortalama plak indeksi (PI) kontrol grubunda (I.Grup) 0.27 ± 0.51 , plağa bağlı gingivitis grubunda (II.Grup) 2.30 ± 0.44 ve kronik periodontitis grubunda (III.Grup) 2.51 ± 0.38 olarak bulunmuştur. Plak indeksindeki bu ortalamalar birbirleri ile karşılaştırıldıklarında kontrol grubu ile çalışma grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Ancak bu anlamlılık plağa bağlı

gingivitis ve kronik periodontitis grupları arasına belirgin olarak gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Yine aynı şekilde kontrol grubunda (I.Grup) ortalama gingival indeks değeri (GI) 0.15 ± 0.07 , plağa bağlı gingivitis grubunda (II.Grup) 1.88 ± 0.38 ve kronik periodontitis grubunda (III.Grup) 2.08 ± 0.43 olarak bulunmuştur. Gingival indekteki bu ortalamalar birbirleri ile karşılaştırıldıklarında kontrol grubu ile çalışma grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Ancak bu anlamlılık plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis grupları arasına belirgin olarak gözlenmemiştir ($p>0.05$).

SD değerlendirmesinde, ortalama cep derinliği kontrol grubunda 1.38 ± 0.43 mm, plağa bağlı gingivitis grubunda 2.86 ± 0.76 mm ve kronik periodontitis grubunda 3.96 ± 0.95 mm olarak bulunmuştur. Tablo 8'den de görüldüğü gibi en yüksek ortalama cep derinliği kronik periodontitis grubunda gözlenirken, en düşük ortalama cep derinliği kontrol grubunda saptanmıştır. Her üç grup arasındaki cep derinliği farklılıkları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$).

KAS gruplar arasında incelendiğinde sağlıklı ve plağa bağlı gingivitis gruplarında her hangi bir ataşman kaybı gözlenmezken kronik periodontitis grubunda 4.64 ± 1.10 mm'lik ortalama bir ataşman kaybı saptanmıştır. Kronik periodontitiste gözlenen bu ataşman kaybı diğer iki grupta karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 8: Kontrol grubu, plağa bağı gingivitis ve kronik periodontitis grubu hastalarının başlangıç Pİ, Gİ, SD ve KAS ortalama değerlerinin karşılaştırılmaları

Klinik Parametre	Sağlıklı Grup (I.Grup)	Plağabağı gingivitis (II.Grup)	Kronik periodontitis (III.Grup)	P Değeri
Pİ	0.27±0.51 ^ε	2.30±0.44 [¶]	2.51±0.38 [¶]	P < 0.001
Gİ	0.15±0.07 ^ε	1.88±0.38 [¶]	2.08±0.43 [¶]	P < 0.001
SD	1.38±0.43 ^ε	2.86±0.76 [#]	3.96±0.95 [¶]	P < 0.001
KAS	0.00±0.00 ^ε	0.00±0.00 ^ε	4.64±1.10 [¶]	P < 0.001

> 0.05 istatistiksel olarak önemsiz

* < 0.05 istatistiksel olarak önemli

** < 0.01 istatistiksel olarak çok önemli

***< 0.001 istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli

Laboratuar Bulguları

Tablo 9’da sağlıklı, plağa bağı gingivitis ve kronik periodontitis gruplarında DOS numunelerinden elde edilen NO total miktarlarının, NO konsantrasyon değerlerinin ve TNF- α total miktarlarının ortalamaları ve birbirleri ile karşılaştırmaları verilmiştir. Kontrol ve çalışma gruplarına dahil edilen bireylerin diş eti oluğu sıvılarında nitrat+nitrit ve TNF- α seviyeleri saptanabilir düzeylerde bulunmuştur. Tablodan da görüldüğü gibi DOS’taki ortalama NO total miktarı sağlıklı grupta 20.77±2.65 μ M, plağa bağı gingivitis grubunda 18.61±3.22 μ M ve kronik periodontitis grubunda 18.00±3.16 μ M olarak bulunmuştur. Bu değerler her üç grup arasında karşılaştırıldıklarında DOS NO total miktarı kontrol grubu hastalarına göre plağa bağı gingivitis ve kronik periodontitis hastalarında daha düşük olarak gözlenmiştir. Bu farklılık kontrol grubu ile çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı iken (p<0.05), plağa bağı gingivitis ve kronik periodontitis grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). DOS NO konsantrasyon değerleri bakımından gruplar arasında inceleme yapıldığında her üç grupta istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir (p<0.001). Şöyleki ortalama DOS NO

konsantrasyonu kontrol grubunda $98.05 \pm 73.55 \mu\text{M}/\mu\text{l}$, plağa bağlı gingivitis grubunda $34.84 \pm 13.65 \mu\text{M}/\mu\text{l}$ ve kronik periodontitis grubunda $21.00 \pm 6.01 \mu\text{M}/\mu\text{l}$ olarak bulunmuştur. DOS NO konsantrasyonu sağlıklı grupta yüksek gözlenirken kronik periodontitis grubunda diğer gruplara nazaran daha düşük değerlerde bulunmuştur. Yani DOS NO konsantrasyonu periodontal hastalığın şiddeti ile azalmıştır. Aksine ortalama DOS TNF- α total miktarı sağlıklı grupta $3.08 \pm 0.44 \text{ pg}/\text{örnek}$, plağa bağlı gingivitis grubunda $3.51 \pm 0.37 \text{ pg}/\text{örnek}$ ve kronik periodontitis grubunda $3.76 \pm 0.41 \text{ pg}/\text{örnek}$ olarak bulunmuştur. Bu verilere göre DOS TNF- α total miktarı en düşük kontrol grubunda ve en yüksek kronik periodontitis grubunda tespit edilmiştir. Bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 9: Kontrol grubu , plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis grubu hastalarının başlangıç DOS NO total miktarı, NO konsantrasyon değerleri ve TNF- α total miktarlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılmaları

DOS DEĞERLERİ	Sağlıklı Grup (I.Grup) X\pmSD	Plağa bağlı gingivitis (II.Grup) X\pmSD	Kronik periodontitis (III.Grup) X\pmSD	P Değeri
Total NO (μM)	$20.77 \pm 2.65^{\text{a}}$	$18.61 \pm 3.22^{\text{f}}$	$18.00 \pm 3.16^{\text{f}}$	$p < 0.05$
NO kons.	$98.05 \pm 73.55^{\text{a}}$	$34.84 \pm 13.65^{\text{f}}$	$21.00 \pm 6.01^{\text{#}}$	$p < 0.001$
TotalTNFα(pg/örnek)	$3.08 \pm 0.44^{\text{e}}$	$3.51 \pm 0.37^{\text{a}}$	$3.76 \pm 0.41^{\text{a}}$	$p < 0.05$

Tablo 10'da sağlıklı, plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis gruplarında tükürük numunelerinden elde edilen NO ve TNF- α miktarlarının ortalamaları ve birbirleri ile karşılaştırmaları verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi tükürükteki ortalama NO miktarı sağlıklı grupta $42.46 \pm 36.20 \mu\text{M}$, plağa bağlı gingivitis grubunda $44.95 \pm 40.50 \mu\text{M}$ ve kronik periodontitis grubunda $53.00 \pm 43.48 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Tablo incelendiğinde kronik periodontitisli grupta ortalama tükürük NO miktarının diğer iki

gruba göre rakamsal olarak ortalama 10 μM oranında arttığı gözlenmiştir. Bu değerler her üç grup arasında karşılaştırıldıklarında gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Yine tablodan da görüldüğü gibi tükürükteki ortalama TNF- α miktarı sağlıklı grupta 93.42 ± 132.2 pg, plağa bağlı gingivitis grubunda 106.36 ± 149.60 pg ve kronik periodontitis grubunda 95.62 ± 160.2 pg olarak bulunmuştur. Bu değerler her üç grup arasında karşılaştırıldıklarında gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

Tablo 10: Kontrol grubu, plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis grubu hastalarının başlangıç tükürük NO ve TNF- α miktarlarının ortalama değerlerinin karşılaştırılmaları

TÜKRÜK DEĞERLERİ	Sağlıklı Grup (I.Grup) X\pmSD	Plağa bağlı gingivitis (II.Grup) X\pmSD	Kronik periodontitis (III.Grup) X\pmSD	P Değeri
Total NO (μM)	$42.46\pm 36.20^{\text{@}}$	$44.95\pm 40.50^{\text{@}}$	$53.00\pm 43.48^{\text{@}}$	$p>0.05$
TotalTNF-α(pg)	$93.42\pm 132.2^{\text{\&}}$	$106.36\pm 149.60^{\text{\&}}$	$95.62\pm 160.2^{\text{\&}}$	$p>0.05$

Tükürük ve DOS'taki NO ve TNF- α değerleri ile periodontal hastalıkların klinik parametreleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 11'de verilmiştir.

Bu verilere göre DOS total NO değeri ile Pİ veGİ arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif korelasyonlar tespit edilmiştir ($R = -0.260$ ve $p= 0.055$) ve ($R = -0.262$ ve $p= 0.053$). Yine DOS total NO değeri ile SD ($R = -0.252$ ve $P= 0.064$) ve KAS ($R = -0.226$ ve $P= 0.070$) değerleri arasında tespit edilen negatif korelasyonların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

DOS NO konsantrasyon değerleri ile tüm klinik parametreler arasında tespit edilen negatif korelasyonlar istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

DOS total TNF- α değerleri ile tüm klinik parametreler arasında tespit edilen korelasyonların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Yine tükruk NO ve TNF- α değerleri ile tüm klinik parametreler arasında tespit edilen korelasyonların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Tablo 11: Tükruk ve DOS'taki NO ve TNF- α değerleri ile periodontal hastalıkların klinik parametreleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiki değerlendirmeleri

İncelenen moleküller	Pİ		Gİ		SD		KAS	
	R	P	R	P	R	P	R	P
DOS total NO	-0.260	0.055	-0.262	0.053	-0.252	0.064	-0.246	0.070
DOS kons. NO	-0.669^{***}	0.001	-0.742^{***}	0.001	-0.665^{***}	0.001	-0.662^{***}	0.001
DOS total TNF- α	0.065	0.637	0.096	0.486	0.039	0.777	0.225	0.072
Tükruk NO	-0.102	0.500	-0.054	0.720	-0.019	0.903	0.032	0.834
Tükruk TNF- α	0.181	0.240	0.156	0.312	0.209	0.173	0.088	0.572

Tükruk ve DOS'taki NO ve TNF- α değerlerinin birbirleri ile ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiki değerlendirmeler tablo 12'de verilmiştir. Bu verilere göre DOS total NO değeri ile DOS NO konsantrasyon değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı olan belirgin bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($R = 0.485$ ve $p=0.000$). Ve yine tükruk NO değeri ile tükruk TNF- α değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı olan belirgin bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($R = 0.409$ ve $p=0.006$).

Bunların dışındaki tüm NO ve TNF- α değerleri arasında tespit edilen korelasyonların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Tablo 12: Tükrük ve DOS'taki NO ve TNF- α değerlerinin birbirleri ile ilişkisini gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiki değerlendirmeleri

	DOS total NO Değeri		DOS Kons NO		DOS Total TNF- α		Tükrük NO		Tükrük TNF- α	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
DOS total NO	–		0.485^{***}	0.001	-0.127	0.355	0.014	0.928	-0.252	0.098
DOS Kons NO	–		–		-0.097	0.482	-0.002	0.990	-0.208	0.175
DOS Total TNF- α	–		–		–		0.221	0.140	0.073	0.637
Tükrük NO	–		–		–		–		0.409^{**}	0.006
Tükrük TNF- α	–		–		–		–		–	

Tablo 13'de kontrol grubu, plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis grubu hastalarından elde edilerek NO ve TNF- α tüplerine yerleştirilen ortalama DOS hacimlerinin gruplar arası karşılaştırılması verilmiştir. NO tüpündeki ortalama DOS miktarı sağlıklı grupta 0.31 ± 0.17 μ l, plağa bağlı gingivitis grubunda 0.61 ± 0.23 μ l ve kronik periodontitis grubunda 0.89 ± 0.19 μ l olarak bulunmuştur. Benzer şekilde TNF- α tüpündeki ortalama DOS miktarı sağlıklı grupta 0.25 ± 0.17 μ l, plağa bağlı gingivitis grubunda 0.76 ± 0.32 μ l ve kronik periodontitis grubunda 0.78 ± 0.27 μ l olarak bulunmuştur.

Tablodan da anlaşılacağı gibi hastalarımızdan elde edilen DOS miktarları kontrol grubunda en düşük olacak şekilde hastalığın şiddeti ile doğru orantılı bir artış

göstermiştir. Ve gruplar arasındaki ortalama DOS miktarları bakımından mevcut farklılıklar istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo 13: Kontrol grubu, plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitis grubu hastalarından elde edilerek NO ve TNF- α tüplerine yerleştirilen ortalama DOS hacimlerinin gruplar arası karşılaştırılması

DOS hacimleri	Sağlıklı Grup (I.Grup) X\pmSD	Plağa bağlı gingivitis (II.Grup) X\pmSD	Kronik periodontitis (III.Grup) X\pmSD	P Değeri
NO tüpündeki DOS hacmi (μ l)	0.31 \pm 0.17 [@]	0.61 \pm 0.23 ^{&}	0.89 \pm 0.19 [£]	0.001 ^{***}
TNF tüpündeki DOS hacmi(μ l)	0.25 \pm 0.17 [@]	0.76 \pm 0.32 ^{&}	0.78 \pm 0.27 [£]	0.001 ^{***}

TARTIŞMA

Periodontal hastalıklar için ana etyolojik faktör mikrobiyal dental plak olmasına rağmen, periodontal dokularda yıkıma yol açan etken mikrobiyal dental plaktaki patojen bakteriler ve konak doku savunma mekanizması arasındaki karmaşık etkileşimdir. Bakterilerin direk patolojik etkilerine ilaveten periodontal dokulardaki yıkım büyük ölçüde bakteri konak etkileşiminin neden olduğu indirek mekanizmalar yoluyla gerçekleşir. Günümüzde periodontal hastalıkların fizyopatolojisi ve etyopatolojisine yönelik çalışmalar yerini periodontal hastalıkların patogenezinde rol oynayan indirek mekanizmaların anlaşılmasına bırakmıştır.⁵⁹ Sondalama derinliği, ataşman seviyesi, sondalamada kanama, plak indeksi, alveoler kemik kaybının radyografik ölçümü gibi klinik parametreler periodontal hastalığın şiddeti hakkında yeterli bilgiyi sağlarken hastalık aktivitesinin ölçülmesinde kullanılamazlar.⁷⁶ Periodontal tanıda sert doku kaybının henüz ortaya çıkmadığı durumlarda ya da var olan kaybın zaman içindeki değişiminin tam izlenemediği durumlarda, laboratuvar metodları ile konak doku cevabının analiz edilmesi gereksinimi vardır.⁶ Bu gereksinim DOS ve tükürük gibi oral biyolojik sıvılarda periodontal hastalıkların biyokimyasal ve immünolojik belirtilerinin araştırılması zorunluluğunu ortaya koymuştur.

Son zamanlarda, çeşitli iltihabi sitokinlerin ve bir grup reaktif radikallerin periodontal hastalıkların patogenezindeki rollerini araştıran çalışmaların sayısında artış vardır. Klinik olarak hastalığın ortaya çıkmasından önce TNF'nin bölgede var olduğunu ve periodontal hastalık için uygun bir belirti olabileceği vurgulanmıştır.⁷⁷ Diğer yandan periodontal patolojilerde dişeti dokusunda açığa çıkan NO'nin de aralarında bulunduğu reaktif radikallerin çeşitli mekanizmalar vasıtası ile periodontal dokularda hasara neden

olabilecekleri öngörülmüştür.⁴⁶ Bu araştırmada, periodontal hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde önemli roller oynadığı belirtilen ROS türlerinden NO ve iltihabi bir sitokin olan TNF- α 'nın DOS ve tükürük örneklerindeki seviyelerinin saptanması ve bu seviyelerin birbirleri ile ve periodontal hastalığın klinik parametreleri ile olası ilişkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaç doğrultusunda, periodontal olarak sağlıklı 15, plağa bağlı gingivitisli 20 ve kronik periodontitisli 20 bireyden DOS ve tükürük örnekleri toplandı. Çalışmaya katılan bireylerin sistemik olarak sağlıklı olmalarına ve sigara, alkol gibi zararlı maddeler kullanmıyor olmalarına dikkat edilerek, DOS ve tükürükte tespit edilebilecek olan miktarların bu faktörlerden etkileniyor olma ihtimali elimine edildi.

Bu tez çalışmasında DOS ve tükürük analizleri tercih edildi. Daha önce yapılan çalışmaların tükürük ve DOS gibi biyolojik sıvılarda iltihabi mediatör seviyelerinin tespitinin periodontal hastalık aktivitesinin güzel bir göstergesi olduğu vurgulanmıştır.^{6,15,65,76,78-80} Ayrıca tükürük ve DOS'taki biyokimyasal moleküllerin periodontal doku yıkımının ve hastalığın prognozunun iyi bir yansıması olabileceği düşünülmektedir. Öyleki son yıllarda kimyasal esaslı diagnostik testler ile yapılan tükürük ve DOS çalışmaları güncellik kazanmıştır.⁷⁶

Litaretürde DOS'ta NO seviyesinin araştırıldığı çalışmaya rastlanamadı. Fakat daha önce Shimauchi ve arkadaşlarının⁸¹ kök kanalı içerisine yerleştirdikleri kurutma kağıtları ile elde ettikleri insan periapikal sıvılarında IL-8 ve NO seviyelerini saptayabilmeleri, kağıt şeritlerle toplanan DOS'ta NO seviyesinin saptanabileceği fikrini uyandırdı. Ancak kâğıt şeritlerle DOS toplanması esnasında kontaminasyon ve örnekleme zamanı gibi problemlerin varlığı bilinmektedir. Bu problemlerin elimine edilmesi amacıyla; bu çalışmada kontamine olduğundan şüphelenilen örnekler

tekrarlandı ve daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğunda olduğu gibi örnekleme süresi 30 saniye olarak belirlendi. Elde edilen DOS'un hacminin saptanması önemli bir zorunluluktur. Zira sıklıkla toplanan hacim 1 μ l'den küçüktür ve bu küçük hacimlerin saptanmasında buharlaşma önemli bir problem haline gelmektedir. Bu amaçla üretilmiş peritron ve hazırlanan kalibrasyon eğrileri en az hata ile hacmin saptanmasına katkıda bulunmaktadır.¹⁰ Tükrük numuneleri ise bireylerden günün aynı zamanında uyarılmamış karma tükrük örnekleri olarak toplandı. Böylece tükrük içerisinde miktarlarının saptanması planlanan moleküllerin tükrük seviyelerinin seyrelmesi önlendi.

DOS'ta TNF- α değerlendirmesi ise genellikle bu amaçla hazırlanmış ELISA kitleri ile yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında da TNF- α değerlendirmesi için bir mikro ELISA kit kullanıldı. Tüm çalışma boyunca, örneklerin toplanmasından son değerlendirilmesine ve verilerin yorumlanmasına kadar çalışılan konunun önemi ve numunenin miktarsal azlığı sebebi ile yanılma payını en aza indirmek için çok büyük hassasiyet ve titizlikle çalışıldı. Filtre kâğıt şeritlerle DOS örnekleme yapıldığında tükrük kontaminasyonu potansiyel bir problem halini alır ve sitokin konsantrasyonuna dair sonuçları etkileyebilir. Bu sebeple çalışmamızda gruplar arasında sitokin seviyeleri karşılaştırırken, grup içinde sitokin seviye değişiklikler belirlenirken ve klinik parametrelerle sitokin seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendirirken sitokinin total miktarı ele alındı ve değerlendirildi.

Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda sağlıklı bireylere göre gingivitisli ve periodontitisli bireylerde DOS miktarının arttığını ve bu artışın da hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olduğu tespit edildi. Periodontal hastalıklardaki DOS'un miktarsal

artışına dair bulgumuz çeşitli literatürde yer alan ve doğruluğu artık herkes tarafından benimsenmiş pek çok bulgu ile uyumludur.^{39,40,44}

Literatürde kardiovasküler, nörolojik ve immün fonksiyonlara sahip hücreler arası önemli bir molekül olan NO'nun DOS seviyesinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmadı. Ancak daha önce yapılan bazı çalışmalar periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda PNL'lerden yüksek miktarda NO salgılandığını göstermektedir.^{82,83} Hirose ve arkadaşları⁸², sağlıklı bireylere göre periodontitisli hastaların dişeti dokusunda iNOS salınımının önemli derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Buna göre iNOS yolu ile PNL ve makrofajlar tarafından NO üretiminin periodontal lezyonlarda artması ve bu durumun da periodontitisin ilerlemesi ile sonuçlanması olasıdır. Batista ve arkadaşları⁸³ ise yaptıkları bir çalışmada insan periodontal hastalıklarında NO varlığını karakterize etmek için, sağlıklı, plağa bağlı gingivitisli ve kronik periodontitisli hastalarda iNOS pozitif hücre sayılarını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar sağlıklı gruba göre gingivitisli ve kronik periodontitisli hastalarda iNOS pozitif hücre sayılarını önemli derecede daha yüksek bulmuşlardır.⁸³ Diğer yandan periodontal hastalıklı bireylerin dişeti dokusunda NO'nun yanısıra süperoksit (O_2^-) gibi diğer reaktif radikallerinde salınımının arttığına dair güçlü deliller mevcuttur.⁸⁴ Bizim çalışmamızda DOS total NO seviyeleri kontrol grubu ile hastalıklı grup arasında farklı iken, hastalıklı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiyordu. Ancak periodontal hastalıklı gruplarda DOS miktarındaki artış göz önüne alınarak elde edilen DOS NO konsantrasyon seviyelerinin plağa bağlı gingivitis ve kronik periodontitisli hastaların oluşturduğu gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü. Diğer yandan DOS NO ölçüm sonuçlarımız, DOS NO konsantrasyon seviyeleri ve DOS total NO seviyeleri arasında istatistiksel olarak

anlamli pozitif bir korelasyon olduğunu gosterdi. Yine periodontal hastalikli bireylerde tespit edilen DOS total NO seviyelerinin GI, PI, PD ve KAS gibi klinik parametrelerle arasında istatistiksel olarak anlamli bir korelasyon gozlenmezken DOS NO konsantrasyon seviyelerinin GI, PI, PD ve KAS gibi klinik parametrelerle arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamli negatif korelasyonlar goruldu. Litareturde bizim calismamizin bu bulgusunu tartisabilecegimiz baska calismalar bulunmamaktadır. Ancak daha once periodontal hastalikli bireylerin diseti dokusunda NO saliniminin arttigini gosteren calismalarla bizim calismamizin bu bulgusu tartisildiginda periodontal hastalikli bireylerin diseti dokusunda artan NO saliniminin DOS'a yansimadigi sonucu ortaya cikmaktadır. Ozellikle peridontitisli bireylerin diseti dokusunda NO ile birlikte NO'e yuksek affinitesi olan O_2^- 'in de yuksek seviyede saliniminin olması doku icerisinde NO'in O_2^- ile reaksiyona girerek her iki reaktif radikaldende daha fazla reaktif olan peroksinitrite ($ONOO^-$) donustugu ve bu sebeble artmis NO saliniminin DOS'a yansimadigi fikrini uyandırmaktadır. Bu nedenle periodontitisli bireylerin diseti dokusunda NO saliniminin artmasına ragmen bu artisin DOS NO seviyesine yansimaması karmaşik yıkım mekanizmalarının devam ettiğinin göstergesi olabilir.

Bu calismada tukruk NO seviyelerinin incelenmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli farklılık bulunmadı. Litareturde tukruk NO seviyeleri ve periodontal hastaliklar arasındaki iliskiyi arastiran calismaların bulguları birbirleriyle uyumlu degildir. Aurer⁵² ve arkadasları, aynı bireylerden farklı zaman periyotlarında ve yuksek NO_2^- (nitrit) iceren diyeti takiben alınan tukruk numunelerinde NO_2^- konsantrasyonları arasında önemli istatistiksel farklılıklar bulmamışlardır. Bu arastiricilar calismalarında NO_2^- miktarları manuel Griess reaksiyonu yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Yine aynı calismada hızlı ilerleyen periodontitis ve adult

periodontitisli bireyler sağlıklı bireylere göre önemli derecede daha düşük tükrük NO_2^- konsantrasyonları göstermişlerdir.⁵² Akapov ve Kankanian⁶¹, periodontal açıdan sağlıklı bireylerin tükrüklerinin PNL'lerde NO sentezini stimüle ederken gingivitisli ve periodontitisli hastaların tükrüklerinin PNL'lerde NO sentezini uyardıklarını hatta baskıladıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, periodontitisli hastaların DOS ve kanlarında bulunan PNL'lerin sağlıklı bireylerin PNL'lerinin aksine kültüre edilmiş fibroblastlarda NO-induced cGMP birikimini inhibe ettiği rapor edilmiştir.⁶¹ Bu iki çalışmanın bulgularına karşıt olarak Chen ve arkadaşları⁸⁵ ise 23 adult periodontitisli ve 27 sağlıklı bireylerden elde edilen tükrük örneklerinde manuel Gries reaksiyonu yöntemi ile NO seviyelerini değerlendirmişler ve sağlıklı bireylere göre periodontitisli bireylerin tükrük örneklerinde NO miktarının önemli derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılar klinik ataşman kaybı ile artmış tükrük NO seviyeleri arasında ve SD ile artmış tükrük NO seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda tükrük NO seviyelerinin incelenmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Çalışmamızın bu bulgusu daha önce yapılan ve bulguları birbirleri ile uyumlu olmayan çalışmaların hiç birisinin bulguları ile uyumlu değildi. Bu nedenle bu çalışmanın bulguları ile diğer çalışmaların bulguları arasındaki farklılığı tükrüğün oldukça karmaşık bir yapısının olmasına ve tükrük NO seviyelerinin pek çok faktör tarafından etkileniyor olmasına bağlayabiliriz. Her ne kadar tükrük elde edilmesi son derece kolay bir materyal olsada tükrüğün miktarı, akış hızı ve içeriği bilinen ve henüz bilinmeyen birçok faktörün etkisi altındadır. Üstelik tükrüğün içeriğinde yer alan ve tükrük bezlerinde gerçekleşen oral NO üretimi, nöral mekanizmanın kontrolü altındadır. Hem santral hem de periferel nöral aktiviteler bu üretimi etkilerler. Tükrük NO'ü en az dört kaynaktan gelebilir; sinir

sonlanmaları, tükürük bezlerinin sekretuar hücreleri, tükürük bezlerinin endotelial hücreleri ve oral bakterilere reaksiyon esnasında makrofajlarca salgılanabilir. Ayrıca beslenme alışkanlıklarında tükürüğün içeriğinde yer alan NO gibi üretimi birçok kaynaktan kontrol edilen moleküllerin seviyelerindeki değişimleri kompanse edebilecek önemli bir faktördür. Bu durumda periodontal açıdan antimikrobiyal özelliği son derece önemli olan tükürük NO seviyelerinin anlık ölçümü sağlıklı sonuçlar vermeyebilir.

Bizim çalışmamızda DOS TNF- α total seviyesi en yüksek kronik periodontitis grubunda, en düşük olarak ise kontrol grubunda bulundu. TNF- α 'nında aralarında bulunduğu iltihabi sitokinlerin periodontal dokularda seviyelerinin artması periodontal doku yıkımında direk ve indirek olarak önemli rol oynar. Son zamanlarda, sitokinlerin kronik periodontal hastalıkların patogenezi üzerindeki rollerinin araştırılmasına büyük ilgi vardır. Periodontal hastalıklı bireylerde DOS TNF- α seviyelerinin periodontal hastalık belirtisi olabileceğinin rapor edildiği ilk çalışma 1990 yılında Rossomondo ve arkadaşları⁷⁷ tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar sığ cep olan bölgelerde de TNF- α 'ya rastladılar ve bu sebeple TNF'nin klinik olarak hastalığın ortaya çıkmasından önce bölgede var olduğunu ve periodontal hastalık için uygun bir belirti olabileceğini rapor ettiler. Gamonal ve arkadaşları⁸⁶ 15 kronik periodontitisli ve 8 periodontal olarak sağlıklı bireyde yaptıkları çalışmada, periodontitisli grupta DOS TNF- α total seviyelerini kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Erdemir ve arkadaşları¹⁵, periodontitis için majör bir çevresel risk faktörü olan sigara kullanımının DOS TNF- α seviyeleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar sigara kullanımının DOS TNF- α seviyelerini etkilemediğini ve periodontitisli hastalarda inisiyal tedaviyi takip eden 6 ayda DOS TNF- α düzeyinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar hem sigara kullanan hem de

kullanmayan bireylerde periodontal hastalığın klinik parametreleri ile DOS TNF- α total miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptayamamışlardır. Son olarak Kurtis ve arkadaşları⁸⁷ 2005 yılında 25 kronik periodontitisli, 20 aggressive periodontitisli ve 20 periodontal olarak sağlıklı bireyden aldıkları DOS örneklerinde Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ve TNF- α seviyelerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar kronik periodontitisli grup ve aggressive periodontitisli grup arasında DOS TNF- α total seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmada hem kronik periodontitisli grupta hemde aggressive periodontitisli grupta DOS TNF- α total seviyelerinin kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar kronik periodontitisli grupta DOS TNF- α total seviyeleri ile klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon tespit etmişlerdir. Daha önce bahsettiğimiz gibi bizim çalışmamızda DOS TNF- α total seviyesi en yüksek kronik periodontitis grubunda, en düşük olarak ise kontrol grubunda bulundu. Bu bulgumuz bizden önce yapılan çalışmaların bulguları ile uyumludur. Ancak bu çalışmada DOS TNF- α total seviyeleri ile klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon tespit edilemedi. Bu bulgumuz Erdemir ve arkadaşlarının bulgusu ile uyumlu iken Kurtis ve arkadaşlarının bulgusu ile uyumlu değildi. Çalışmamızın DOS TNF- α total seviyeleri ile ilgili bulguları DOS TNF- α total seviyesinin periodontal hastalıkların şiddeti ile ilişkili olmadığını ancak periodontal hastalıklarda iltihap ile dişeti dokusunda artan TNF- α seviyesinin DOS'a yansıdığını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda tükürük TNF- α seviyesi en yüksek plağa bağlı gingivitis grubunda, en düşük olarak ise kronik periodontitis grubunda bulunmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.. Ne yazıkki literatürde periodontal hastalıklarda tükürük TNF- α

seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmadı. Dolayısıyla literatürlerle geniş olarak tartışma olanağı bulamadığımız bulgumuzu ancak gruplar arasında mukayese edilerek bir sonuca varmaya çalıştık. Çalışmamızda tükürük TNF- α seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği gibi tükürük TNF- α seviyeleri ile klinik parametreler arasında da korelasyon tespit edilmedi. Bununla beraber, tükürük TNF- α seviyeleri ve tükürük NO seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi. Bu genel patolojide NO ve TNF- α salınımı arasında pozitif bir ilişki ve denge olduğu bildiren çalışmalarını destekler niteliktedir^{53,76}

Tükürük ve DOS gibi oral biyolojik sıvılarda periodontal hastalıkların ana etkeni olan mikrobiyal dental plağa karşı gelişen konak doku cevabının göstergelerinin araştırılması hastalık aktivasyonu ve prognozu açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda dişeti dokusunda periodontal hastalık göstergesi olarak bilinen artmış NO ve TNF- α salınımının tükürük ve DOS'a yansıyor yansımadağı araştırıldı. Diğer yandan NO ve TNF- α 'nın tükürük ve DOS seviyelerinin periodontal hastalıkların klinik parametreleri ile ilişkili olup olmadığı ve periodontal hastalık göstergesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı tartışıldı. Litaretürde bulgularımızın bir kısmını tartışabileceğimiz çalışmalara rastlanmazken bulgularımız diğer kısmı ise sınırlı sayıda çalışmalarla tartışıldı. Dolayısıyla bu konuya ışık tutabilecek ileriki çalışmaların yapılmasının yararlı ve gerekli olduğu kanaatindeyiz.

SONUÇLAR

1. Periodontal hastalıklar için ana etiyolojik faktör mikrobiyal dental plak ve mikrobiyal dental plağın bakteriyal içeriğinin patojenitesi arttıkça konak doku cevabı karmaşık mekanizmalar vasıtası ile doku yıkımına neden olur.
2. Periodontal hastalıkların şiddeti arttıkça dişetin ekstrasellüler sıvısı olan DOS'un miktarı da artmaktadır.
3. Periodontal hastalığın şiddeti arttıkça dişeti dokusunda salınımı artığı bildirilen NO'nun, DOS total miktarı ve DOS konsantrasyonu azalmaktadır. Bu bulgular periodontal hastalıklı bireylerin dişeti dokusunda NO salınımındaki artışın DOS'a yansımadağını göstermektedir.
4. Periodontal hastalıklı bireylerin dişeti dokusunda konak savunma hücrelerinin sayısının ve aktivasyonunun artmasına bağlı olarak NO gibi reaktif oksijen türlerinin salınımında artış meydana geldiği bildirilmiş olmasına rağmen DOS NO konsantrasyon seviyesinin azalması NO'nun yüksek affinite duyduğu O_2^- ile reaksiyona girmiş olabileceği ve her iki reaktif radikaldende daha fazla reaktif olan peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşmüş olabileceği düşünülebilir.
5. Periodontal hastalığın şiddeti arttıkça, DOS total TNF- α miktarı artmaktadır. Bu bulgu periodontal hastalıklı bireylerin dişeti dokusunda TNF- α salınımındaki artışın DOS'a yansıdığını göstermektedir.
6. Bu çalışmada aralarında yer aldığı bir grup çalışmanın tükürük NO seviyesine ilişkin bulgularının birbirleriyle çelişiyor olması tükürüğün oldukça karmaşık bir yapısının olmasına ve tükürük NO seviyelerinin pek çok faktör tarafından etkilenebilmesine bağlanabilir.

7. Tükürük TNF- α seviyeleri ve tükürük NO seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon tespit edilmesi genel patolojide NO ve TNF- α salınımı arasında pozitif bir ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Greenstein G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000. A literature review. JADA 2000; 131: 1580-1592.
2. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. Ann Periodontol 1999; 4: 1-6.
3. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. Philadelphia London New York St Louis Sydney Toronto: W.B Saunders Company, 2002: 398-402.
4. Flemming TF. Periodontitis. Annals of Periodontology 1999; 4: 32-37.
5. Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque induced gingivitis.I. Background review and rationale. J Clin Periodontol 2004; 31: 229-238.
6. Özmeric N. Advances in periodontal disease markers. Clinica Chimica Acta 2004; 343: 1-16
7. William VG, Khalaf FAS, David PS. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal diseases activity. Periodontology 2000 2003; 31: 125-134
8. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. Ann Periodontol. 1997; 2(1): 123-137.
9. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. Periodontology 2000 2003; 31: 43-54
10. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. Periodontology 2000 2003; 31: 32-42
11. Uitto VJ. Gingival crevice fluid-an introduction. Periodontol 2000 2003;31:9-11

12. Clancy RM, Amin AR, Abromson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis& Rheumatism* 1998; 41: 1141-1151
13. Modulation of host response in periodontal therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 460-470
14. Ataoğlu H, Alptekin NO, Haliloğlu S, Gursel M, Ataoğlu T, Serpek B, Durmuş E. Interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. *Clin. Oral Impl. Res* 2002; 13: 470- 476
15. Erdemir EO, Duran I, Haliloğlu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontal* 2004; 31: 99-104
16. Beutler B, Cerami A. Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr. Rev.* 1988,9:57
17. Maury CPJ. Tumor necrosis factor-an overview. *Acta Med. Scand.* 1986; 220: 387-394.
18. Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of “high responders” and “low responders” to therapy, *J Clin Periodontol* 2004; 31: 253–259
19. Loe H., Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology* 1965; 36: 177–187
20. Lindhe J, Hamp S, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of Periodontal Research* 1973; 8,:1–10

21. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks C N, Koertge TE, Califano J V, Burmeister JA, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *Journal of Periodontology* 2000; 71:1699–1707
22. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of Periodontology* 1999; 4: 7-19
23. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Blackwell Munsgaard, a Blackwell Publishing Company (Fourth Edition) 2003; 198- 208
24. Engelberger T, Hefti A, Kallenberger A, Rateitschak KH. Correlations among papilla bleeding Index, other clinical indices and histologically determined inflammation of gingival papilla. *Journal of Clinical Periodontology* 1983;10: 579–589
25. Bosman CW, Powell RN. The reversal of localized experimental gingivitis. A comparison between mechanical toothbrushing procedures and a 0.2% chlorhexidine mouthrinse. *Journal of Clinical Periodontology* 1977; 4: 161–172
26. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *Journal of Clinical Periodontology* 1986; 13: 64–73
27. Goodson JM, Palys MD, Socransky SS. Gingival bleeding accentuated by plaque in healthy IL-1(1) genotype subjects. *Journal of Dental Research* 2000; 79: (Abstract 221), 171
28. Glick M, Pliskin ME, Weiss RC. The clinical and histologic appearance of HIV-associated gingivitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 1990; 69: 395–398

29. Monteiro da Silva AM, Oakley DA, Newman HN, Nohl FS, Lloyd HM. Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 789-794.
30. Papapanou PN. Risk assessment in the diagnosis and treatment of periodontal diseases. *J Dent Ed* 1998; 62: 822.
31. Vettore MV, Leao ATT, Monteiro da Silva AM, Quintanilha RS, Lamarca GA. The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 394-402
32. Monteiro da Silva AM, Newman HN, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 516-526.
33. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid markers as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2003;31:167-180.
34. Brill N. Gingival conditions related to flow of tissue fluid into gingival pockets. *Acta Odontol Scand* 1960;18: 421- 446
35. Brill N. The gingival pocket fluid. Studies of its occurrence, composition, and effect. *Acta Odontol Scand* 1962; 20: supplement 32
36. Brill N, Krasse B. Effect of mechanical stimulation on flow of tissue fluid through gingival pocket epithelium. *Acta Odontol Scand* 1959; 17: 115-130
37. Pashley DH. A mecanistic analysis of gingival fluid production. *J Periodontal Res* 1976;11:121-134
38. Curtis MA, Sterne JAC, Price SJ, Griffiths GS, Coulthurst SK, Wilton JMA, Johnson NW. The protein concentration of gingival crevicular fluid sampled

- from male adolescents with no destructive periodontitis: Baseline data of a longitudinal study. *J Periodontol* 1990; 25: 6-16
39. Cimasoni G,. Crevicular fluid updated: Monographs in oral science. Basel, Karger 1983; 3: 111-117
40. Borden SM, Golub LM, Kleinberg I. The effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans. *Journal of Periodontal Research* 1977; 12: 160-165
41. Schenck K, Poppelsdorf D, Denis C, Tollefsen T. Levels of salivary IgA antibodies reactive with bacteria from dental plaque are associated with susceptibility to experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 411-417
42. Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B₄, prostoglandin E₂, tromboxane B₂, and tumor necrosis factor α in experimental gingivitis in humans. *Journal of Periodontal Research* 1993; 28: 241-247
43. Akalin FA, Toklu E, Renda N: Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 238–243.
44. Alexander DCC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen MH. Interleukin 1 beta , prostoglandin E₂, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol* 1999; 67: 755-762
45. Jin L, Soder B, Corbet EF. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71: 929-939

46. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287- 296
47. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70: 619-628.
48. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Diseases* 2000; 6: 136-137
49. Breman PA, Thomas GJ, Langdon JD. The rol of nitric oxide in oral diseases. *Archives of Oral Biology* 2003; 48: 93-100
50. Ralston SH. Nitric oxide and bone: What a gas!. *British Journal of Rheumatology* 1997; 36. 831-838
51. Peter KMK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apopitosis. *International Immunopharmacology* 2002; 1: 1421-1441
52. Aurer A, Aleksic J, Ivic-Kardum M, Aurer J, Culo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 565-568
53. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases* 2001; 7: 2-10
54. Moncada S, Palmer RM, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109–142.
55. Lohinai MZ, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit* 1998;4(6): 1089-1095
56. Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B, Saito T. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon- γ - producing cells in human radicular cysts. *International Endodontic Journal* 1999; 32: 124-130

57. Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression: suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 1995; 270: 26731–26733.
58. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS et al. Nitric oxide synthase isozymes-characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121–1131.
59. Informational paper. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 460-470
60. Crowell AJ, Steele VE, Sigman CC, Fay RJ. Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention? *Molecular Cancer Therapeutics* 2003; 2: 815-823
61. Akopov SE, Kankanian AP. Nitric oxide inactivation by polymorphonuclear leukocytes as a mechanism for the development of periodontal lesions. *Stomatologija* 1996; 75: 12-24
62. Matejka M, Ulm C, Partyka J, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontol* 1998; 33: 517-518
63. Carossa S, Pera P, Doglio p, Lombardo S, Cologrande P, Brussino L, rolla G, Bucca C. Oral nitric oxide during plaque deposition. *European Journal of Clinical Investigation* 2001; 31: 876-879
64. Daghigh F, Borghaci RC, Thornton DR, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J. Periodontol* 2002; April: 392-400
65. Eley BM, Cox SW. Advances in periodontal diagnosis 5. Potential inflammatory and immune markers. *British Dental Journal* 1998; 184(5): 220-223

66. Nardin E. The role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. *Ann Periodontol* 2001; 6(1): 30-40
67. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1046-1052
68. Rossomondo EF, White L. A novel method for the detection of TNF-alpha in gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1993; 64(5): 445-449
69. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003; 74(3): 391-401
70. Baqui AAMA, Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falklerwa JR. Enhanced interleukin 1 β , interleukin 6 ve tumor necrosis factor α in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. *Oral Mikrobiol Immunol* 2000; 15: 67-73.
71. Sheikhi M, Gustafson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 758-762
72. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: Fibroblsat biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-110
73. Silness J, L e H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation of between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-135.
74. L e H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalance and severity . *Acta Odontol Scand*. 1963; 21: 531-551.

75. Johnson RB, Strecfus CF, Dai X, Tucci MA. Protein recovery from several papre types used to collect gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontal Research* 1999;34: 283- 289
76. Giamopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflamation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 145-153.
77. Rossomando EF, Kenedy JE, Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of Oral Biology* 1990;35:431-434.
78. Rawlinson A, Grummitt JM, Walsh TF, Douglas CWI. Interleukin 1 and reseptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers. *J Clin Periodontol* 2003: 30: 42-48
79. Cutler CW, Stanford TW, Abraham C, Cederberg RA, Boardman TJ, Ross C. Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of proinflammatory cytokine levels and plaque. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 134-143.
80. Alpagot T, Font K, Lee A. Longitudinal evalation of GCF INF- γ levels and periodontal status in HIV⁺ patients. *J Clin Periodontol* 2003:30:944-948
81. Shimauchi H, Takayama S, Narikawa –Kiji M, Shimabukuro Y, Okado H: Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *Journal of Endodontics* 2001; 27(12): 749-752.
82. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol* 2001; 72(5): 590- 597.

83. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara YS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Diseases* 2002; 8 : 254-260.
84. Moseley R, Waddington RJ, Embery G. Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1362: 221-231.
85. Chen G, Sun W. The investigation on nitric oxide levels in saliva and their relationship with the severity of periodontitis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1999; 17:140-142.
86. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martinez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 616-623.
87. Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, Bal B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2005; 76: 1849-1855.

