

**PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA MATRİKS  
METALLOPROTEİNAZ-9 VE TÜMÖR NEKROZİS  
FAKTÖR-RESEPTÖR 2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9  
AND TUMOR NECROSIS FACTOR-RECEPTOR 2 GENE  
POLYMORPHISMS IN PERIODONTITIS PATIENTS**

**GÜLCAN KUYUCUKLU**

**Prof. Dr. SİBEL SÜMER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2013

**GÜLCAN KUYUCUKLU'nun hazırladığı “Periodontitisli hastalarda Matriks Metalloproteinaz-9 ve Tümör Nekrozis Faktör-Reseptör 2 gen polimorfizmlerinin incelenmesi” adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

Başkan

(Prof. Dr., Erol AKSÖZ)

Danışman

(Prof. Dr., Sibel SÜMER)

Üye

(Prof. Dr., Ferda Alev AKALIN)

Üye

(Prof. Dr., Nuran DİRİL)

Üye

(Prof. Dr., Hatice MERGEN)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*İlkokuldan bu yana elimi hiç bırakmayan, sevgi ve  
desteğini esirgemeyen,*

*Süper Babaannem,  
Münevver KUYUCUKLU'YA...*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24 /07 /2013

GÜLCAN KUYUCUKLU



## ÖZET

# PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 VE TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- RESEPTÖR 2 GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

**GÜLCAN KUYUCUKLU**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. SİBEL SÜMER**

**Temmuz 2013, 90 sayfa**

Periodontitis, dişeti iltihabı ve diş çevresi dokularının yıkımı ile sonuçlanan dişeti hastalığıdır. Kompleks bir hastalık olan periodontitis, çeşitli popülasyonlarda saptanmış diş kayıplarının %10-15'inden sorumludur. Yapılan araştırmalarda periodontitis ve gen polimorfizmi arasındaki ilişki gösterilmiştir. Periodontitisin patogenezinde önemli role sahip gen polimorfizmlerinden bir tanesi, TNF- $\alpha$  gen polimorfizmidir. TNF- $\alpha$ 'nın hücre yüzey reseptörleri, TNF reseptör 1, (TNF-R1, p55 TNF-R) ve TNF reseptör 2'dir (TNF-R2, p75 TNF-R). TNF-R2 (+587) T/G polimorfizminin, yapılan araştırmalarda periodontitis ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Periodontitisle ilgili genetik polimorfizmlerden bir diğeri de matriks metalloproteinaz (MMPs) genlerine ait polimorfizmlerdir. Matriks metalloproteinazlar, hücreler arası matriksi sindiren yaklaşık 25 enzimli bir ailedir. Yapılan araştırmalarda, MMP-9 geninin -1562 pozisyonunda T alleli bulduran bireylerin, kronik periodontitis bakımından daha az risk taşıdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, Türk popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme, TNF-R2 geninin +587 T/G pozisyonunda ve MMP-9 geninin promotor bölgesinde -1562 C/T pozisyonunda yer alan polimorfizmler ile periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada üç çalışma grubu bulunmaktadır. Bunlar, agresif periodontitis (AP), kronik periodontitis (KP) ve kontrol grubudur.

(K). Çalışmamızda, bu gruptaki kişilerden kan örnekleri alınmış ve bu örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu DNA örneklerinden, belirtilen gen bölgelerindeki SNP lokalizasyonlarını kapsayan ilgili bölgeler PCR ile çoğaltılmış ve çoğaltılan fragmentler, seçilen uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek her bireyin tek nükleotit polimorfizmleri tespit edilmiştir. TNF-R2 (+587) T/G polimorfizminde; TT, TG ve GG genotipleri ve allel frekansları incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler sonucu, kontrol ve periodontitis grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Gruplar arasında G alleli taşıma oranları, kontrol için %29,6; AP için %66; KP için %63 bulunmuştur. MMP-9 (-1562) C/T polimorfizminde de; CC, CT ve TT genotipleri ve allel frekansları incelenmiş ve yapılan istatistiksel çalışmada, kontrol ve periodontitis grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ). T alleli taşıma oranı kontrol grubunda %3,3; AP grubunda %19; KP grubunda ise %16,2 olarak belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Periodontitis, genetik polimorfizm, TNF-R2, MMP-9, PCR-RFLP.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND TUMOR NECROSIS FACTOR-RECEPTOR 2 GENE POLYMORPHISMS IN PERIODONTITIS PATIENTS**

**GÜLCAN KUYUCUKLU**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. SİBEL SÜMER**

**July 2013, 90 pages**

Periodontitis is a gingival disease resulting in destruction of tissue around the tooth. As a complex disease, periodontitis is responsible of 10 to 15 percent of tooth loss detected in various populations. Recent studies have suggested that periodontitis is associated with gene polymorphism. TNF- $\alpha$  gene polymorphism is one of them which have an important role in periodontitis pathogenesis. Cell surface receptors of TNF- $\alpha$  are TNF receptor 1 (TNF-R1, p55 TNF-R) and TNF receptor 2 (TNF-R2, p75 TNF-R). Recent studies have shown that TNF-R2 (+587) T/G gene polymorphism is associated with periodontitis. Matrix metalloproteinases (MMPs) polymorphisms are also related to periodontitis. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of about 25 enzymes and are involved in periodontal tissue remodeling and degradation. In some studies, individuals carrying MMP-9, -1562 T allele shown to have less risk for chronic periodontitis. The aim of this study was to analyze TNFR-2 (+587) T/G and MMP-9 (-1562) C/T polymorphisms in chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients and healthy controls in Turkish population. This study included three groups: Aggressive periodontitis (AP), chronic periodontitis (CP) and periodontally healthy individuals (C). Blood samples were taken from groups and genomic DNA was isolated from these samples. Single nucleotide



polymorphisms (SNP) were analyzed by PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) methods in DNA samples. For TNF-R2 (+587) T/G polymorphism; TT, TG and GG genotype and allele frequencies were analyzed and the differences in genotype and allele frequencies were found significant between the groups ( $p < 0,001$ ). Between the groups G allele carriage rates were found 29,6% for control; 66% for AP and 63% for CP groups. For MMP-9 (-1562) C/T polymorphism; CC, CT and TT genotype and allele frequencies were analyzed and the differences in genotype and allele frequencies were found meaningful between the groups ( $p < 0,001$ ). Between the groups; T allele carriage rates were found 3.3% for control; 19% for AP and 16,2% for KP groups.

**Keywords:** Periodontitis, genetic polymorphism, TNF-R2, MMP-9, PCR-RFLP.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileri ile yardımcı olan, sevgi ve ilgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel SÜMER 'e,

Proje öneri sahibi ve tez aşamalarında bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan, yol gösteren çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferda Alev AKALIN'a,

Projenin hazırlanması ve hastaların bulunmasında emeği geçen, ayrıca kan örneklerinin temin edilmesini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerinden, Öğr. Gör. Sayın Dr. Güliz N. GÜNCÜ'ye, Arş. Gör. Erhan DURSUN ve Arş. Gör. Erkan ŞÜKÜROĞLU'na, Karadeniz Teknik Üniversitesi Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Esra BALTACIOĞLU'na,

İstatistiksel hesaplamaların yapılmasında yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Bölümü öğretim üyelerinden, Doç. Dr. Erdem KARABULUT'a,

Lisans eğitimimden bu yana akademik hayata beni teşvik eden ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta Sayın Prof. Dr. Erol AKSÖZ hocam olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan ve bana her konuda yardımcı olan Arş. Gör. Demet ERDÖNMEZ'e

Tez çalışmam süresince, her ihtiyacım olduğunda gerek bilgi gerek destekleriyle yanımda olan değerli dostlarım Caner TÜKEL, Arş. Gör. M. Kürşat ŞAHİN, Arş. Gör. Fatma ZİLİFDAR, Derya KALELİOĞLU, Egemen FOTO, Hızlan Hıncal AĞUŞ ve Teknisyen Vedat MUTLU'ya,

Her şeyden önemlisi çalışmalarım süresince büyük bir özveri ile beni destekleyen ve her zaman yanımda olan çok sevgili aileme ve Ural KAZAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gülcan KUYUCUKLU

Ankara, Temmuz 2013

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ .....	xiv
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	9
1.1.1. Periodontitis Patogenezi.....	9
1.1.2. Periodontitis İmmünolojisi.....	12
1.1.2.1. Konak-Bakteri Etkileşimi İle Tetiklenen İmmün Mekanizmalar .....	13
1.1.2.2. Periodontitiste Sitokinlerin Rolü.....	18
1.1.2.2.1. Periodontitis ve TNF-R2 İlişkisi .....	20
1.1.2.3. Periodontitiste Doku Yıkımı ve Bu Yıkımda Çeşitli Proteinazların Rolü .....	23
1.1.2.3.1. Periodontitis ve MMP-9 ilişkisi.....	29
1.1.3. Periodontitiste Genetik Faktörlerin Rolü .....	30
1.2. Önceki Çalışmalar.....	37

1.2.1. TNF-R2 Gen Polimorfizmi ile Periodontitis İlişkisini Araştıran Bazı Çalışmalar .....	37
1.2.2. MMP-9 Gen Polimorfizminin Periodontitis ile İlişkisini Araştıran Bazı Çalışmalar .....	39
2. MATERYAL VE METOT .....	41
2.1. Klinik Çalışmalar .....	41
2.1.1. Periodontal Muayeneler .....	41
2.1.2. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi .....	42
2.2. Laboratuvar Çalışmaları .....	42
2.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu .....	42
2.2.2. İzole Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi .....	43
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	44
2.2.3.1. TNF-R2 (+587 T/G) Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması .....	45
2.2.3.2. MMP-9 (1562 C/T) Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması .....	47
2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü .....	49
2.2.4.1. TNF-R2 PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	49
2.2.4.2. MMP-9 PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	49
2.2.5. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi ile Belirlenmesi .....	49
2.2.5.1. TNF-R2 (+587 T/G) Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP yöntemi ile Belirlenmesi .....	50

2.2.5.2. MMP-9 (-1562 C/T ) Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi .....	51
2.2.6. İstatistiksel Analizler .....	51
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....	52
3.1. PCR Sonuçları .....	52
3.1.1. TNF-R2 Geni PCR Sonuçları .....	52
3.1.2. MMP-9 Geni PCR Sonuçları .....	52
3.2. RFLP Sonuçları .....	53
3.2.1. TNF-R2 (+587 T/G) Polimorfik Bölgesinin Hin1II (NlaIII) Enzimi Kesim Sonuçları .....	53
3.2.2. MMP-9 Promotoru (-1562 C/T) Polimorfik Bölgesinin PaeI (SphI) Enzimi Kesim Sonuçları .....	57
3.3. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	61
3.4. Tartışma .....	66
KAYNAKLAR .....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	89

## SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
A.	<i>Actinobacillus</i>
AP	Agresif Periodontitis
bç	Baz çifti
C	Kontrol
C	Sitozin
CD14	Farklılaşma kümeleri 14 (Cluster of differentiation 14)
CD4 Th	T lenfositleri tarafından salgılanan CD4 hücreleri
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleotid trifosfat
DOS	Dişeti oluşu sıvısı
ECM	Hücre dışı matriks (extracellular matrix)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Fc $\alpha$	Fragment, crystallizable receptor ( Tip 1 transmembran proteini)
g	Gram
G	Guanin
GAP	Generalize Agresif Periodontitis
HLA	İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)
ICAM-1	İntersellüler adhezyon molekülü-1

IFN- $\gamma$	İnterferon gama
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
KP	Kronik Periodontitis
LT	Lenfotoksin
Lys	Lizin
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (Monosit kemoçekici proteini-1)
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MMP	Matriks metallopeptidaz (Matriks metalloproteinaz)
mRNA	Messenger RNA (Elçi RNA)
NaCl	Sodyum klorür
p	İstatistiksel anlamlılık değeri
P.	Porphyromonas
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PMN	Polimorfonükleer lökosit
pmol	pikomol
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor $\kappa$ B Ligand (NF- $\kappa$ B ligandı reseptör aktivatörü)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit

sd	serbestlik derecesi
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotit polimorfizmi)
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor (Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$ )
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (Metalloproteinaz'ın doku inhibitörü)
TLR	Tissue Leukocyte Receptor (Doku lökosit tanıma reseptörü)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör nekroz faktörü)
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor (Tümör nekroz faktörü reseptörü)
U	Ünite
V	Volt
$\chi^2$	Ki kare testi sonucunda elde edilen ki kare değeri
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

<b>Şekil 1.1.</b> Sağlıklı ve periodontitisli dişin karşılaştırılması .....	9
<b>Şekil 1.2.</b> Perodontitis Patogenezi .....	10
<b>Şekil 1.3.</b> Periodondal hasarı oluşturan immün mekanizmaların şematik gösterimi .....	13
<b>Şekil 1.4.</b> Konak-bakteri etkileşimi ile tetiklenen immün mekanizmalar .....	17
<b>Şekil 1.5.</b> TNF- $\alpha$ , RANKL ve IL-1 gibi sitokinlerin osteoklastlarda neden olduğu farklılaşma ve aktivasyon .....	22
<b>Şekil 1.6.</b> Matriks metalloproteinaz domeyninin yapısı .....	24
<b>Şekil 1.7.</b> Metalloproteinazların protein yapısı .....	25
<b>Şekil 1.8.</b> Periodontitis patogenezinde rol alan başlıca MMP'ler .....	26
<b>Şekil 1.9.</b> Metalloproteinazların kontrol mekanizması ve aktivasyon durumunda oluşan doku yıkımı .....	28
<b>Şekil 1.10.</b> Matriks metalloproteinaz-9'un yapısı .....	29
<b>Şekil 1.11.</b> İnsan geninin genel yapısı ve polimorfizmin gelişebileceği bölgeler .....	32
<b>Şekil 1.12.</b> Periodontal hastalığın çeşitli evrelerinde hedef genler, genetik tanının ilişkisi ve tedavi stratejisi .....	36
<b>Şekil 2.1.</b> TNF-R2 gen dizisi üzerinde ileri-geri primerlerin ve çoğaltılan 242 bç'lik bölgenin gösterimi .....	45
<b>Şekil 2.2.</b> MMP-9 gen dizisi üzerinde ileri-geri primerlerin ve çoğaltılan 435 bç'lik bölgenin gösterimi .....	47

<b>Şekil 3.1.</b> TNFR2 6.ekzonunda +587 bölgesindeki polimorfizmi içeren 242 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi .....	52
<b>Şekil 3.2.</b> MMP-9 promotor (-1562) bölgesindeki polimorfizmi içeren 435 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi .....	53
<b>Şekil 3.3.</b> TNF-R2 (+587) bölgesinin <i>Hin1II</i> enzimi ile kesimi sonucu K11 ,K27-K35 numaralı kontrollerden elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü ....	54
<b>Şekil 3.4.</b> TNF-R2 (+587) bölgesinin <i>Hin1II</i> enzimi ile kesimi sonucu 105-119 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	55
<b>Şekil 3.5.</b> TNF-R2 (+587) bölgesinin <i>Hin1II</i> enzimi ile kesimi sonucu 93,94,88,89,90,92,91,95,96,99,101 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	56
<b>Şekil 3.6.</b> TNF-R2 (+587) bölgesinin <i>Hin1II</i> enzimi ile kesimi sonucu üst tarafta 121-134 ve alt tarafta ise 140, 149, 148, 150, 151, 144, 143, 141, 142, 146, 149 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	57
<b>Şekil 3.7.</b> MMP-9 (-1562) bölgesinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu K1-K10 numaralı kontrollerden elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	58
<b>Şekil 3.8.</b> MMP-9 (-1562) bölgesinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu 36-45 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	59
<b>Şekil 3.9.</b> MMP-9 (-1562) bölgesinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu 144-157,161 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	60
<b>Şekil 3.10.</b> MMP-9 (-1562) bölgesinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu 123-132 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	60
<b>Şekil 3.11.</b> MMP-9 (-1562) bölgesinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu 166-175 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü .....	61

## TABLolar DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Periodontitis ile ilişkisi araştırılmış bazı genler .....	35
<b>Tablo 1.2.</b> Periodontitis ile ilişkisi araştırılan genler ve hastalık ile ilişkisi .....	37
<b>Tablo 2.1.</b> TNF-R2 (+587 T/G) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları .....	46
<b>Tablo 2.2.</b> MMP-9 (-1562 C/T) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları .....	48
<b>Tablo 3.1.</b> TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi için kontrol, KP ve AP gruplarının cinsiyet ve yaş açısından karşılaştırılması .....	62
<b>Tablo 3.2.</b> TNF-R2 (+587 T/G ) gen polimorfizmine ait kontrol KP ve AP gruplarının genotip ve allel frekans dağılımları .....	63
<b>Tablo 3.3.</b> MMP-9 (-1562 C/T) gen polimorfizmi için kontrol, KP ve AP gruplarının cinsiyet ve yaş açısından karşılaştırılması .....	63
<b>Tablo 3.4.</b> MMP-9 (-1562 C/T) gen polimorfizmine ait kontrol KP ve AP gruplarının genotip ve allel frekans dağılımları .....	64
<b>Tablo 3.5.</b> TNF-R2 ve MMP-9 SNP gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansı dağılımlarının karşılaştırılması .....	65

# 1.GİRİŞ

Günümüzde birçok yetişkin insan dişeti sorunları olduğu gerekçesiyle doktoruna başvurmaktadır. Kişilerin bu şikayetlerinin başında dişeti çekilmeleri ve dişeti iltihaplanmaları gelmektedir. Dişeti çevresi rahatsızlıklarının artması ile kişilerde diş kaybına kadar giden ağır ağız sağlığı sorunları yaşanmaktadır.

Dişeti ve çevresi hastalıkları, periodontal hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Periodontal hastalıklar, bakteriyel birikime (dental plak) karşı, kemik ve bağ dokularında inflamatuvar cevap oluşumuyla karakterize, kronik ve enfeksiyöz hastalıklardır [1]. Periodontal hastalık terimi, genel olarak gingivitis ve periodontitis başta olmak üzere önemli diş eti hastalıklarını içine almaktadır [2]. Gingivitis, dental plak bakterilerine ve onların ürünlerine karşı diş çevresi yumuşak dokularında enflamasyonla karakterize bir hastalıktır [3]. Ergenlik, menstrüel döngü ve hamilelikte görülen hormonal değişiklikler ve bazı ilaçların kullanımı gingivitis gelişimini etkileyen faktörlerdendir [4,5]. Periodontitis ise diş destekleyen periodontal ligament, alveoler kemik ve yumuşak dokularda enflamasyona bağlı yıkımla karakterizedir. Periodontitis bakterilere ve ürünlerine cevaben gelişen bir hastalık olmasına rağmen, hastalığın seyri konak doku cevabı ile düzenlenir. Genetik, kazanılmış ve çevresel faktörler, patojene karşı oluşan doku cevabını etkileyerek periodontitise yatkınlığı ve hastalık şiddetini arttırabilmektedir [6,7].

Diş çevreleyen yumuşak dokuların iltihabı olarak tanımlanan gingivitis, toplumda çok yaygın olarak görülmektedir. Periodontitis, her zaman gingivitis takiben oluşur, ancak bütün gingivitisler periodontitise ilerlemez [3].

Periodontal hastalıkların çoğu, genel olarak dişler ve çevresindeki sert ve yumuşak dokuları etkileyen; histolojik olarak dişeti ekstrasellüler bağ dokusunda inflamatuvar hücre birikimi; klinik olarak ise alveoler kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve bunu izleyen diş kaybı ile karakterizedir [1,2,3,8].

Periodontal hastalıklara ilişkin sınıflandırma, 1999 yılında gerçekleştirilen uluslararası bir çalışmada (International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, 1999) yeniden düzenlenmiştir. Bu sayede hastalığın teşhisinde ortaya çıkan bir takım çelişkiler ve sorunlar giderilmiştir

[9,10]. Periodontal dokuları ilgilendiren bu hastalıklar genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

1. Gingival hastalıklar
2. Peridontitisler
  - 2.1. Kronik peridontitis
  - 2.2. Agresif periodontitis
  - 2.3. Sistemik hastalıklarla birlikte gelişen periodontitis
3. Nekrotizan periodontal hastalıklar
4. Peridonsiyum apseleri
5. Endodontik lezyonlar ile ilişkili periodontitisler
6. Gelişimsel ya da kazanılmış deformiteler ve durumlar

Periodontitis, periodontal hastalıkların önemli bir grubunu oluşturan, diş ve dişin destek dokularını etkileyen ve oldukça yıkıcı etkilere sahip bir hastalıktır [1,2,7]. Bu hastalık, dünya üzerindeki yetişkin popülasyonun %10-15'ini etkilemekte olup, yetişkinler arasında diş kaybının en yaygın sebeplerinden biri olarak görülmektedir [11]. Hastalığın etiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, biyofilmde bulunan anaerobik bakteriler, subgingival dental plak ve hastalığa yatkın bireylerdeki aşırı bağışıklık tepkileri üzerine yoğunlaşmaktadır. Diş çevresi hastalığına neden olan patojen bakteriler konağa girmekte ve kendisine karşı immün yanıt oluşturacak saldırıyı gerçekleştirmektedir. Bu patojen-konak doğrudan etkileşimi, alveoler kemik ve periodontal ligament kaybına neden olmaktadır [12,13].

Periodontitiste, diş kaybının asıl sorumlusu alveolar kemik kaybı olduğundan bu dokudaki değişiklikler büyük önem taşımaktadır. Oluşan bu durum, periodontitisin önemli klinik belirtilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Dişeti enflamasyonu; dişetinde kızarıklık, şişlik, kanama görülmesi; periodontal cep oluşumu ve klinik ataçman kaybı gerçekleşmesi; bunlara ilaveten alveol kemik kaybı; vertikal veya horizontal kemik yıkımı oluşması hastalığın diğer klinik belirtileri arasında gösterilmektedir [14].

Genellikle diş etlerindeki kızarıklık ve kanama gingivitise (diş eti iltihabı) işaret etmektedir. Gingivitisin tetiklediği reaksiyonlar, çene kemiğine ve periodontal ligamente kadar ilerler ve bu dokulara hasar verirse, hastalığın periodontitise dönüşümü gerçekleşmiş olur. Bu süreçte, periodonsiyumu oluşturan periodontal ligament ve alveol kemiği değişik derecelerde yıkıma uğrar; böylece diş etinin diş kökünden ayrılmaya başlamasıyla "periodontal cep" denilen oluşumlar gözlenir. Periodontal yıkım sırasında, periodontal cep derinleşir, dokuda kollajen kaybı gerçekleşir. Hastalığın yıkım süreçlerinin seyri, diş kayıplarını da içine alan önemli hasarlar ortaya çıkarmaktadır [15,16].

Periodontitis, hastalığın ortaya çıktığı yaş, prognozu, şiddeti ve diş dokularında bıraktığı hasara göre üç önemli klinik forma ayrılmıştır. Bunlar: Kronik periodontitis (KP), agresif periodontitis (AP) ve sistemik hastalıklar ile birlikte gelişen periodontitistir [17].

Kronik periodontitis, bir enfeksiyon hastalığı olup, dişleri destekleyen dokularda enflamasyonun varlığı ile karakterizedir. Daha önceleri erişkin periodontitis veya kronik erişkin periodontitis olarak da tanımlanan kronik periodontitis en sık rastlanan periodontitis tipidir. Genel olarak yavaş ilerleyen bir hastalık olarak kabul edilir. Bununla birlikte, diyabet, HIV, sigara kullanımı ve stres gibi, bakteriyel plak birikimine karşı oluşan konak cevabını değiştiren sistemik, genetik veya çevresel faktörlerin varlığında hastalık daha hızlı ilerlemektedir [18]. Bu hastalık daha çok erişkinlerde görülmesine karşın, kronik plak ve diş taşı birikimine bağlı olarak çocuklarda ve adolesan döneminde bulunan gençlerde de görülebilir [19].

Kronik periodontitis, klinik olarak incelendiğinde; dişetinde renk değişikliği ve keskin olmayan yuvarlak hatlı dişeti kenarında kendiliğinden başlayan veya kolayca başlatılabilen dişeti kanaması sıklıkla görülür [20]. Kronik periodontitisi olan hastalarda görülen diğer karakteristik klinik bulgular; dişetinde enflamasyon, cep oluşumu, periodontal ataçman ve kemik kaybıdır.

Hastalık, lokal ve generalize olarak tanımlanabilir. Lokal kronik periodontitiste, ağızdaki bölgelerin %30'dan azında ataçman ve kemik kaybı bulunurken, generalize kronik periodontitiste, ağızdaki bölgelerin %30'dan fazlasında ataçman ve kemik kaybı bulunmaktadır.

Kronik peridontitiste, periodonsiyumda görülen yıkımın şiddeti zamanla ilişkilidir. Hastalık süresi uzadıkça, yıkım miktarı artmaktadır. Artan yaşla birlikte, ataçman ve kemik kaybı da artmaktadır. Hastalığın şiddeti hafif, orta, şiddetli olmak üzere üç kategoride sınıflandırılabilir. 1-2 mm'den daha az klinik ataçman kaybı varsa periodontal yıkım hafif olarak ifade edilir. Orta derecede peridontitiste ise peridontal yıkım 3-4 mm civarında olmaktadır. Periodontal ataçman kaybı 5 mm veya daha fazla ise şiddetli peridontitis söz konusudur [21].

Dişlerin ve diş-dişeti birleşim bölgelerinde, dişetin üzerinde biriken plak kronik peridontitis etiyojisinde primer faktör olarak kabul edilir. Ataçman ve kemik kaybı, subgingival plaktaki Gram (-) mikroorganizmalardaki artışla ilişkilidir. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola* ve spiroketler KP'nin oluşumu ve ilerlemesinde rol alan başlıca periodontopatojenlerdir [22, 23, 24, 25]. Bu popülasyon içinde özellikle patojenik ve virulan olduğu bilinen *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*) ve *Treponema denticola* gibi bakterilerdeki artışın, ataçman ve kemik kaybı ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [26]. Dişin anatomik yapısı, çürük ve kök rezorbsiyonları gibi plağın birikmesini kolaylaştıran veya etkisini artıran değişik lokal faktörlerin de kronik peridontitis için ikincil önem arz ettiği vurgulanmıştır. Ancak, konakta sistemik hastalık mevcut ise (diabet, HIV vb.) peridontal yıkımın miktarı oldukça artmaktadır. Ayrıca sigara kullanımı, stres gibi çevresel ve davranışsal faktörler hastalığın seyrini olumsuz yönde etkilemektedir [27].

Agresif peridontitis, genellikle sistemik açıdan sağlıklı, 30 yaşın altındaki bireylerde görülen peridontitis tipidir. Hızlı peridontal ataçman ve alveolar kemik kaybı ile karakterizedir. Hastalıkta kalıtsal geçiş söz konusudur [10].

Hastalığın seyrinde, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* bakterilerinin seviyesinde artış, fagositoz anomalileri, hiper-yanıtlı makrofajlar ve prostaglandin E2 ve IL-1 $\beta$  üretiminde artış gözlenmiştir [19].

Agresif peridontitis, ağız içi tutulumu göre ikiye ayrılır. Lokalize agresif peridontitis, ergenlik döneminde başlar. Lokalize olarak birinci büyük azı ve

kesici dişleri etkiler. Kronik periodontitisten ayrılan en belirgin özellikleri, hastalığın başlama yaşı, daha hızlı ataçman ve kemik kaybı, subgingival floranın kompozisyonu, kalıtsal özelliği ve farklı immün yanıtın görölmesidir. Enfekte edici ajanlara karşı güçlü serum antikor yanıtı görölmektedir. Generalize agresif periodontitis ise, genellikle 30 yaşın altındaki bireyleri etkilerken, daha yaşlı bireylerde de görölebilir. Generalize proksimal ataçman kaybı vardır. Birinci büyük azı ve kesici dişler dışında en az üç diş daha etkilemektedir. Periodontal yıkımın dönemsel tekrarı mevcuttur. Enfekte edici ajanlara karşı zayıf serum antikor yanıtı görölmektedir [28].

Periodontitis, sistemik hastalıklarla birlikte de gelişebilir. Genetik ve hematolojik hastalıklara sahip birçok bireyde periodontitis gibi diş hastalıkları meydana gelmektedir. Bunun nedeni, lökosit ve nötrofil sayısındaki azalmayla antijenlere karşı verilen yanıtın başarısız olmasıdır. Ayrıca, sistemik hastalıklara bağlı olarak doku oksijenlenmesindeki azalma ve savunma hücrelerinin damar dışına çıkışında kısıtlama ve hastanın tükürük sekresyonunda azalma periodontitise zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle periodontitis tanısında hastanın sistemik durumunun bilinmesi çok önemlidir.

Bu şekilde gelişen periodontitise neden olan bazı sistemik hastalıklardan hemoglobin rahatsızlıkları için kazanılmış nötropeni, lösemi örnek verilebilirken; genetik hastalıklar için Down sendromu, Lökosit Adezyon Bozukluğu sendromu, Cohen sendromu gibi hastalıklar örnek verilebilir [17,28].

Farklı popölasyonlarda yapılan istatistiksel değerlendirmeler periodontitisin önemli bir sağlık sorunu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çünkü bu hastalık, yetişkinlerde diş kaybının en önemli nedenlerinden birisi olmakla birlikte, en yaygın diş minesini de oluşturmaktadır [29]. Yaklaşık olarak 35 yaşına kadar olan diş kayıplarında diş çürümelere önemli olurken, bu yaşın üzerindeki kişilerde ise periodontitis en önemli etkenlerden biri olmaktadır. Yapılan bir araştırmaya göre, 15 yaşından sonra meydana gelen diş kayıplarının %50'si periodontitis kaynaklı hastalıklardan olmaktadır [17]. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayanların %20'si periodontitis hastasıdır. Ayrıca bu ülkede 40 yaşından sonraki diş kayıplarının %60-70'i bu hastalık nedeniyle olmaktadır [30]. Yapılan bir diğer çalışmada, Hindistan'da 30 yaşından sonra çekilen dişlerin %80'inin nedeninin periodontitis kaynaklı hastalıklardan olduğu gösterilmiştir [31].



Hastalığın görölme insidansının bu denli yüksek olması, hastalığın patogeneğinde rol oynayan faktörleri önemli hale getirmiştir. Perodontitisin patogeneğinde rol oynayan temel faktörleri, mikrobiyal dental plak, çevresel ve kazanılmış faktörler, genetik risk faktörleri ve mevcut periodontal ve sistemik hastalıklar gibi başlıklarda inceleyebiliriz.

Loe ve ark. tarafından yapılan çalışmada, mikroorganizmaların periodontitis oluşumu için temel etken olduğu ortaya konmuştur [32]. Konak savunma sistemi, bakterilerin antijenlerine, lipopolisakaritlere (LPS) ve diğer virülans faktörlere karşı antikorlar ve polimorfonükleer lökositlerle yanıt verir. Hastalık ilerledikçe, diğer savunma sistemi elemanları da bu sahnede yerlerini alırlar. Bu mücadelede sonucunda, konak savunma hücrelerinden kaynaklanan sitokinler, prostanoidler, matriks metalloproteinazlar ve diğer moleküller ortama salınır. Böylece bakteriler, konak savunma sistemini aktive ederek dolaylı olarak bağ dokusu ve kemikte yıkım meydana getirirler. Aslında, ortamda bulunan bağışıklık sistemi hücreleri, fibroblastlar ve osteoblastlar başta olmak üzere konak savunma hücreleri, periodontal dokuların savunmasından ve bütünlüğünün korunmasından sorumludur. Bağışıklık sistemi hücreleri bu fonksiyonlarını yerine getirirken bir yandan da doku hasarına ve yıkıma yol açabilmektedir [33].

Ağızda bulunan periopatojen bakteriler ve diğer etmenler, konak immün mekanizmalarını tetikleyici etki yaratırlar. Böylece, aslında konağı koruma amaçlı olan bu immün mekanizmaların aşırı cevabı ile ortama eklenen konak kaynaklı enzimlerin, sitokinlerin ve diğer pro-inflamatuar maddelerin etkisi, daha fazla miktarda periodontal doku ve alveol kemiğı rezorbsiyonuna neden olmaktadır [34,35].

Periodontitis, etiolojisinde çevresel ve genetik faktörler başta olmak üzere birçok faktörle ilişkili olması sebebiyle kompleks hastalıklara örnek teşkil etmektedir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, periodontitis hastalığının genetik faktörlerle de ilişkili olduğunu ve bu hastalıkta etkili bazı genlerin varlığını ortaya koymuştur. Birçok araştırmacı, periodontitis ve polimorfizm arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Bireyin ailesel genetik geçmişi, periodontal hastalığa yatkınlığını ve

hastalığın görülme şiddetini etkileyebilmektedir. Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili interleukin-1 (IL-1), tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler, insan lökosit antijenleri (HLA), matriks metalloproteinazlar (MMPs), katepsin-C, vitamin D gibi proteaz ve yapısal moleküllere ait genlerin ekspresyonu ve genetik polimorfizm ilişkileri ile ilgili pek çok genetik çalışma yapılmıştır. Perodontitis hastalığının genetiği ile ilgili çalışmalarda incelenen polimorfizmler üç ana başlık altında toplanabilir. Bunlar, enzim polimorfizmleri, sitokin ve büyüme faktörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler ve ilgili reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerdir [36,37,38,39,40,41].

Özellikle sitokinler ve reseptörlerindeki polimorfizmler, periodontal hastalıkların belirlenmesinde potansiyel belirteçler olarak kullanılmaktadır. Periodontitisin patogeneğinde önemli role sahip olan genetik polimorfizmlerden bir tanesi de TNF- $\alpha$  gen polimorfizmleridir. TNF- $\alpha$ , TNF sitokininin iki birleşik proteininden biridir [42]. TNF- $\alpha$  yüksek afinite gösterdiği hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak çeşitli biyolojik etkileri yönetir. Bu sitokinin çeşitli biyolojik etkilerinin yanı sıra, kemik rezorpsiyonuna neden olan etkisi de vardır [43]. Makrofajlar ve yardımcı T hücreleri tarafından salgılanırlar. TNF- $\alpha$ 'nın iki tane hücre yüzey reseptörü vardır. Bunlar: TNF reseptör 1, (TNF-R1, p55 TNFR) ve TNF reseptör 2'dir (TNF-R2, p75 TNF-R). Her iki reseptör, makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve fibroblastları içeren hemen hemen tüm hücre tiplerinden eksprese edilirler [44]. Yapılan son çalışmalarda, TNF-R2 geninin (+587 T/G) pozisyonunda meydana gelen mutasyonların otoimmün hastalıklar ve diğer sistemik hastalıklarla ilişkili olduğu önerilmiştir. TNF-R2 (+587 T/G) polimorfik allellerinin Japonya'da yapılan bir araştırmada şiddetli kronik periodontitis ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [45].

TNF- $\alpha$  gibi periodontitisle ilgili genetik polimorfizmlerden bir diğeri de matriks metalloproteinaz (MMPs) genlerine ait polimorfizmlerdir. Matriks metalloproteinazlar hücreler arası matriksi sindiren yaklaşık 25 enzimli bir ailedir. Matriks metalloproteinazlar embriyonik gelişim, morfogenez, anjiyogenez, doku onarımı ve periodontitis gibi inflamatuvar rahatsızlıklarda bağ dokusu yıkımından sorumludur. MMP'ler, perodontitisli hastalarda kök yüzeyine bağlı bulunan kollajen liflerinin ve ekstrasellüler matriksin yıkımından sorumludur [46]. MMP'ler bu yıkımla, periodontal cep oluşumuna neden olmakla

birlikte periodontal dokularda yıkımın genişlemesine sebep olur. MMP'lerin birçok tipi mevcuttur [47]. Bunlardan MMP-2 (jelatinaz A), MMP-9 (jelatinaz-B), MMP-12 (makrofaj metalloelastaz), tip 4 kollajenin ve hücre dışı matriksin (ECM) kollajen olmayan bileşenlerinin yıkımından sorumludur. Periodontitis hastalarının dişeti dokusunda, periimplant oluk sıvısında, dişeti oluğu sıvısında MMP-2 ve MMP-9'un yükselmiş seviyeleri tespit edilmiştir [47,48]. Türkiye'deki kronik periodontitis hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada MMP-2, -9,-12 genlerinin allel frekansları ve genotip dağılımları, kronik periodontitis ve kontrol grubunda benzer bulunmuştur. Bunun yanında, MMP-9 geninin -1562 pozisyonunda T alleli bulunduran bireylerin, kronik periodontitis bakımından daha az risk taşıdığı gösterilmiştir [49].

Bu çalışmanın amacı, Türk popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme, TNF-R2 geninin (+587 T/G) pozisyonunda ve MMP-9 geninin promotor bölgesinde (-1562 C/T) pozisyonunda yer alan polimorfizmler ile periodontitis arasındaki ilişkiyi PCR-RFLP tekniği kullanarak araştırmak ve bu polimorfizmlerin Türk popülasyonunda genotip dağılımını ve allel frekanslarını tanımlamaktır.

Bu araştırma kapsamında, üç çalışma grubu bulunmaktadır. Bunlar: Agresif Periodontitis (AP), Kronik Periodontitis (KP) ve Kontrol (K) gruplarıdır. TNF-R2 geni ile ilgili çalışmalarda, TNF-R2 geninin +587 T/G bölgesini içine alan özgül primerler tasarlanarak, ilgili gen bölgesi çoğaltılmış ve uygun restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak RFLP yöntemi uygulanmıştır. MMP-9 geninin promotor bölgesi ile ilgili çalışmalarda ise, MMP-9 geninin promotorundaki -1562 C/T bölgesini içine alan özgül primerler tasarlanarak ilgili bölge çoğaltılmış ve uygun restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak RFLP yöntemi uygulanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, çalışmada aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

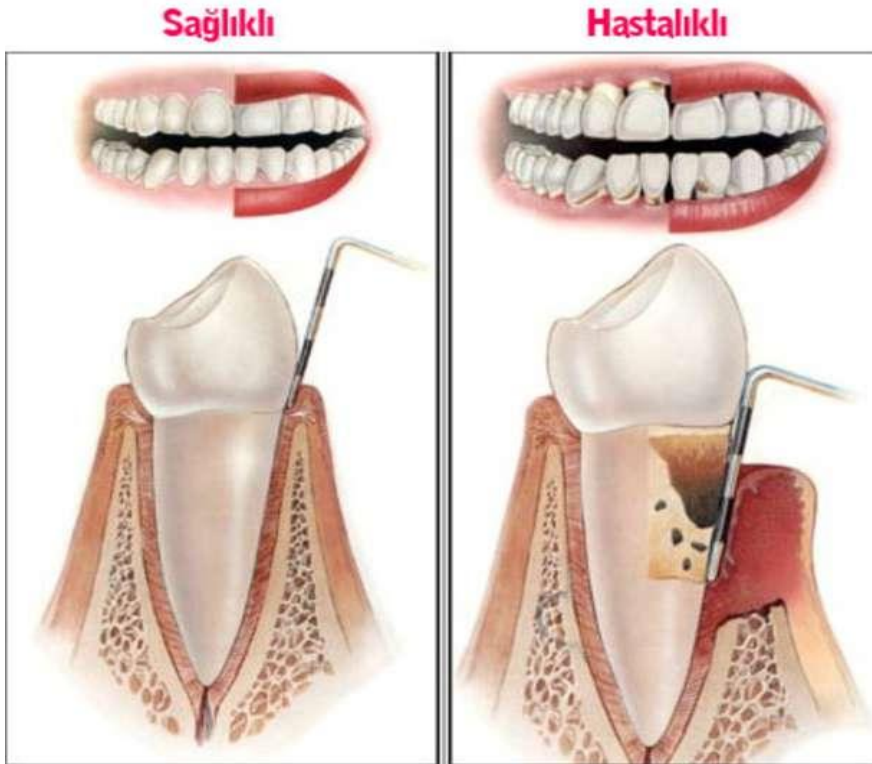
1. Hasta ve sağlıklı bireylere ait kan örneklerinden DNA izolasyonu,
2. TNFR2 ve MMP-9 genlerine ait seçilen SNP'leri içeren bölgelerin PCR ile çoğaltılması,
3. Çoğaltılan fragmentlerin *Hin1II* ve *PaeI* restriksiyon enzimleriyle belirli bölgelerinden kesilerek, oluşan fragmentlere göre her bireyin genotip profillerinin belirlenmesi,

4. Türk popülasyonu için ilgili genlerin allel frekansları ve genotiplerin belirlenmesi, sonuçların farklı popülasyon gruplarıyla yapılan çalışmalarla karşılaştırılması işlemleri gerçekleştirilmiştir.

## 1.1. Genel Bilgiler

### 1.1.1. Periodontitis Patogenezi

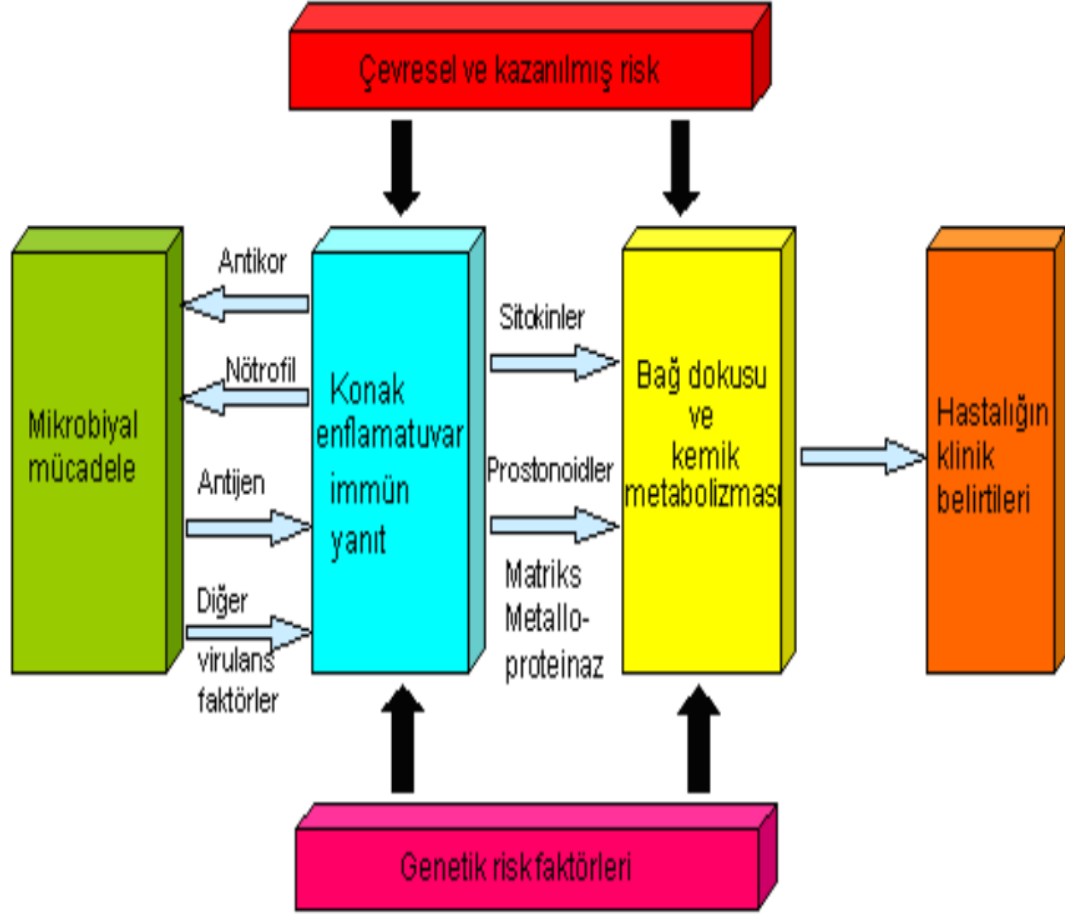
Periodontitis, dişler ve periodonsiyumu etkileyen, konak savunma elemanlarının mikrobiyal faktörler ile giriştikleri savaşın sonucunda ortaya çıkan, yangısal bağışıklık yanıtının görüldüğü kronik bir hastalıktır [50] [Şekil 1.1.]. Periodontal hastalıkların en yaygın formu olan kronik periodontitis, erişkin popülasyonunun %30'unda görülmekte olup, bunun %7-13'ünü ileri periodontitisli bireyler oluşturmaktadır [51].



**Şekil 1.1.** Sağlıklı ve periodontitisli dişin karşılaştırılması [50]

Hastalığın bu kadar yüksek insidanda görülmesi ve ağız sağlığında ciddi hasarlar oluşturması hastalığın patogenezinde rol oynayan faktörleri önemli

hale getirmiştir. Periodontitisin patogenezinde rol oynayan faktörler Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.2.** Periodontitis Patogenezi [52]

Periodontal hastalıkların patogenezinde sırasıyla kolonizasyon, invazyon, doku yıkımı, iyileşme ve fibrozis aşamaları mevcuttur [52].

Periodontitis hastalığının oluşumunda ilk adım, periodontal dokuların patojen bakterilerle kolonizasyonudur [34]. Ağız, vücudun diğer dış yüzeylerinde olduğu gibi konakla simbiyoz yaşayabilen temel bir mikrofloraya sahiptir. Ağız florasında çok çeşitli aerobik ve anaerobik bakteri türleri yaşamakta ve diş yüzeyinde bireysel ya da karışık koloniler oluşturmaktadırlar. Periodontal hastalıklar göz önüne alındığında ise, diş plağının oluşumunda Gram (-) ve anaerobik bakterilerin varlığında bir artış gözlenmiştir. Sağlıklı koşullar

varlığında, bakteri yoğunluğu ve konağın direnci dengelenmiş durumdadır. Bu denge hali, bakteri sayısındaki artışı veya direnç düzeyindeki azalış nedeniyle bozulur; bu bozulma ile birlikte mikroorganizmalar bu dokularda çoğalır ve bakteri plağı kütlesi artar [51,52].

Hastalıkta bakterinin veya ürünlerinin invazyonu da önemlidir. Konak dokularının invazyonu gingivitis, ileri kronik periodontitis, lokalize agresif periodontitis gibi periodontal hastalık çeşitlerinde görülmektedir. Doku invazyonu yeteneği olan bakteriler, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* gibi hastalık oluşturma kapasitesi yüksek olan bakterilerdir. Yapılan çalışmalarda, agresif peridontitis vakalarında dişeti bağ dokusunun derinliklerinde *Actinobacillus actinomycetemcomitans* patojeninin varlığı sıklıkla gözlenmiştir. Bu patojen bakteri, toksik moleküllerini ve enzimlerini doku içine etkin olarak salgılamaktadır [52,53].

Diş minesinde ya da sement duvarında kolonize olmuş mikroorganizmalar, doku hasarına direkt yada indirekt etkilerle neden olabilirler.

Direkt etkiler; dokuyu doğrudan yıkan bakteriyal komponentlerin etkileri sonucudur. Bu komponentler, mikroorganizmalarca oluşturulan, doku yıkımına neden olan histolitik enzimler, endotoksinler, ekzotoksinler ve toksik olmayan ama hücre fonksiyonlarını engelleyen ürünlerdir. Örneğin; *Porphromonas gingivalis* tarafından salgılanan kollajenaz, histolitik enzimlere örnek olarak verilebilir. Bu enzim, konak hücredeki kollajeni parçalayarak, bağ dokusu ataçmanının yıkılmasına neden olmaktadır. Hiyaluronidaz gibi, doku hiyaluronik asidini eriten bakteriyel enzimler de periodontitis patogeneğinde rol oynamaktadır. Ayrıca mukopeptidler, amonyak, hidrojen sülfid, indol, formik ve bütirik asitler de konak için toksik ve yıkıcı etkiye sahip diğer mikrobiyal dental plak ürünleridir. Ayrıca, endotoksinler, lipopolisakkaritler gibi bakteriyel komponentler de, kemik rezorpsiyonunun uyarıcılarıdır [51,52,53].

İndirekt etkiler ise enfekte edilen dokuda başlatılan konak cevaplarıdır. Periopatojen olarak kabul edilen mikroorganizmalar direkt etkiler ile doku yıkımını başlatıp, konağın doku hasarına sebep olan mekanizmalarını indirekt yolla aktive ederek yıkıcı etkilerini arttırmaktadır. Konağın immünolojik

mekanizmalarının aktivasyonu ile, fibroblastlarda patolojik değişiklikler, kollajenaz ve bazı hidrolitik enzimlerin salınmasına neden olan makrofaj aktivasyonu ve aktive mononükleer hücrelerce oluşturulan IL-1, prostaglandinler, TNF gibi ürünlerin oluşumu meydana gelmektedir. LPS, toksinler ve histolitik enzimler gibi bazı mikrobiyal ürünler, yıkıcı enzimlerin ekspresyonundan sorumlu hücrelerin popülasyonunun artışına neden olmaktadır. Tüm bu konak mekanizmalarının aktivasyonu ile aşırı bağışıklık cevabı sonucu kemik ve ataçman kaybı artmaktadır.

İyileşme ve fibrosiz aşamasında ise, periodontal dokularda enflamasyon çözülür ve iyileşme gerçekleşir. Periodontitiste olduğu gibi periodontal hastalıkların da aktif ve pasif dönemleri mevcuttur. Pasif dönem, enflamasyonun azalması, dişeti bağ dokularının onarımı ve sıklıkla gingival fibröz ile karakterizedir. Hastalığın aktif dönemlerinde meydana gelen yıkıcı etkilerin aksine pasif dönemlerde meydana gelen bu spontan iyileşme nadiren kalıcı olarak kayıp dokuları onarmakta, çoğunlukla önceki periodontitisin belirtileri olarak kalmaktadır.

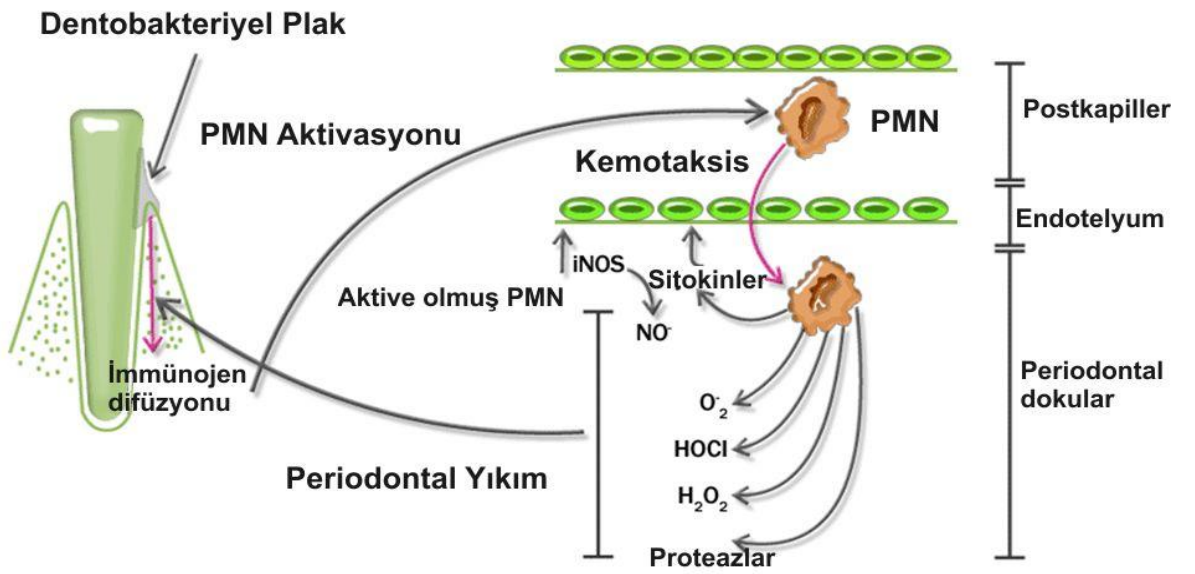
Periodontitis patogenezi dört aşamada özetlenmesine rağmen, bu değişikliklerin zamanlaması ve oluşumu oldukça karmaşık ilerlemektedir. Örneğin; kolonizasyon her zaman diğer aşamalardan önce gerçekleşmekte, ancak invazyon ve doku yıkımı birlikte oluşabilmektedir. Hastalığın patogezinde belirtilen aşamalar, hastalığın tanı ve tedavisinde olduğu kadar, hastalığın seyrinde de önem arz etmektedir [51,52,53,54].

### **1.1.2. Periodontitis İmmünolojisi**

Periodontitis sırasında oluşan sürekli bakteriyel enfeksiyondan dolayı, konak cevabı genel olarak iki başlık altında incelenebilir. Bunlar, doğuştan ve sonradan kazanılan adaptif immün cevaptır. Doğuştan immün cevap, daha önce akut cevap olarak adlandırılan immün cevapla birçok benzerlik taşırken; adaptif cevap da daha önce kronik cevap olarak adlandırılan immün cevapla bazı benzer özellikler göstermektedir. Adaptif immün cevap, özgün antijenlerce indüklendiğinden daha etkili olarak çalışır; fakat etkisinin arttırılması için daha uzun bir zaman dilimi gerekmektedir. Bazı durumlarda, doğuştan ve adaptif immün cevap arasında çapraz sinyal etkileşimi görülmektedir. Bununla birlikte,

adaptif immün cevapla interferon gama gibi (IFN- $\gamma$ ) sitokinlerin üretimi, monositleri uyarak doğuştan immün cevabı arttırmaktadır [55].

Ağızda bulunan patojen bakteriler, bu immün mekanizmaları tetikleyici özellik gösterirler. Ancak oluşan yangı, her ne kadar konağı bakteri istilasından korumada etkiliyse de, ikincil hasarlara neden olabilmektedir. Bu yolla, ortama eklenen konak kaynaklı enzimlerin, sitokinlerin ve diğer pro-inflamatuar maddelerin etkisi ile daha fazla miktarda ECM yıkımı ve alveol kemiği rezorpsiyonu oluşarak periodontitis ortaya çıkar ve ilerler [56,57] [Şekil 1.3.].



**Şekil 1.3.** Periodondal hasarı oluşturan immün mekanizmaların şematik gösterimi (<http://www.antioxidantes.com.ar/Art-272.htm>) [57]

### 1.1.2.1. Konak-bakteri etkileşimi ile tetiklenen immün mekanizmalar

Periodontal hastalıkların başlamasında primer etiyolojik ajan bakteri plağıdır [39]. Periodontal dokularda hastalığa geçişte, mikrobiyal kompozisyon Gram (+) aerobik koklardan, Gram (-) anerobik bakterilere doğru değişiklik göstermektedir [40]. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* ve *Tannerella forsythensis*, diş etinde bulunan en önemli ve en yaygın anaerobik Gram (-) bakteriler olup bu bakterilerin periodontitisin değişik tiplerindeki etkileri oldukça önemlidir [58]. Yapılan araştırmalar, hastalığın immün mekanizmalarının aktivasyonunda bu patojen



mikroorganizmaların etkilerini doğrulamaktadır. Baker ve arkadaşları tarafından yapılan bir arařtırmada, varlıđı periodontitise neden olduđu dűřünűlen siyah pigmentli Gram (-) ve anaerobik bir bakteri olan *P.gingivalis* tarafından űretimi indűklenen IL-1, TNF, IL-6, prostaglandin metabolitleri ve interferon gama gibi űzgűl dűzenleyiciler sayesinde kemik kaybının gerűekleřtirildiđi gűsterilmiřtir [59,60]. Socransky ve arkadaşları tarafından yapılan bir űalıřmada da, *P.gingivalis* miktarının, periodontal doku kaybı gűrűlen hastalarda űlűűlebilir dűzeyde olduđu ve hayvan modellerinde doku hasarına neden olduđu bulunmuřtur [58,25]. Yapılan bařka bir űalıřmada ise, enfekte olmuř diřin kűk kanallarından *P.gingivalis* izole edilmiřtir [61]. *P.gingivalis* ile yapılan bařka bir arařtırma sonucunda, bu bakterinin *in vivo* řartlar altında fibroblast apoptozunu artırdıđı gűsterilmiřtir. Bu sonuű, TNF reseptűrű eksikliđi olan fareler űzerinde yapılan deneylerde, *P.gingivalis* nedenli fibroblast apoptozunun űnemli űlűűde azaldıđı kanıtına dayandırılmıř ve oluřan kemik kaybı ve doku hasarının bakterinin űrűnlerinden ziyade konak kaynaklı bađıřıklık cevabı sayesinde oluřtuđu bulunmuřtur [33]. Polak ve arkadaşları tarafından hayvan modelleri űzerinde yapılan deneylerde, *Porphyromonas gingivalis*'in *Fusobacterium nucleatum* ile sinerjistik etkiye sahip olduđu ve *P.gingivalis* / *F.nucleatum* ile gerűekleřen űoklu mikrobiyal enfeksiyonun, tek bařlarına gerűekleřtirdiklerinden daha fazla miktarda periodontal kemik kaybına ve yangıya neden olduđu gűsterilmiřtir [62,63]. Bakterilerin yanı sıra Human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus gibi virűslerin de periodontitis etiyolojisi iűerisinde yer aldıđı tespit edilmiřtir [64].

Plak bakterilerinin diř yűzeyi ve diřeti kenarında birikmesi yangı cevabı bařlatmaktadır. Yapılan űalıřmalar bu cevabın bařlamasını ve aűıđa űıkardıđı sonuűları doğrulamaktadır. İnflamasyon, organizmanın biyolojik, fiziksel ya da kimyasal uyarılara karřı oluřturduđu vaskűler ve hűcresel olayları iűeren bir reaksiyondur. İnflamatuar cevabın amacı, yara iyileřmesinin sađlanması, hasarlı ya da deđiřikliđe uđramıř dokuların tamiri ve konađı enfekte eden mikroorganizmaların uzaklařtırılmasıdır [35]. Her ne kadar inflamasyonun, dođal bađıřıklıđın bir kolu olduđu dűřűnűlse de, son bilgiler, iltihabi yanıtın dođasında uyarana bađlı deđiřiklikler olabileceđi ve bu deđiřikliklerin de űzel reseptűrler ve sinyal iletim mekanizmaları tarafından gerűekleřtiđini

doğrulmaktadır [65]. Gram (-) bakterilerin ortak antijeni olan LPS, Gram (-) bakterilerin zarında bulunan ve lipit A, antijen O ve oligosakkaritin birbirine bağlanması sonucu oluşan bir virülans faktördür. LPS doğal immün cevabın güçlü bir aktivatörüdür. LPS, çözülebilir LPS-bağlayıcı protein, monosit ve nötrofil gibi konak savunma hücrelerinin membranlarında bulunan yüzey reseptörü CD14 ve Toll-benzeri reseptörler gibi konak reseptörleri tarafından tanınır. Bakteri LPS'i ve konak proteinleri arasındaki bu etkileşim, iltihabi medyatörlerin salınımına yol açan hücreler arası olayları tetikler. Bu etkileşimler, Gram (-) bakterilere karşı gelişen inflamatuvar cevabın, Gram (+)'lere göre neden daha baskın olduğunu açıklayabilir. Konak-bakteri etkileşimini oluşturan bu özel mekanizmalar, konağın patolojik bakteriyel uyarınları ayırt etmesine ve uyarana özgü yeterli cevap oluşturabilmesine olanak sağlamaktadır [56].

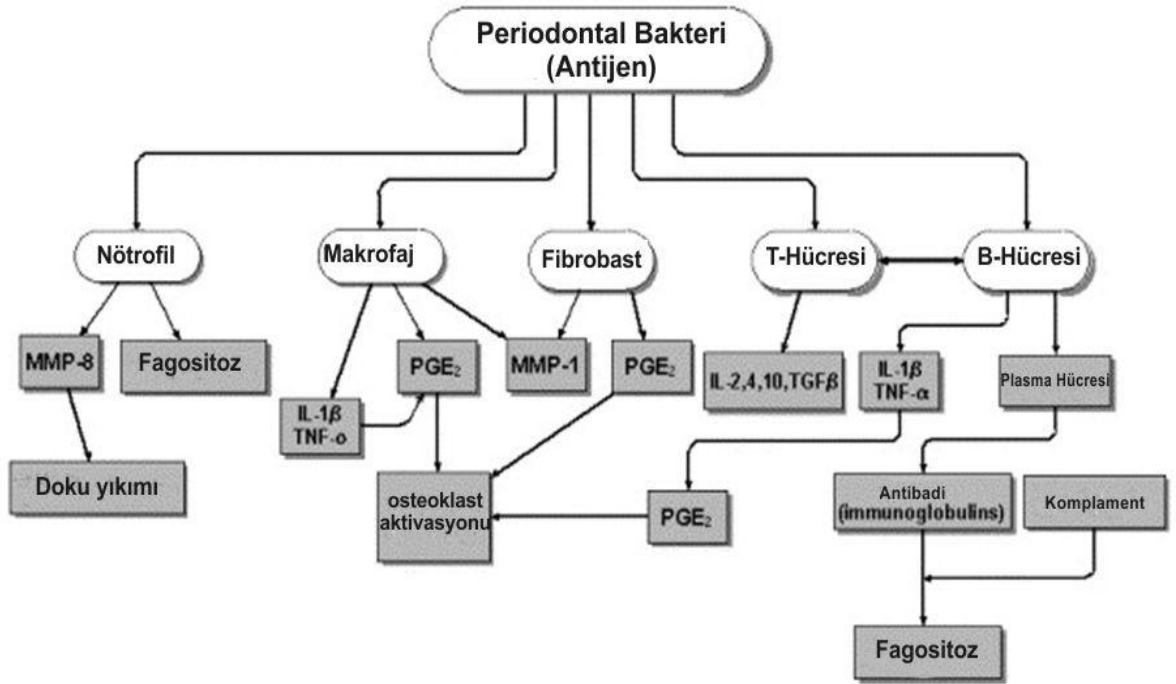
Akut inflamasyonda ilk basamak, damar geçirgenliğinin artışıdır. Diş eti kenarındaki aerobik ve anaerobik bakteriler, metabolik asitler, hücre-dışı enzimler ve LPS gibi birçok metabolit salarak, epitel ve bağ dokusunda hasara yol açarlar. Bağ dokusundaki mikrovasküler yapının etkilenmesi sonucu, histamin ve bradikinin gibi vazoaaktif medyatörler salınır [66]. Mikrobiyal plaktan salınan ve dokuda iltihabi yanıtın başlaması ile ortaya çıkan kemotaksik medyatörlerin (IL-8, C5a...vb.) etkisi ile damardan dokuya doğru lökosit göçü gerçekleşir. Enfekte bölgeye ulaşan lökositler periodontal dokularda, dişeti oluşu sıvısı (DOS) oluşturur. E-selectin ve ICAM-1 (intersellüler adhezyon molekülü) gibi adhezin molekülleri, nötrofillerin kan damarlarından dokuya geçişini yönlendirir. Bakteriyel ürünler ve endotel hücrelerinden salınan adhezin molekülleri, nötrofillerin damar endoteline yapışarak ilerlemesini ve lizozomal granüller, kollajenaz ve elastaz gibi yıkıcı enzimlerin salınımı ile eş zamanlı olarak endotel bazal membranından dışarı doğru hareket etmelerini sağlar [67]. Dokuda nötrofiller, kemotaktik faktörlerin oluşturduğu yoğunluk farkını algılayarak hareket ederler. Nötrofiller için kemoatraktan olan kompleman C5a, bakteriyel orijinli formil methionilpeptidler ve LTB4' ün yanısıra, kemotaktik sitokin IL-8, nötrofil hareketi sırasında önemli rol oynar. Bu faktörler, spesifik reseptörler ve kompleman tarafından yönlendirilir. Nötrofillerin, periodontal patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturan hücreler olmalarına rağmen, konak dokuda yıkıma yol açabilecek lizozomal enzimleri ve araşidonik asit

metabolitleri gibi pro-inflamatuar medyatörleri sentezledikleri de bilinmektedir. Nötrofil-bakteri etkileşiminin, fibroblastlar, endotel hücreleri ve keratinositler gibi birçok konak hücrelerini hasara uğratabileceği gösterilmiştir [68]. Akut iltihabi yanıtın başlamasından hemen sonra T ve B lenfositler, DOS içinde yoğunlaşmaya başlar. Antijen ve yoğun sitokin varlığında bu hücreler genişleyip çoğalarak CD4+ ve CD8 T hücrelerini oluştururlar ve B hücreleri de antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşür [69]. Akut inflamasyonda en önemli fagositler nötrofillerken, kronik inflamasyon sürecinde bu görevi makrofajlar üstlenmektedir. Makrofajlar, kronik inflamasyonu karakterize eden hücrelerdir. Bu hücreler, fagositik kapasitelerinin yanısıra, antijenlerin tanınması, immün cevabın oluşması, tamirde rol alan medyatörlerin ve IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi gibi fonksiyonlara sahiptirler. Uzun süreli kronik inflamasyonda makrofaj sayısında görülen artış, periodontal hastalıkta da gözlenmektedir [70,71]. Mononükleer fagositler de nötrofillerle aynı kemoatraktan faktörlere (örneğin C5a) yanıt verirler. Bunun yanı sıra plateletler, nötrofiller ve monositler gibi birçok hücre tipinden salınan TGF- $\beta$  da, makrofajlar için güçlü bir kemoatraktandır. Makrofajlar bir yandan nötrofil fonksiyonunu düzenlerken, diğer yandan inflamatuvar lezyonun ilerlemesinde güçlü etkiler gösteren iltihabi medyatörleri üretirler [Şekil 1.4.].

Periodontal hastalıkta, kronik inflamasyon süreci boyunca, antikor cevabının, bakteriyel patojenlerin uzaklaştırılması ve hastalığın ilerlemesinin önlenmesinde koruyucu rol oynadığı ileri sürülmektedir [72,73]. Antikorlar, B lenfositler tarafından üretilerek salgılanmaktadır. B-lenfositler, hücre yüzeyindeki immünglobülin (Ig) molekülünün varlığı ile ayırt edilir. Ancak, B-hücre cevabı, T hücrelerinin yardımıyla gerçekleşmektedir. T hücreleri, hücre-hücre kontağı ve sitokinler yoluyla B hücrelerini uyarır. Aktive olan B-hücreleri değişime uğrar ve antikor oluşturan olgun plazma hücrelerine dönüşürler [74]. Lokal poliklonal B hücre aktivasyonunun, lezyonun periodontitise ilerlemesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Eğer oluşturulan antikor cevabı bakteriyel patojenin konak dokularından eliminasyonunu sağlayabilirse, periodontal dokuların daha fazla yıkıma uğraması engellenmiş olur. Oluşan antikor cevabı, immün regülatör genler tarafından kontrol edildiği için, antikorun koruyucu aktivitesi bireyden bireye farklılık gösterir. Antikor cevabının yeterli aktiviteyi gösterememesi, zayıf

anti-bakteriyel özelliklere sahip olması ya da iltihabi hücrelerin antikorları yeterince tanıyamaması gibi faktörlerden kaynaklanabilir [73]. Mikrobiyal enfeksiyonu ortadan kaldırmak ve periodontitis gelişimini önlemek için nötrofil göçü, antikor üretimi, kompleman aktivasyonu ve sitokinler gibi konağa ait birçok savunma mekanizması harekete geçer. Periodontitiste, inflamatuar cevap iki tarafı keskin bıçak gibidir. Bir taraftan dokulara bakteriyel invazyonu önlemek üzere koruyucu rol oynarken, diğer taraftan enflamasyon kronikleştikçe iltihabi medyatörlerin sürekli ve fazla miktarda sentezlenmesi sonucu, konak dokularında geri dönüşümsüz yıkıcı etkilere yol açar. Konağa ait yıkıcı ve koruyucu mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması ve immün yanıtın konak aleyhine dönmesi, dişi destekleyen dokularda yıkıma neden olmaktadır [Şekil 1.4] [75].

Peridontal yıkım ise, kısa süreli “aktif”, uzun süreli “kararlı” dönemlerden oluşmaktadır. Meydana gelen periodontal yıkım, bağlantı epitelinin apikale göçü ile oluşmakta, periodontal ligamentin yıkımı ve alveol kemiği yıkımı şeklinde devam etmektedir [74,75].



**Şekil 1.4.** Konak-bakteri etkileşimi ile tetiklenen immün mekanizmalar (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898104000543>) [65]

### 1.1.2.2. Periodontitiste sitokinlerin rolü

Sitokinler lokal, sistemik ve iltihabi cevapları düzenleyen, yara iyileşmesi, hematopoezis gibi birçok biyolojik olayda görev alan, hücrelerin birbiri ile iletişimini sağlayan, bağışıklık yanıtını düzenleyici moleküllerdir [76]. Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından salgılanmakta, mikroplar ve diğer antijenlere karşı cevap olarak üretilmektedir. Farklı sitokin tipleri farklı tipte yangısal ve bağışık cevabın düzenlenmesini sağlar. Düşük moleküler ağırlıklı protein ve glikoprotein yapısındaki sitokinler, T hücreleri, B lenfositler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerine ek olarak; fibroblast, epitel hücreleri, dendritik hücreler, keratinositler gibi birçok hücre tipinden de salgılanmaktadır.

Sitokinler, immünite ve inflamasyonun başlamasında; immün cevabın süresinin ve büyüklüğünün belirlenmesinde etkilidir. Çok küçük konsantrasyonlarda bile etkilerini gösterirler. Hedef hücreler üzerindeki spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Çoğu sitokinin, değişik hedef hücreler üzerinde birden çok etkileri vardır [77]. İmmün yanıtı yönlendiren kompleks sitokin ağı, pro-inflamatuar sitokinleri, anti-inflamatuar sitokinleri ve spesifik sitokin reseptörlerini içermektedir. Anti-inflamatuar sitokinler ve spesifik sitokin reseptörleri, pro-inflamatuar sitokin cevabını kontrol ederek inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar [78]. Fizyolojik koşullarda, sitokin inhibitörleri ve anti-inflamatuar sitokinler iltihabi yanıtı düzenlerken, inflammatuar reaksiyonların potansiyel zararlı etkilerini de kontrol ederler. İmmün sistemin pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar komponentleri arasında dinamik bir denge söz konusudur. Ancak romatoid artrit, iltihabi osteoartrit, periodontitis gibi kronik inflammatuar hastalıklarda, anti-inflamatuar yanıtın yetersiz olması ya da olmaması, patogenezi açıklayan önemli bir mekanizma olarak öne sürülmektedir [79,80] Periodontitiste, bakteri-konak ilişkisi sonucu başlayan akut inflammatuar cevap, T lenfositlerin ve B lenfositlerin baskın olduğu evreye dönüşür. Bu evreler arası geçiş; hücrelerin bölgeye toplanması, farklılaşması ve gelişiminden sorumlu olan sitokinler tarafından yönlendirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, gingivitis ve periodontitis hastalarında, diş eti, DOS ve tükürükte, pro-inflamatuar, anti-inflamatuar ve anti-fibrojenik sitokinlerin miktarında artış olduğu bildirilmiştir [81]. Bu nedenle, bu moleküllerin bağışıklık fonksiyonunu düzenlediği, direkt olarak ya da diğer sitokin ve büyüme faktörlerin

üretimini indüklenme yolu ile ECM bileşenlerinin ve MMP'lerin üretimini regüle ederek doku hasarını etkilediği düşünülmektedir [82].

Oluşum mekanizmasına bakıldığında doku hasarının, farklı hücre tipleri tarafından üretilen çeşitli sitokinler dahil olmak üzere birçok düzenleyici ile ilgili olduğu görülmektedir. Periodontal hastalıkta immünolojik cevabın başlaması, düzenlenmesi ve devam etmesinde en önemli ve birincil rol oynayan sitokinleri tanımlamak mümkündür. Bu sitokinlerin başında IL-1, TNF- $\alpha$  ve IL-10 gibi sitokinler gelmektedir [83]. Bu sitokinler, lökositler ve endotel hücreler üzerindeki adhezyon moleküllerini artırıcı yönde etki göstererek, lökositlerin damarların dışına çıkarak dokuya sızmalarına neden olur. İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi öncül sitokinlerin uyarılması, ikincil düzenleyicilerin üretilmesine yol açar. Bu sayede bağışıklık cevabı, bağ dokusu yıkımında ve kemik kaybında artış meydana getirir [84].

Hastalıkta ismi geçen biyolojik moleküllerin çoğunun, aslında temel olarak normal dişeti bağ dokusunda ve epitelde bulunmalarına rağmen, ifade edilmeleri bakteriyel endotoksinlerle karşılaşmaları sonucunda artar. Bu durum, söz konusu moleküllerin yangısal süreçte neden fazla miktarda olduklarını açıklamaktadır [82]. Esas görevleri konak cevabını korumaya yönelik olan bu moleküller, cevabın az ya da çok olmasına bağlı olarak doku hasarının meydana gelmesine neden olurlar.

Histolojik çalışmalar, ilerlemiş periodontal lezyonlarda lenfositlerin baskın hücre tipi olduğunu göstermektedir [81,82]. T lenfositler kronik inflamasyonda immünregulator rolü olan birçok sitokinin kaynağıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, farklı T hücre alt grupları üzerinde yoğunlaşmıştır. T hücre alt gruplarının ürettikleri sitokin profilinin immün yanıtı yönlendirdiği ve periodontal hastalığın ilerlemesinde kritik rol oynadığı öne sürülmüştür [85]. CD4+ yardımcı T hücreleri, ürettikleri spesifik sitokinlere göre iki farklı fenotipe farklılaşırlar [86]. Tip 1 yardımcı T hücreleri IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  salgılayarak hücre-içi patojenlere karşı hücrel immüniteyi aktive eder. Tip 2 yardımcı T hücreleri IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi anti-inflamatuar sitokinleri üreterek, hücre-dışı patojenlere ve parazitlere karşı humoral immün cevabı indüklerler [87]. Tip 1 yardımcı T hücresi/Tip 2 yardımcı T hücresi profilinin periodontal hastalıkta immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynayabileceği öne

sürülmektedir [88]. Yapılan bazı çalışmalar, periodontitiste azalmış Tip 1 yardımcı T hücresi yanıtının etkili olduğunu rapor ederken [89,90], diğerleri artmış Tip 2 yardımcı T hücresi yanıtının rol oynadığını bildirmektedir [91,92]. Literatürde bu konuda fikir birliği bulunmamakla beraber, Tip 1 yardımcı T hücresi profilinin, Tip 2 yardımcı T hücresine doğru dönüşmesini sağlayan mekanizmaların, gingivitisten periodontitise geçişte önemli olabileceği düşünülmektedir. Hayvan modelleri ve insan dokuları üzerinde *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan birçok çalışma, periodontal hastalıkta immün cevabın her aşamasında kompleks sitokin ağının anahtar rol oynadığını ortaya koymuştur [93,94,95].

#### **1.1.2.2.1. Periodontitis ve TNF-R2 ilişkisi**

İltihabi yanıtta anahtar rol oynayan sitokinlerden biri TNF'dir. Makrofajlar ve monositler dominant TNF kaynağı hücrelerdir. TNF'nin lokal hücresel etkileri; nötrofillerin endotel hücrelerine tutunmaları ve degranülasyonu, fagositoz aktivasyonu, ve ICAM-1 ekspresyonunda artış olarak sıralanabilir. TNF'nin kaşeksi, enfeksiyonlar, organ transplantı reddi ve otoimmün hastalıklarda sistemik etkileri olduğu belirtilmiştir. TNF, osteoklastları aktive edip, yeni kemik formasyonunu inhibe ederek, IL-1'e benzer şekilde kemik yıkımına yol açar. Kıkırdakta kollajen sentezini artırarak proteoglikan sentezini inhibe eder, yara iyileşmesi ya da kronik inflamasyonda indüklenen fibroziste görülen fibroblast proliferasyonunu artırır [96]. Uyarılmamış birçok hücre, düşük seviyelerde TNF mRNA'sı içermektedir. TNF'yi uyarabilen endojen ve ekzojen faktörler vardır. Birçok bakteri tipi ve bakteri LPS'i TNF- $\alpha$  üretimini indükler, ancak IL-1 ve interferon- $\gamma$  varlığında da TNF aktivitesinde artış görülür [97]. Yapılan çalışmalarda lipopolisakkarit ve Gram (-) periodontopatojen mikroorganizmaların, periferik kan monositlerinden TNF salınımına neden oldukları ve TNF'in IL-1 ve IL-6'ya benzer şekilde kemik yıkımında rol oynayabileceği belirtilmektedir [98].

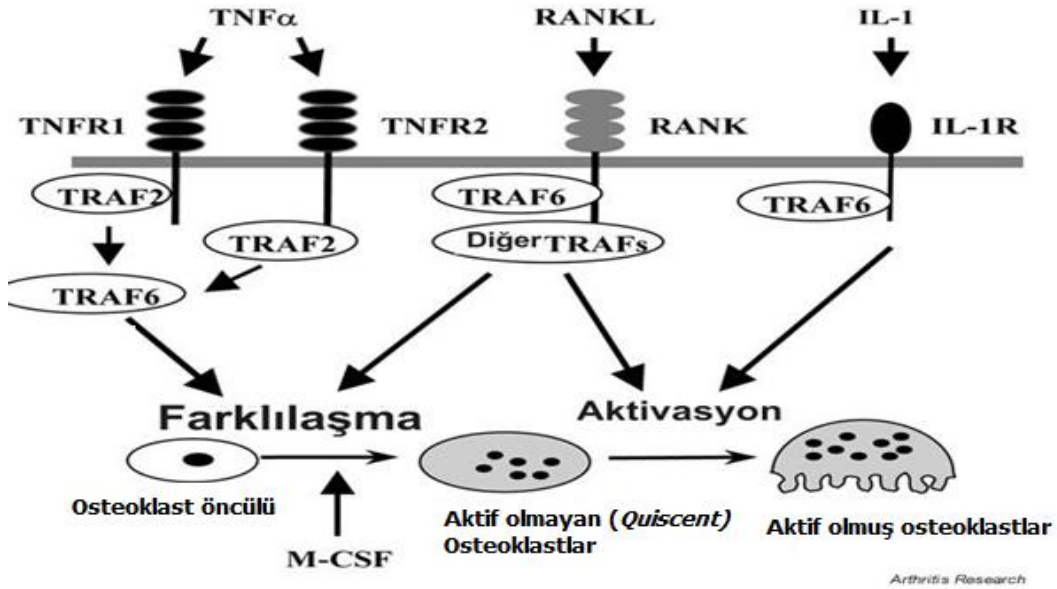
Bu sitokin,  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere biyokimyasal olarak farklılık gösteren iki formda sentezlenmektedir. TNF- $\alpha$ , uyarılmış makrofajlardan ve aktive T hücrelerinden, TNF- $\beta$  ise sitotoksik T hücrelerinden salınmaktadır. İndirekt immunfloresan yöntemi kullanılarak kronik periodontitisli hastaların doku örneklerinde, hastalıklı bölgelerde IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  yüksek düzeylerde bulunmuştur [99,100].

Periodontitisli hastaların DOS'nda TNF- $\alpha$  düzeyini değerlendiren bir çalışmada, klinik parametrelerle korelasyon gösterilememiş, bu nedenle araştırmacılar, TNF- $\alpha$ 'yı erken inflamatuvar aktivitenin indikatörü olarak yorumlamışlardır [90]. Kronik periodontitisli hastalarda sitokin profilini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada, iltihaplı ve sağlıklı dokularda IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-2 interferon- $\gamma$ , ve IL-10 konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , ve IL-2'nin şiddetli periodontitisi olan hastaların dişeti dokularında, sağlıklı dokulara oranla yüksek bulunduğunu göstermiştir [101]. Doğal bağışıklık cevabı ile ilişkili olan TNF, öncül yangısal sitokinler ile birlikte kemik rezorpsiyonunu düzenlemektedir [102,103]. Ayrıca bu sitokinin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kemik yapımını engellediği de gösterilmiştir [103]. Periodontitisli hastalarla yapılan başka bir çalışma ise, hastaların iltihaplı dişeti dokularının DOS'nda yüksek düzeyde saptanan IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'nın ve her iki sitokinin artmış ekspresyonunun, periodontal doku yıkımından sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur. Bu düşünceden yola çıkılarak, hayvanlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'yı inhibe eden çözünebilir reseptörlerin etkileri değerlendirilmiştir. Deneysel olarak oluşturulan periodontal lezyonlarda, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'yı inhibe eden çözünebilir reseptörlerin kullanılmasıyla osteoklast formasyonunun %67; kemik rezorpsiyonunun %60 oranında azaldığı gösterilmiştir [104]. Sonuç olarak, IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın lokal olarak üretimini, salınımını ve biyolojik aktivitelerini kontrol eden immünolojik mekanizmaların ve genetik faktörlerin, periodontal hastalık patogeneğinde önemli rol oynadığı yargısına varılabilir.

TNF iki birleşik proteine dayanmaktadır: TNF- $\alpha$  ve lenfotoksin- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ). Yapısal olarak benzer olan iki adet hücre yüzeyi TNF reseptörü vardır. Bunlar TNF reseptörü 1 (TNF-R1) ve TNF reseptörü 2'dir (TNF-R2) [105]. Tip I TNF reseptörü (TNF-R1), eski adıyla p55 reseptörleri hücre zarında bulunur ve 55 kDa moleküler ağırlığındadır. Tip II TNF reseptörü (TNF-R2), eski adıyla p75 reseptörleri de hücre zarındadır ve 75 kDa molekül ağırlığındadır [106]. TNF reseptörleri yangı ve bağışıklıktan sorumlu olan büyük bir protein ailesinin üyeleridir. TNF reseptörlerinin hücre dışı ve sitoplazmik bölge olmak üzere iki ana birimi bulunmaktadır. Bağlanmanın sağlandığı hücre dışındaki bölgeler, sistein amino asiti bakımından zengindirler. Sitoplazmik bölgede bulunan



domeynler ise sinyal iletiminde görev almaktadır. Bu domeynler iki reseptörde birbirinden farklıdır ve bu sayede farklı sinyal yollarını aktive ederek işlev sağlamaktadır. Tip I TNF reseptörü sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu hızlandırırken, tip II TNF reseptörü T lenfositlerin proliferasyonunu hızlandırmaktadır [107,108]. TNF'nin, hücre yüzey reseptörleri olan TNF-R1 ve TNF-R2 ile kompleks oluşturduğunda, kemik yıkan hücreler olan osteoklastların oluşmasını ve aktivitelerini arttırarak kemik kaybına neden olduğu gösterilmiştir. TNF, diğer osteoklast-düzenleyici moleküller gibi RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) üretimini arttırır ve T-lenfositlerden, B-lenfositlerden ve endotel hücrelerinden RANKL salınmasını indükleyerek dolaylı olarak osteoklast oluşumunu sağlar [Şekil 1.5.] [109,110]. Yapılan bir çalışmada, farelerde TNF-R2 eksikliği, çevresel lenfoit organlardaki başlangıç merkezlerinin anormal gelişimine neden olmuş ve endodontik patojenler gibi çeşitli patojenlere duyarlılığı arttırmıştır. Artan duyarlılıkla birlikte, kemik yıkımı ve doku hasarının da arttığı gözlenmiştir [111,112]



**Şekil 1.5.** TNF-α, RANKL ve IL-1 gibi sitokinlerin osteoklastlarda neden olduğu farklılaşma ve aktivasyon. (<http://arthritisresearch.com/content/4/5/281/figure/F5>) [112].

### 1.1.2.3. Periodontitiste doku yıkımı ve bu yıkımda çeşitli proteinazların rolü

Periodontal dokuların yapısal olarak ana elemanlarından biri protein olduğu için, periodontal doku yıkımında proteinazlar anahtar etkiye sahip enzimlerdir. Proteinazlar ve onların endojen inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması, çeşitli doku hasarı ve yıkımı ile sonuçlanan çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olur. Fizyolojik koşullarda proteolitik enzimler; gen ekspresyonu, belirli hücrelerde proteinazların sentezi, zimojen aktivasyonu ve proteinazların endojen koruyucu inhibitörlerinin ekspresyonu yoluyla kontrol edilir.

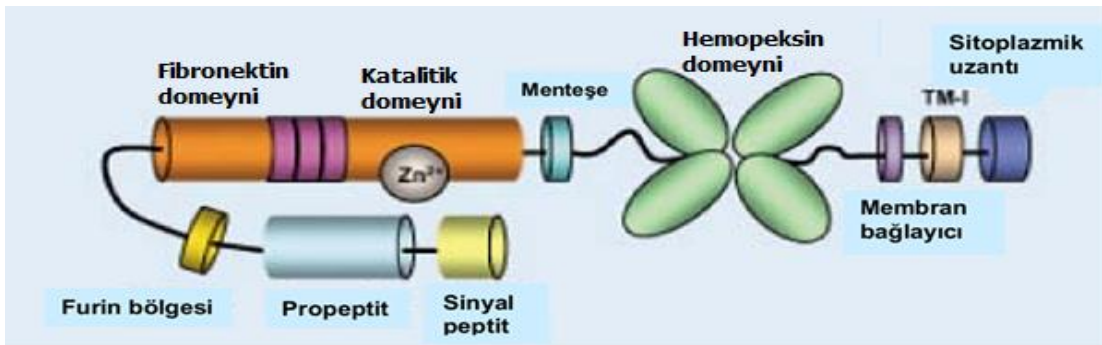
Periodontitiste bakteriyel ve konak kaynaklı olan farklı proteinazlar etkili olmaktadır. *Porphyromonas gingivalis* ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gibi periodontopatojen mikroorganizmalar bakteriyel proteinazları üretir. Konak ve bakteriyel kaynaklı proteinazların etki mekanizmalarında farklılıklar bulunmaktadır.

Bakteriyel kaynaklı kollajenaz, kollajeni 200'den fazla peptit bölümüne ayırırken, konak kollajenazı, kollajeni belirli bölgesinden sadece ikiye ayırmaktadır. Doku matris makromoleküllerinin yıkımında etkili proteinazlar dört temel sınıfta toplanabilir: Metallo, serin, sistein ve aspartik proteinazlar. Serin ve metallo ailelerine ait proteinazlar yıkımın erken fazlarında etkili olmaktadır [113]. Makrofaj ve fibroblastlar tarafından sentezlenen sistein proteinazlar grubundaki Katepsin B ve L gingival enflamasyon, sondalanan cep derinliği ve alveol kemiği kaybındaki artış ile ilişkili bulunmuştur [114]. Aspartik proteinaz olan katepsin D asidik pH'ta aktiftir. Bu enzim nötrofil, makrofaj ve dişeti fibroblastları tarafından sentezlenir [115]. Bu proteinaz, mineralize diş matrisinin yıkımında etkilidir. Periodontal hastalıklarda MMP'ler ve bir grup serin proteinaz olup, en fazla etkinliğe sahip olan proteolitik enzimler olarak bilinmektedir [113].

Matriks metalloproteinaz ailesi, ekstrasellüler proteinazların önemli bir üyesidir. MMP'ler, hücrelerin mikroorganizmalara ve diğer çevresel faktörlere verdiği cevabı etkileyerek yıkımda anahtar rol oynarlar. MMP'ler, hücrelerin ve ECM proteinlerinin proteolitik yıkımını veya aktivasyonunu sağlayarak hücre-hücre ve hücre-ECM ilişkilerini düzenler. Bu enzimler hücrelerin farklılaşmasını, migrasyonunu ve proliferasyonunu etkiler [116]. MMP'ler hücre yüzey

reseptörleri gibi biyoaktif molekülleri etkileyerek hücreler arası iletişimde ve immünfonksiyonlarda önemli rol oynar [117]. Çinko'ya bağlı endopeptidaz olan MMP'ler periodontal dokularda ECM şekillenmesi ve yıkımından sorumlu tutulan enzimlerin başında gelmektedir [118,119]. ECM; proteinleri, proteoglikanları içeren organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma doku morfogenezi gibi aktivitelerde etkili olan karmaşık ve dinamik bir oluşumdur. MMP'lerin etkisi sonucu ortaya çıkan bağ dokusunun yıkımı ve yeniden şekillenmesi, çeşitli hastalıkların yanısıra normal büyüme ve gelişim süreci ile yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda da gözlenmektedir [120].

MMP'ler yapısal olarak incelendiğinde; 17-29 aminoasit içeren sinyal peptit bölgesi, 77-87 aminoasit içeren amino terminal propeptit bölgesi ve 170 aminoasit içeren katalitik bölgeden oluşur. Katalitik bölgenin aktif merkezinde çinko atomu ve çinko atomuna bağlı korunmuş sistein aminoasidi bulunur. Katalitik bölge aynı zamanda çinko-bağlayıcı bölge ve korunmuş metiyonin aminoasidi içerir. Bu bölge, MMP'lerin kararlılığını ve enzimatik aktivitesini korumak için katalitik çinko atomuna ek olarak yapısal çinko atomu ve 1 ya da 3 tane kalsiyum atomu da içerir. Bazı MMP üyelerinde genel yapıya ek olarak farklı bölgeler yer alır. Jelatinaz sınıfına ait MMP-2 ve 9, kollajen ve jelatin etkileşimleri için gerekli fibronektin benzeri bölüm ile 210 aminoasit içeren C-terminal hemopeksin benzeri bölümden oluşur. Hemopeksin benzeri bölüm substrat özgüllüğünü belirlemede anahtar rol oynar. Ayrıca jelatinazların yapısında katalitik bölge ve C-terminal hemopeksin benzeri bölüm arasında proline zengin bir bağlayıcı bölge yer alır [120,121] [Şekil 1.6.]



**Şekil 1.6.** Matriks metalloproteinaz domeyninin yapısı [120,121].

Matriks metalloproteinazlar hakkında ilk bilgi Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından 1962 yılında yayınlanmıştır. MMP'lerin molekül ağırlıkları 19-92 kDa arasında değişmektedir. Günümüzde MMP ailesinin 25 üyesi saptanmıştır. MMP'ler substrat özgüllüğü, primer yapısı ve fonksiyonlarına göre aşağıdaki gibi gruplandırılmaktadır [121] [Şekil 1.7.]

**a) Kollagenazlar;** MMP-1 (fibroblast tip), MMP-8 (nötrofil tip), MMP-13 (kollajenaz-3), MMP-18 (kollajenaz-4)

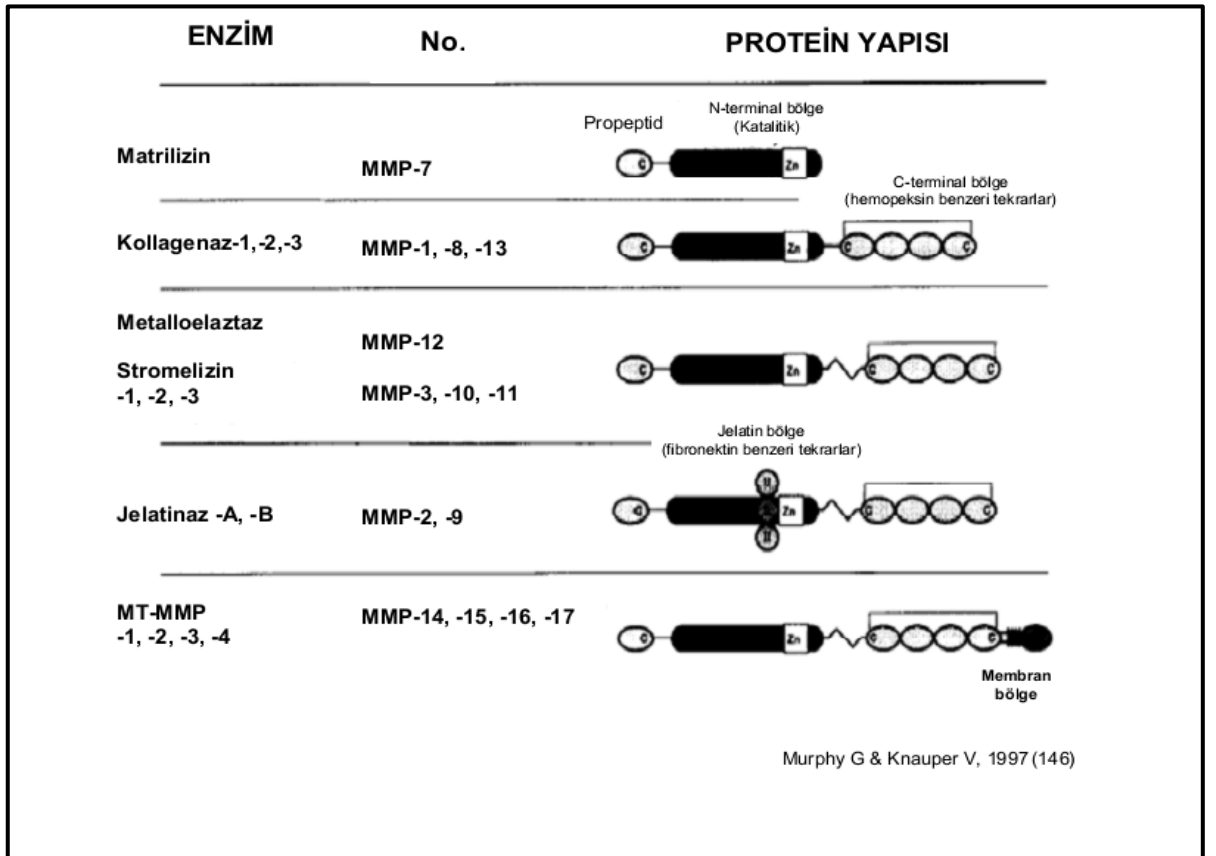
**b) Jelatinazlar** (tip IV kollajenazlar); jelatinaz-A (MMP-2) ve jelatinaz-B (MMP-9)

**c) Stromelizinler;** MMP-3 (Stromelizin-1), MMP-10 (Stromelizin-2), MMP-11 (Stromelizin-3)

**d) Matrilizinler;** MMP-7 (matrilizin-1), MMP-26 (matrilizin-2)

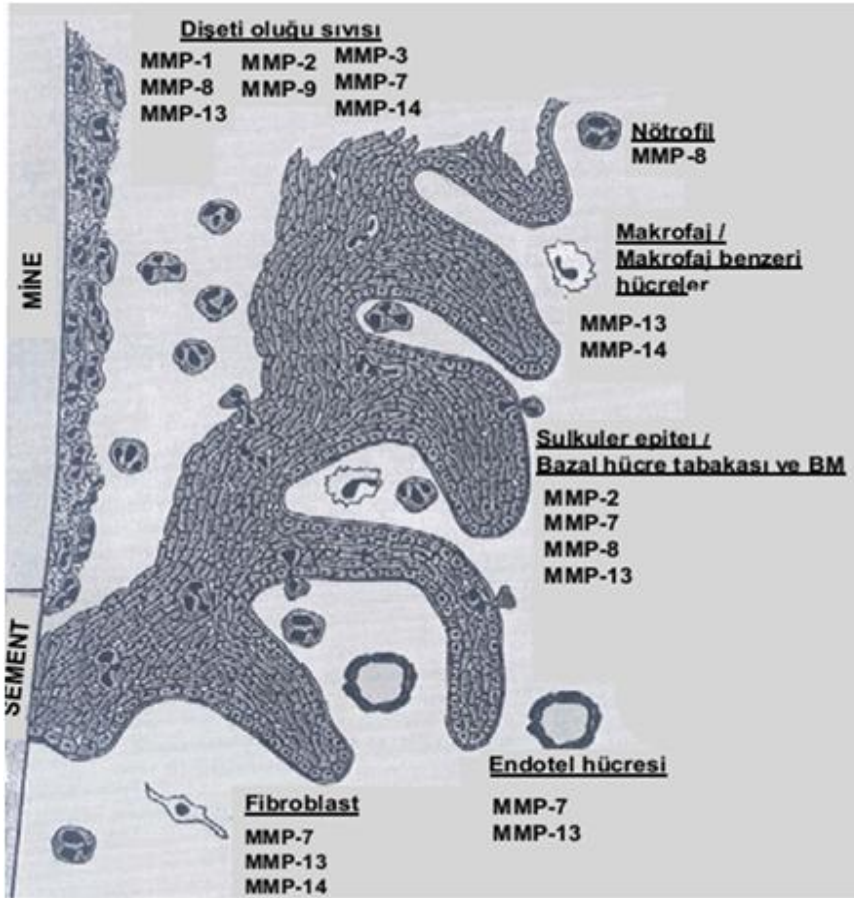
**e) Membran tip MMP'ler (MT-MMP'ler);** MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25

**f) Diğerleri;** MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23.



**Şekil 1.7.** Matriks metalloproteinazların protein yapısı [122].

Periodontal hastalıkta etkili bulunan MMP'ler, mikrobiyal dental plak bileşenlerinin doğrudan veya dolaylı yoldan konak hücrelerini uyarması sonrası sentezlenir. Fibroblastlar, epitel hücreleri, osteoblastlar, osteoklastlar, nötrofiller ve makrofajlar gibi birçok hücre tarafından latent formda (proenzim) sentezlenmektedir. Latent formdaki MMP'lerin etkili olabilmesi için aktive olmaları gerekir. Çeşitli yollarla aktive olan bu enzimler dişeti bağ dokusu ve alveol kemiği yıkımına neden olur [123] [Şekil 1.8]



**Şekil 1.8.** Periodontitis patogenezinde rol alan başlıca MMP'ler [124'den geliştirilmiştir].

Tüm MMP'ler prepro-enzimler şeklinde sentezlenir ve sıklıkla inaktif pro-MMP'ler olarak salgılanırlar. Stres ve oksidatif stresi kesen sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri, MMP'leri üç düzeyde regüle ederler:

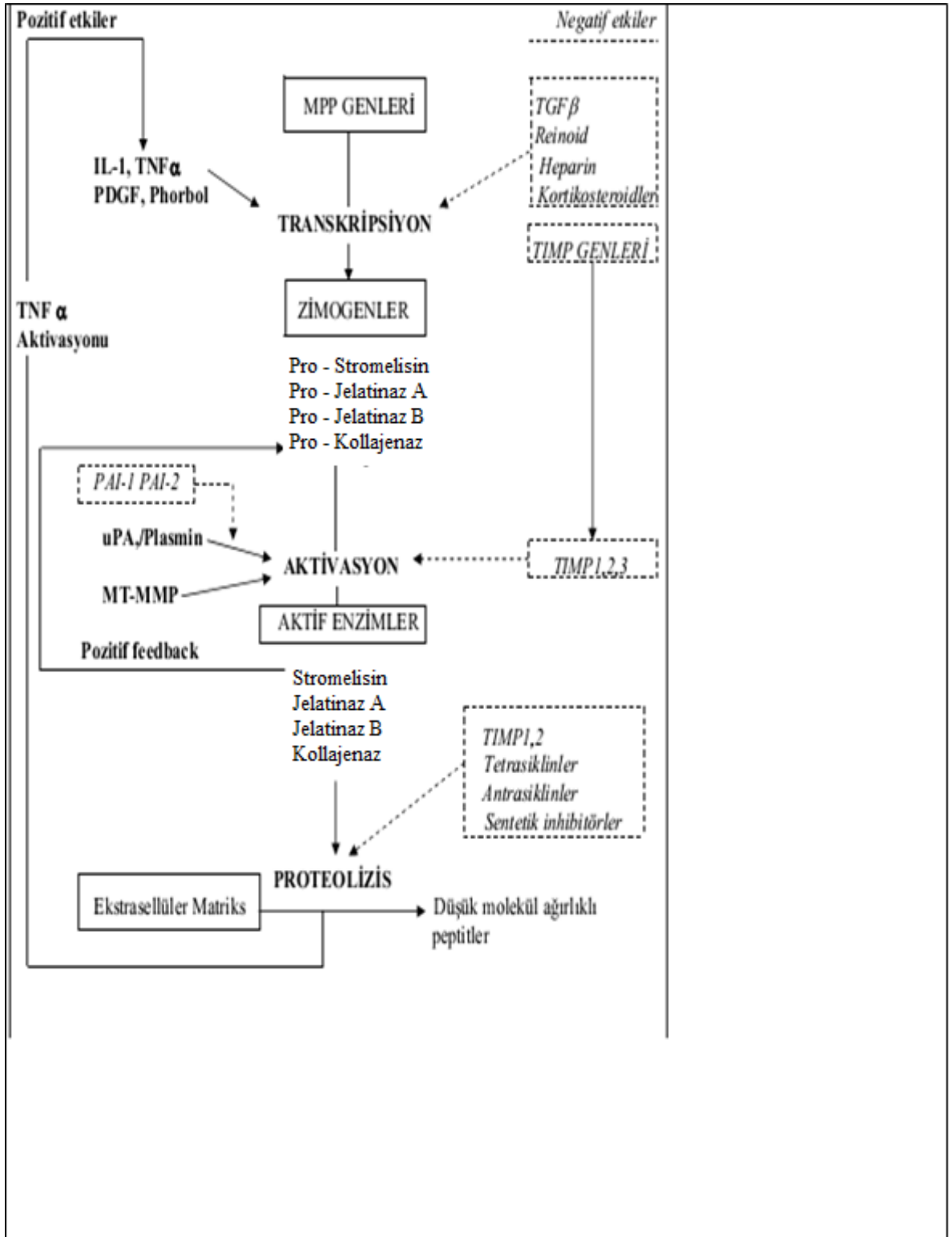
1. gen ekspresyonunun indüksiyonu,

2. latent proenzimlerin aktivasyonu,

3. MMP'lerin tanımlanan doku inhibitörleri (TIMP-1,-2,-3,-4) tarafından inhibisyonu [125].

Sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve kimyasal ajanlar gibi çok sayıda faktör MMP transkripsiyonunun düzenlenmesinde etkilidir. Bunların arasında IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve epidermal büyüme faktörü en etkili olanlarıdır. MMP ekspresyonunu, paratiroid hormon ve endotoksin artırırken, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  ve glukokortikoidler azaltır [126]. MMP'lerin transkripsiyonel düzenlenmesi sırasında, transkripsiyon faktörü olan aktivatör protein-1 (AP-1)'in, çeşitli sitokinleri ve büyüme faktörlerini indükleyici etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca A-bağlı protein-3 (PEA-3), MMP'lerin transkripsiyonel aktivasyonu ve düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [127]. MMP-2 geninin promotor bölgesinde AP-1 ve PEA-3 için eksik bağlayıcı alanlarının varlığı ile MMP-2'nin transkripsiyonel düzenlenmesinin eksikliği arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Artan MMP sentezi ile periodontitiste doku yıkımı ve hastalığın verdiği hasar artmaktadır [126,127].

MMP'lerin aktivitesi, endojen ve sentetik inhibitörler ile inhibe edilmeye çalışılır. MMP'lerin serumda bulunan endojen inhibitörü  $\alpha$ 2-makroglobulin ve dokuda bulunan inhibitörü ise matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) adını alır. MMP aktivitesini TIMP periselüler olarak,  $\alpha$ 2-makroglobulin ise vücut sıvılarında kontrol eder. Enflamasyon sırasında, yüksek moleküler ağırlıklı protein olan  $\alpha$ 2-makroglobulin, vasküler duvarı geçerek ECM'ye ulaşır. Proteinaz ile kovalent bağlar yapan  $\alpha$ 2-makroglobulin, MMP aktivitesini inhibe eder. Bu proteinaz-inhibitör kompleksi dolaşımdan karaciğer yardımıyla temizlenir. MMP'lerin doku inhibitörlerinin 4 üyesi bulunmaktadır (TIMP -1, -2, -3, -4). Ortamda var olan MMP'ler ve inhibitörleri arasındaki denge MMP'ler lehine bozulduğunda patolojik olarak ECM yıkımı oluşur. Bu patolojik durum periodontitis gibi hastalıklarda ortaya çıkmasına sebebiyet verir [128] [Şekil 1.9].

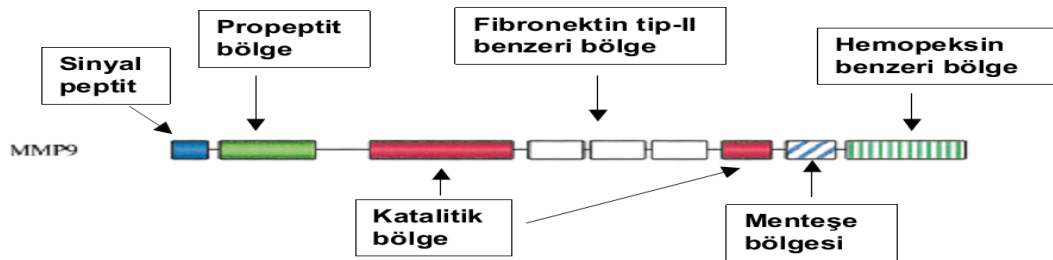


**Şekil 1.9.** Metalloproteinazların kontrol mekanizması ve aktivasyon durumunda oluşan doku yıkımı [129].

### 1.1.2.3.1. Periodontitis ve MMP-9 ilişkisi

MMP-9, MMP'lerin "jelatinazlar" grubunun üyesi bir proteinazdır. MMP-9, diğer MMP'lerden farklı olarak katalizör bölge ile aktif bölgesi arasında jelatin bağlayıcı bölge içeren enzimdir. MMP-9, Jelatinaz B olarak da bilinmektedir. Kromozomal lokasyonu 20. Kromozomun q kolunda 12.2-13.1 pozisyonundadır. Bu enzim, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, miyelin temel proteini, fibronektin, fibrillin-1, TNF- $\alpha$ 'yı ve Interlökin-1 $\beta$ 'nin öncüllerini yıkma özelliğine sahiptir. MMP-9, asidik ortamda tip 1 kollajenin N-terminalini yıkarak ECM 'nin yıkımında önemli rol üstlenir [130,131].

MMP-9 (Jelatinaz B), ilk olarak 1974 yılında Sapota ve Dancemicz tarafından polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, 92 kDa'luk bir molekül olarak salgılandığı, önce 87 kDa olan bir inaktif maddeye ve sonra aktif form olan 82 kDa veya 83 kDa'luk bir moleküle dönüştürüldüğü gösterilmiştir. 45-67 kDa arasında değişen aktif formları da izlenebilmektedir. MMP-9, aktivasyonunu takiben, denatüre kollajen ve jelatin, Tip IV ve V kollajen ve elastini de içeren pek çok ekstrasellüler matriks elemanını yıkabilir. MMP-9, diğer bir jelatinaz olan MMP-2 ile substrat düzeyinde birkaç madde hariç oldukça benzerlik gösterir; MMP-9, kazeine karşı oldukça özgül iken; MMP-2'de bu duyarlılık bulunmaz [131].



**Şekil 1.10.** Matriks metalloproteinaz-9'un yapısı [132]



MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir. Sinyal peptidi, propeptit bölgesi, iki adet katalitik bölge, fibronektin tip-II benzeri bölge, COOH- terminalde bulunan hemopeksin benzeri bölge ve menteşe bölgesi olmak üzere yedi bölümden oluşur [Şekil 1.10]. Katalitik bölüm ve hemopeksin benzeri bölüm arasında proline zengin bağlayıcı bölge yer alır. C-terminal hemopeksin benzeri bölüm substrat özgüllüğünü belirlemede anahtar rol oynar. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır [133].

MMP-9, diğer MMP'lar gibi inaktif proformlar olarak salınır ve ekstrasellüler olarak aktive edilir.  $\alpha$ 2-makroglobulin ve TIMP'lar tarafından inhibe edilmektedir. Bu enzim, epitelyal tümörlerin lokal yayılımına neden olur. Periodontitis patogenezinde ise, ECM yıkımı, doku yıkımı ve hücre göçü süreçlerinde önemli rol oynar. Ayrıca birçok sitokin ve kemokin üzerinde etkileri vardır. MMP-9, IL-8'i parçalayarak daha fazla miktarda IL-8 ortaya çıkmasını sağlar. Yine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve IL-1 $\beta$ 'yi inaktif formdan aktif forma dönüştürür [134,135]. Böylece hastalık süresince, konak bağışıklık cevabını arttırmak yolu ile periodonsiyumu oluşturan periodontal ligamentleri ve alveol kemiği değişik derecelerde yıkıma uğratar. Böylece diş etinin diş kökünden ayrılması ile "periodontal cep" oluşumunu hızlandırır. Parçaladığı Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin ile doku kaybı gerçekleşir. Tüm bu etkiler sonucu, hastalığın yıkım süreçlerinin seyirinde, ağır bir tablo meydana gelmektedir.

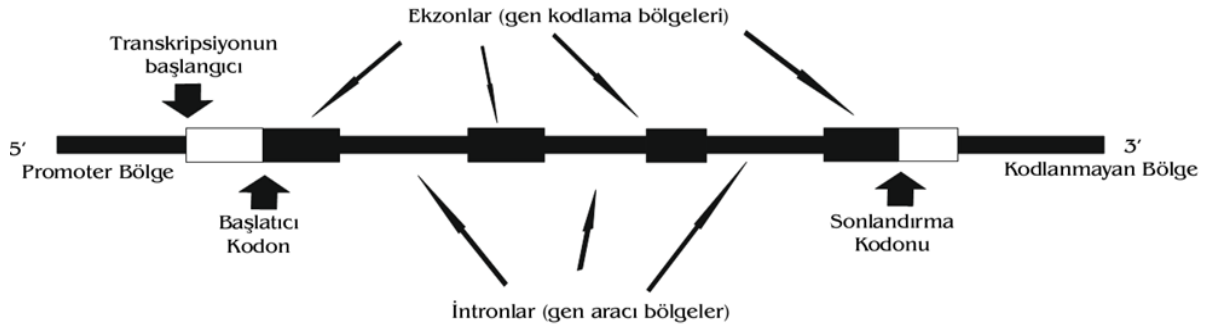
### **1.1.3. Periodontitiste Genetik Faktörlerin Rolü**

Etiyolojik olarak, hem genetik hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı hastalıklar multifaktöriyel hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Periodontitis, etiyojisinde birçok risk faktörü taşınması ile multifaktöriyel hastalıklara örnek teşkil etmektedir. Risk faktörleri sebep zincirinin bir parçasını oluşturur ve varlıkları karşısında hastalığın görülme olasılığı artar. Bakteri plağı, periodontitisin başlaması ve ilerlemesi için mutlaka gereklidir. Ancak farklı miktarda ve tipte bakteri varlığı, tek başına hastalığın oluşmasında ve şiddetini açıklamada yetersizdir [37]. Mikrobiyal faktörlerin hastalık patogenezindeki rolünü açıklamak için yapılmış çalışmalar, periodontal hastalık oluşumunun ancak %20'sinin spesifik mikroorganizma düzeyi ile açıklanabildiğini ortaya koymuştur. Konak cevabını etkileyen sistemik hastalık durumu, bireysel

yatkınlıklar, ya da sigara kullanımı gibi konağa ait faktörlerin hastalık oluşumunda önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır [6].

Periodontitis için risk faktörleri arasında; sigara içilmesi, yaş, cinsiyet, genetik faktörler, sosyo-ekonomik durum, AIDS, osteoporoz, diabet gibi sistemik hastalıklar sıranabilir.

Periodontitis için önemli risk faktörlerinden biri de genetik faktörlerdir. Bireyler arasındaki genetik farklılıklar, bireyin hastalıklara olan yatkınlığını veya direncini etkilemektedir. Genler, tekrarlanmayan bölgeleri içeren nükleotidlerden oluşurlar ve kromozomlar üzerinde dizilim gösterir. Bir bireyin taşıdığı tüm genler “genom” olarak adlandırılırken; bu gen havuzunda, bir ya da daha fazla biçimi bulunan genlerin belirli bir kromozomal alanda (lokus) haritalandığı bölge “allel” olarak adlandırılmaktadır. Allel çeşitliliği, toplumların genetik çeşitliliği sayılmaktadır. Genetik çeşitliliği tanımlamak için ise “heterozigotluk” ve “polimorfizm” tanımları kullanılmaktadır. Bireylerin heterozigot olup olmadığı, genlerin yüzdesi veya oranı ile tanımlanır. Her gen lokusu, bir allelin birbirinin aynı kopyasını (homozigot) ya da farklı iki allelin birer kopyasını (heterozigot) taşımaktadır. Genom üzerindeki bir bölgenin popülasyondaki bireylerde anlamlı oranda çeşitlilik göstermesine ise “gen polimorfizmi” denilmektedir. Genomik DNA’daki tek baz çiftindeki değişiklikler polimorfizimlerin en yaygın formu olan “Tek Nükleotid Polimorfizmi” (Single Nucleotide Polymorphisms, kısaca SNPs) olarak adlandırılmaktadır [Şekil 1.11.]. Tek nükleotit polimorfizimleri genin fonksiyonunu etkilemekte ve çeşitli hastalıklara yatkınlık ile ilişkilendirilmektedir [36]. İnsan genomunda yaklaşık olarak 1.42 milyon tek nükleotit polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır [136]. Bu rakamın %10’u konakçı cevabının niceliğinin değişmesine yol açan tek nükleotit polimorfizimleridir [39].



**Şekil 1.11.** İnsan geninin genel yapısı ve polimorfizmin gelişebileceği bölgeler [36]

SNP'lerin gen ürünü üzerine önemli bir fonksiyon kaybı etkisi olmamakla birlikte, bazen de çok önemli biyolojik etkiler ortaya koyabilmeleri söz konusudur. Genin kodlama bölgesinde oluşan bir polimorfizm nedeniyle farklı bir aminoasit ortaya çıkabilir. Bu durum da farklı veya işlevsiz bir proteinin oluşumu ile sonuçlanabilir. Promotor bölgelerindeki polimorfizmler sonucu ise gen ifadesi değişebilmektedir. SNP'ler diğer gen polimorfizmlerine göre daha sık görülen tipte polimorfizmlerdir ve sıklığının insan genomunda her 0,3-1 kilobazda bir tekrarladığı düşünülmektedir [137].

Periodontitis, birçok bilim insanı tarafından, multifaktöriyal yani kompleks bir genetik hastalık olarak tanımlanmıştır. Kompleks genetik hastalıkların ortaya çıkması için tek bir gen polimorfizmi yeterli olmamaktadır. Ancak çoklu gen lokuslarındaki genetik varyasyonlar hastalık eğilimini tetikler ve hastalığın seyrinde etkilerini gösterir. Periodontitis gibi birden fazla genin etkisinin söz konusu olduğu hastalıklar "poligenik" olarak da tanımlanmaktadır [36]. Periodontitis gibi kompleks hastalıklarda klasik Mendel kalıtımı prensipleri geçerli değildir. Genin homozigot ya da heterozigot olması hastalık üzerinde tek başına etki gösteremez. Genler arası ilişkiler ve genler ile çevresel faktörler gibi diğer risk faktörlerinin birbiri ile etkileşimi, hastalığın ortaya çıkmasında rol alan faktörlerdir [40].

Periodontitis ile ilgili genetik çalışmalar tasarlanırken, yaş, ırk, cinsiyet gibi faktörlerin durumu göz önünde bulundurulmalıdır. Fakat çoğu çalışmada seçilen gruplarda genetik açıdan heterojenlik mevcuttur. İdeal olarak, ikizlerle yapılan çalışmalar genetik heterojenlik ve çevresel faktörleri elemine etmede yararlı olabilmektedir, fakat ikiz çalışmalarının da belli sınırlamaları mevcuttur [41]. Bu anlamda, hem hastalığa sahip bireylerin hem de kontrol gruplarının ırk, cinsiyet, yaş gibi durumları göz önüne alınarak daha homojen bir çalışma grubu seçiminin, genetik araştırmaların başarısı için daha doğru olacağı düşünülmektedir [138].

Genetik etkinin periodontitis ile ilişkisi ailesel kalıtım çalışmaları [139,140] ve ikizlerle yapılan araştırmalar ile tanımlanmıştır [41,138,140]. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, Afrika kökenli siyahi Amerikalıların beyaz Amerikalılara göre periodontitise daha sık yakalandıkları belirtilmiştir [29]. Aynı zamanda farklı yerlerde yaşayan tek yumurta ikizleri ile yapılan bir çalışmada ise, hastalığın her iki bireyde de benzer tablo yansıtması da periodontitiste genetik faktörlerin önemini ortaya koymuştur [141].

Genetik araştırmacılar, periodontitis ve polimorfizm çalışmalarını genel olarak üç başlık altında incelemektedir. Bunlar, sitokin polimorfizmleri, hücre yüzeyi reseptörlerinde görülen polimorfizmler ve doku yıkımında etkin rol oynayan konak proteinazları gibi enzimlerde görülen polimorfizmlerdir. Takashiba ve Naruishi tarafından, periodontitis ve genetik ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada, periodontitis ile ilgili 6 farklı kategori oluşturulmuştur [36]. Bu gruplama ile IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler, immünoresseptörler, insan lökosit antijenleri (HLA), MMP'ler ve katepsin gibi proteazlar ve yapısal moleküllere ait gen polimorfizmlerinin periodontitis ile ilişkisi gösterilmiştir [142].

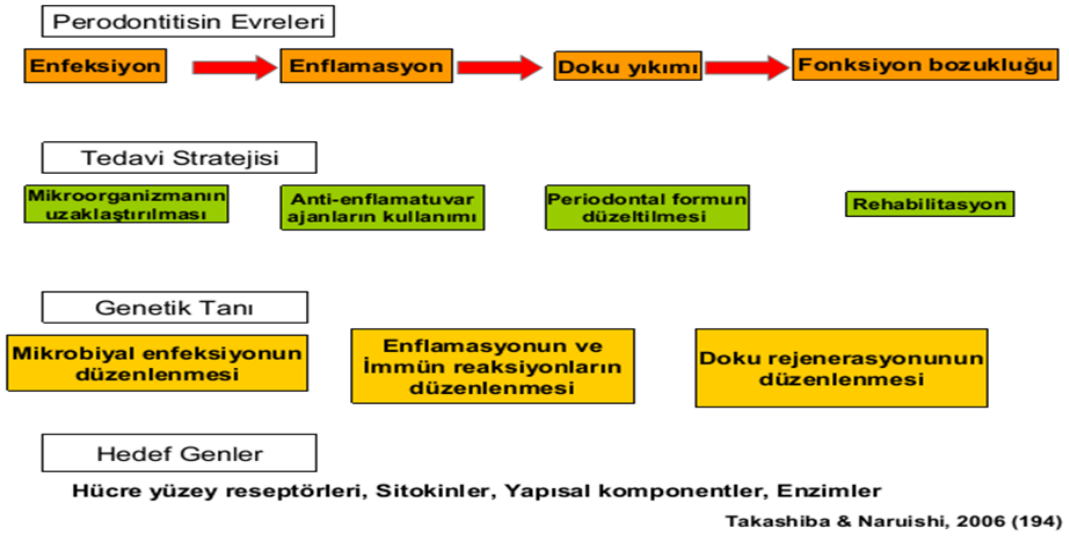
İlk olarak Kornman ve arkadaşları [37], IL-1 geninin periodontitis ile ilişkisini bildirmiş ve günümüze kadar periodontal hastalıklar ile IL-1 allellerinin ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma yayınlanmıştır [37,80,84]. Polimorfizm analizinde, popülasyon yapısı ve kontroller önem arz etmektedir [148]. Örnek olarak çoklu beyaz popülasyonu çalışmalarında, IL-1B +3954, IL-1A +4845 ve IL-1A -889 gibi özgün IL-1 geni çeşitlilikleri periodontitisin artan şiddetiyle ilişkilendirilmiştir [37,80]. Fakat bu IL-1 tek nükleotid polimorfizmlerinin Asyalı'lar arasında daha az yaygın olduğu belirtilmiştir [37]. Yapılan bir başka araştırmada, COX-2

geninin -765. pozisyonunda bulunan tek nükleotit polimorfizminin Tayvan popülasyonunda agresif periodontitise karşı koruyucu etkide bulunduğu gösterilmiştir [143]. Aynı gene ait -1195. pozisyonundaki polimorfizmin ise Çin popülasyonunda kronik periodontitise yatkınlığa neden olduğu, farklı bir çalışma ile kanıtlanmıştır [144]. Carvalho ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, ilk defa agresif periodontitise ait bir lokus tanımlanmış ve *FAM5C* adlı genin agresif periodontitisi tetiklediği gösterilmiştir [145]. Hart ve arkadaşları, aile içi evliliklerin sık rastlandığı bir ülke olan Ürdün 'de yaptıkları çalışmada, erken yaşlarda ortaya çıkan peroidontitis ile katapsin-C geninde az rastlanan allel varlığının ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [146] [Tablo 1.1.].

**Tablo 1.1.** Periodontitis ile ilişkisi araştırılmış bazı genler [147].

<b>Gen</b>	<b>Kodlanan Protein</b>	<b>İlişkilendirme</b>
<b>CCR5</b>	Kemokin reseptör-5	Yok, Yok
<b>COX-2</b>	Siklo-oksijenaz-2	Var,Var
<b>Enos</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz	Var
<b>ER2</b>	Östrojen reseptör-2	Yok
<b>E-selektin</b>	E-selektin	Var
<b>ET-1</b>	Endotelin-1	Yok
<b>IL-12</b>	İnterlökin-12	Yok
<b>IL-16</b>	İnterlökin-16	Yok
<b>PAI-1</b>	Plasminojen-aktivatör-inhibitör-1	Var, Yok
<b>RAGE</b>	İleri glikasyon son ürünü reseptörü	Var
<b>OPN</b>	Osteopontin	Yok
<b>TNFR2</b>	Tümör nekroz reseptör-2	Var
<b>MMP-9</b>	Matriks metalloproteinaz-9	Yok

İnflamatuvar mekanizmalarda aksamaya yol açabilecek genetik varyasyonlar, immün cevapta ve klinik olarak inflamasyon şiddetinde izlenen çeşitli aşamalar; periodontitiste genetik etkilerin varlığını göstermektedir. Sonuç olarak polimorfizm çalışmalarının amacı hastalığa yatkınlık, hastalık şiddeti ve klinik tabloyu etkileyen potansiyel genetik faktörlerin tanımlanmasıdır. Bu yolda elde edilen olumlu ya da olumsuz sonuçlar yardımıyla, hastalığın patogenezi ve tedavi süreçleri ile ilgili önemli gelişmelerin sağlanması söz konusu olacaktır [Şekil 1.12].



**Şekil 1.12.** Periodontal hastalığın çeşitli evrelerinde hedef genler, genetik tanının ilişkisi ve tedavi stratejisi [36].

Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili IL-1, TNF- $\alpha$  ve reseptörleri, human lökosit antijenleri (HLA) gibi sitokinler ve matriks metalloproteinazlar (MMP), katapsin-C, vitamin D gibi proteinaz ve yapısal moleküllerin ekspresyonunda etkili genlerin yanı sıra, immuno reseptörler ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır [148,149,150,151,152]. Takashiba ve Naruishi [36], 140 orijinal çalışmayı derledikleri araştırmalarında, periodontitisin ilerlemesi ve şiddeti ile pozitif ve negatif ilişkisi olan genlerin polimorfizmlerini

sayısal olarak değerlendirmiş ve yayınlamışlardır [Tablo 1.2]. Araştırmacıların bu derlemelerinden, periodontal hastalıklar ve çevresel faktörlerin ilişkisini inceleyen kapsamlı genetik çalışmalara gereksinim olduğu sonucu çıkmıştır.

**Tablo 1.2.** Periodontitis ile ilişkisi araştırılan genler ve hastalık ile ilişkisi [36]

<i>Kategori</i>	<i>Gen (n)</i>	<i>İlişki</i>	
		Pozitif (n)	Negatif (n)
Sitokin ve sitokin reseptörleri	IL-1 (36)	22	13
	TNF (14)	6	4
HLA		15	2
İmmunoreseptör	FcR (14)	13	2
Proteaz	MMP	2	1
Yapısal moleküller	Katepsin C (6)	4	1
	Vitamin D (6)	5	1
Diğerleri		9	7

## 1.2. Önceki Çalışmalar

### 1.2.1. TNF-R2 Gen Polimorfizmi ile Periodontitis İlişkisini Araştıran Bazı Çalışmalar

TNF-R2 geni, 1. kromozomun q kolunda 36. pozisyonda yer almaktadır. Periodontitis ile ilişkilendirilmiş polimorfizm çalışmalarının çoğu, genin 6. ekzonuna ve araştırmamızda da yer alan bu ekzondaki +587 pozisyonundaki tek nükleotid polimorfizmine yoğunlaşmıştır.

Shimada ve arkadaşlarının Japonya'da yapmış oldukları bir çalışmada, TNF-R2 geninin 6. ekzonunda +587 pozisyonundaki polimorfizmin kronik periodontitis ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, hastaların yaşları 45 ile 60 arasında değişmektedir. Çalışma grubunun yaşlarının birbirine yakın seçilmesi ve sigara kullanmamaları periodontitis gibi multifaktöriyel hastalıklar için önem arz etmekte ve yapılan çalışmada genetik faktörlerin doğru yorumlanmasını sağlayıp, çalışmanın niteliğini yükseltmektedir. Söz konusu çalışmada, TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi ile kronik periodontitis arasındaki ilişki gösterilmiştir. Kontrol grubu ile seçilen kronik periodontitisli hasta grubu



arasında polimorfik G alleli taşıma açısından anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p=0,00097$ ). T alleli taşıma oranlarının bu polimorfizm için ırklara göre değişiklik gösterdiği bu çalışmada bildirilmiştir. T alleli taşıma oranları, beyaz ırkta %45 [154], Africo-Amerikan ırkta %33 [155], Japonlarda ise %17 olarak bildirilmiştir [45].

Kobayashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 319 periodontitis hastası ve 303 kontrol kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda TNF-R2 (+587 T/G) polimorfizmi ve TNF-R2 (+694 G/A) polimorfizminin hastalık ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda da; TNF-R2 (+587 T/G) ve TNF-R2 (+694 G/A) polimorfizmleri periodontitis ile ilişkili bulunmuştur; özellikle bu polimorfizmler kronik periodontitis ile anlamlı sonuç vermiştir [156].

Kinane ve çalışma grubu ise TNF-R2 gen polimorfizmlerinin, kronik iltihap oluşturan hastalıklarla ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Erken başlangıçlı periodontitisin bu durumla ilişkili olabileceği de öne sürülmüştür [157].

Komota ve arkadaşları, TNF-R2 (+587 T/G) polimorfizmde G alleli taşıyan bireylerin immün cevabının daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bir bağışıklık sistemi rahatsızlığı olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ile bu polimorfizm ilişkilendirmiştir. Bu durumun periodontitis yıkım mekanizmalarının tetiklenmesi ve aşırı bağışıklık cevabının araştırılması konularına yardımcı olabileceği düşünülmektedir [158].

Morita ve arkadaşları, yaptıkları araştırma doğrultusunda TNF-R2'nin kronik periodontitis için belirteç olabileceğini belirtmiştir [159].

Schenkein ve arkadaşları ise, TNF-R2 geninin ekspresyonunun aşırı immün cevapta arttığını ve immün cevapta etkili olan sitokinlerden IL-6'nın da salınımını arttırdığını rapor etmişlerdir [160].

Ikezawa ve arkadaşlarının yürüttüğü bir klinik çalışmada, kronik perodontitisli hastaların DOS'undan alınmış örneklerde TNF- $\alpha$  reseptörleri olan TNF-R1 ve TNF-R2'nin varlığı oldukça yüksek bulunmuş ve bu iki reseptörün kronik periodontitis için potansiyel markır olabileceği vurgulanmıştır. Bu iki gen polimorfizminin hastalık ile ilişkisinin varlığının da araştırılması gerekliliği belirtilmiştir [161].

Khoshhal ve arkadaşları İran'da TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi çalışması yapmışlardır. Bu çalışma, 35-72 yaşları arasındaki kronik periodontitis hastası ve kontrol grubunu kapsamaktadır. Çalışma sonucunda kontrol grubu ile kronik periodontitisli grup arasında TNF-R2 gen polimorfizmi için anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (p=0,58) [162].

Kore'de Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise, generalize agresif periodontitis (GAP) ve TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi ilişkisi araştırılmıştır. Hastalık ile gen polimorfizmi arasında anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Hasta grubunda T alleli taşıma oranı %23,8 olarak bulunmuştur [163].

Shimada ve arkadaşlarının, GAP ve TNF-R1 ve TNF-R2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmasında ise, GAP ve TNF-R2 gen polimorfizmi arasında bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir [164].

### **1.2.2. MMP-9 Gen Polimorfizminin Periodontitis ile İlişisini Araştıran Bazı Çalışmalar**

MMP-9 geni 20. kromozomun q kolunda 12.2-13.1 pozisyonunda yer almaktadır. MMP-9 geni ve periodontitis üzerine yapılan çalışmalar, genin promotor bölgesine ve -1562 pozisyonunda bulunan polimorfizm üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Gürkan ve arkadaşlarının Türkiye'de yaptığı bir çalışmada MMP-9,-2,-12 gen polimorfizmleri ile kronik periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında incelenen polimorfizmlerden biri MMP-9 promotor bölgesindeki -1562. pozisyonunda yer alan tek nükleotid polimorfizmidir. Çalışmada, T alleli taşıma durumunun kronik periodontitis için daha az risk taşıdığı belirtilmiştir [165].

Rai ve arkadaşlarının yayınladığı bir başka çalışmada, MMP-9'un erken periodontitis tanısı için belirteç olabileceği bildirilmiştir [166].

Zhang ve arkadaşları, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmde, T alleli taşımanın makrofaj aktivitesini arttırdığını göstermiş ve bu polimorfizmin fonksiyonel önemini vurgulamıştır [167].

Vokurka ve arkadaşları, ergenlik çağındaki bireylerde IL-8 ve MMP-9 gen polimorfizmi ile gingivitisin ilişkisini araştırmış ve bu genlerdeki polimorfizmlerin

çocuk yaşlarda periodontitis gelişimi için risk oluşturabileceğini göstermişlerdir [168].

Coratti ve arkadaşları, MMP-2 ve MMP-9'nun periodontitiste ECM yıkımında kritik etkisi olduğunu ve söz konusu enzimlerin bu anlamda özellikle doku yıkımını başlatmada önemli olduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, periodontitis ve bu genlerdeki polimorfizm çalışmalarının önemini tekrar vurgulamışlardır. [169].

Isaza-Guzman ve arkadaşları MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ve periodontitis arasındaki ilişkiyi, Kolombiya popülasyonunu temsil eden bir örnekleme araştırmışlardır. Bu örnekleme bu polimorfizm ve periodontitis arasında ilişki bulunamamıştır ( $p=0,0663$ ) [170].

Loo ve arkadaşları, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ve kronik periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırmış ve anlamlı sonuç bulmuşlardır. Bu genden sentezlenen MMP-9 proteinin periodontitisin tanı ve tedavisinde markır olarak kullanılmasının uygun olacağını rapor etmiştir [171].

Li ve arkadaşları, Çin popülasyonunda aynı gen polimorfizmini araştırmışlardır. Çin popülasyonu için T alleli taşımanın kronik periodontitise yatkınlığı arttırdığını bildirmiştir [172].

Carneiro ve arkadaşlarının Brezilya'da yaptığı bir araştırmada ise, periodontal lezyonlarda MMP-9 gen ekspresyonun arttığını ve apikal periodontitis lezyonlarında ECM yıkımında MMP-9 geninin artan ekspresyonunun sorumluluğu olabileceği gösterilmiştir [173].

Keles ve arkadaşları Türk popülasyonunda MMP-9 -1562 C/T polimorfizmi ve kronik periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada bir kronik periodontitis tipi olan generalize kronik periodontitisli hasta grubu ve kontrol grubu bulunmaktadır. Çalışma sonucunda generalize kronik periodontitis ve bu polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir [174].

Wang ve arkadaşlarının Çin'de yaptığı başka bir araştırmada, MMP-9 gen polimorfizmi ve GAP arasındaki korelasyon incelenmiştir. Yapılan çalışmada MMP-9 gen polimorfizmi ve GAP arasında bir ilişki bulunmamıştır [175].

Gürkan ve arkadaşları da, Türkiye popülasyonunda GAP ile MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmada T alleli taşıma oranı, kontrol ve GAP'li hastalarını içeren gruplar arasında oldukça farklı bulunmuştur. Bu alleli taşıma oranının kontrol grubunda daha fazla olduğu belirtilmiştir [176].

Hallo ve arkadaşları Çek popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme, MMP-9 gen polimorfizmi ve kronik periodontitis hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada, Çek popülasyonunun bu polimorfizm için risk taşımadığını ortaya koymuşlardır [177].

Pan ve arkadaşları periodontitis ve MMP-9 gen polimorfizmini geniş bir çalışma grubu ile yapmıştır. Yaptıkları çalışmaya 628 hasta ve 689 kontrol dahil etmişlerdir. Sonuçlar, periodontitis ve MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi arasında ilişki olduğunu göstermiştir [178].

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Klinik Çalışmalar**

#### **2.1.1. Periodontal Muayeneler**

Bu araştırma, kronik periodontitis ve agresif periodontitis hastaları ile periodontal açıdan sağlıklı kontrol bireyleri üzerinden yürütülmüştür. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.B.D ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.B.D'lerine, periodontal sorunları nedeniyle ve tedavi amacıyla başvuran, sistemik açıdan sağlıklı, çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden TNF-R2 gen polimorfizmi için, 47 (31 kadın, 16 erkek) AP ve 54 (26 kadın, 28 erkek) KP hastası ve 54 (33 kadın, 21 erkek) sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 155 birey; MMP-9 gen polimorfizmi için ise, 71 (48 kadın, 23 erkek) AP ve 99 (51 kadın, 48 erkek) KP hastası ve 60 (37 kadın, 23 erkek), sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 230 birey dahil edilmiştir. Çalışma hakkında bilgilendirilen tüm katılımcıların yazılı ve sözlü onayları alınmıştır.

Tüm bireylerin anamnezleri alınarak klinik periodontal muayeneleri yapılmıştır. Periodontal parametre değerleri kaydedilmiş (periodontal sondlama derinliği,

linik ataçman düzeyi, dişeti indeksi, dişeti kanama indeksi, plak indeksi) ve panoramik radyografları çekilmiştir.

### **2.1.2. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi**

Tüm bireylerden EDTA' lı vakumlu tüpler içerisine 5-10 ml kan örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler, +4°C de saklanmıştır. Çalışmaya katılan bireylerde sistemik hastalık olmamasına dikkat edilmiştir.

## **2.2. Laboratuvar Çalışmaları**

### **2.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

1. 200 µl insan tam kan örneği steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. 300 µl Tris-EDTA (pH:8.0) tamponu tüpteki örneğin üzerine eklendi.
3. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi ve supernatan atıldı.
4. Pelletin üzerine 300 µl Tris-EDTA tamponu eklendi ve pellet tamponun içinde işaret parmağıyla tüpün dışından hafifçe vurularak tekrar çözüldü ve 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi.
5. 2 ve 4. basamaklar 3'er defa tekrar edildi.
6. Tüpün üzerine 300 µl Tris-EDTA-NaCl (pH:8.0) tamponu, 30 µl 100 mM Tris-HCl (pH:8.0), 5 µl Proteinaz K ve 10 µl %20 SDS eklenerek tüp alt-üst edildi ve 56 °C 'de 2 saatlik inkübasyona bırakıldı.
7. Tüpün üzerine, tüm fenol ve kloroform basamakları çeker ocağın altında gerçekleştirilmek koşuluyla, 445 µl fenol eklendi ve organik ve sıvı fazlar, tüp alt-üst edilerek karıştırıldı.
8. Bu iki faz, tüp 6.000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek ayrıştırıldı.
9. Nükleik asitleri içeren üst sıvı faz mikropipetle alınarak başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 250'şer µl fenol ve kloroform eklendi.
10. Tüp 20 defa alt-üst edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi.
11. Supernatan mikropipetle başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 250 µl soğuk %96'lık etil alkol eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi.

12. Tüpün dibinde kalan nükleik asit çökeleğinin üzerinden alkol uzaklaştırıldı ve çökeleğin üzerine 250 µl %70 etil alkol eklenerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi.

13. Peletin üzerinde kalan alkolün fazlası uzaklaştırıldı ve çökelek 100 µl Tris-EDTA (pH:8.0) tamponunda çözüldü.

14. Uzun süre dayanması için DNA örneği -20 °C'de saklandı.

#### **TE Tamponu (pH:8.0)**

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

#### **Tris-NaCl-EDTA Tamponu (pH:8.0)**

100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

### **2.2.2. İzole Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez ile Kontrol Edilmesi**

Periferik kandan izole edilen genomik DNA'nın varlığı agaroz jel elektrofrez kullanılarak kontrol edildi. Kontrol için %1'lik agaroz jel hazırlandı ve DNA varlığı agaroz jel elektrofrez ile kontrol edildi.

%1'lik Agaroz Jelin Hazırlanması:

1. Hassas terazide 1 g agaroz (Lonza) tartıldı ve 200 ml'lik erlenmayer içerisine aktarıldı. Üzerine 100 ml 1XTBE tamponu (Tris-Borat EDTA tampon, 50 mM Tris, 50 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH:8.3) eklendi ve içerisindeki agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında kaynatıldı.

#### **10X TBE Tamponu (pH 8.3) Hazırlanması**

31 g borik asit (MA:61,83; Sigma)

3.725 g EDTA (MA:372,24; Sigma)

60.55 g Tris (121,14; Sigma)

Hazırlanan 10XTBE çözeltisi stok olarak kullanıldı ve elektrofrez sırasında 1:10 oranında seyreltildi.

2. Çözülen agaroz jel, elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde 8µl 0.5 µg/ml Etidyum bromür ilave edildi ve iyice karıştırıldı. (Etidyum bromür kuvvetli bir

mutajen olup, DNA ile interkalasyon yaparak DNA'nın UV ışığı altında görülebilmesini sağlar.)

3. Agaroz jel elektroforez kalıbına kuyucukları oluşturmak amacı ile uygun taraklar yerleştirildi. Yeteri kadar soğuyan jel, tek bir köşeden hava kabarcığı kalmayacak ve sızıntı olmayacak şekilde döküldü. Polimerleşmesi için 30 dakika beklendi.

4. Polimerleşen jelden taraklar dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına alındı.

5. Elektroforez tankı 1XTBE tamponu ile dolduruldu. Periferik kandan izole edilen genomik DNA 'dan 8 µl; bromophenol blue içeren yükleme tamponundan 2 µl karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Bazı örneklerde 6xOrange yükleme boyası (Thermo Scientific) kullanıldı. (Yükleme tamponu DNA 'nın kuyucuklara düzgün bir şekilde yerleşmesini sağlamaktadır.)

#### 6x Yükleme tamponu (25 ml) hazırlanması

0.0625 g Brom Fenol mavisi

10 g Sükroz

15 ml 10X TBE tamponu

Son hacim 25 ml'ye distile su ile tamamlandı.

6. Örnekler, 5V/cm'lik elektroforetik alanda 90 V'da 45 dakika yürütüldü.

7. Jeldeki DNA bantları, 300 nm dalga boyundaki UV lambası kullanılarak gözlemlendi.

### **2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz zincir reaksiyonu, genomik DNA dizisindeki istenilen bölgelerinin özgül primerler kullanılarak *in vitro*'da  $10^6$  kata kadar çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından bulunmuş ve bu buluşu kendisine 1993'te Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır.

PCR tekniği günümüzde, prenatal tanı, mutasyon taramaları, dizi analizi çalışmaları, adli tıpta DNA parmak izi çalışmaları gibi çok çeşili alanlarda sıklıkla kullanılan önemli bir yöntemdir.

PCR tekniği üç temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

1. Denatürasyon: Bu basamakta çoğaltılacak DNA tek zincirli hale getirilene kadar belirli bir süre 90°-95°C'de ısıtılır.
2. Bağlanma (Annealing): İkinci basamakta, sıcaklık derecesi kullanılan primerlere özgül olmak koşuluyla 50°-70°C'lere düşürülür ve primerlerin kalıp DNA'da komplementer dizilere hidrojen bağları ile bağlanması sağlanır.
3. Uzama (Extension): Uzamanın gerçekleştirildiği bu basamakta, ısıya dayanıklı *Taq polimeraz* enzimi ile yaklaşık 72°C sıcaklıkta dNTP'lerin DNA'ya 5' → 3' yönünde bağlanması ve çift zincirli DNA ürününün sentezlenmesi sağlanır.

### 2.2.3.1. TNF-R2 (+587 T/G) Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

TNF-R2 (+587 T/G) polimorfik gen bölgesini içine alan 242 bç'lik bölgenin nükleotit dizisi ve primerlerin yeri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Optimize edilmiş PCR karışımının bileşenleri ve miktarları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

**ACTCTCCTATCCTGCCTGCT**GGGGCCCGTGAATGAGCCCAGCC  
ACCCAGCCACTCTGTCCCCTGCTGCCTCCTGACCAAGCCTCCT  
CCTCCTCCAGCTGTAACGTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAG  
**CATG**GATGCAGTCTGCACGTCCACGTCCCCCACCCTGGAGTAT  
GGCCCCAGGGGCAGTACACTTACCCAGCCAGTGTCCACACG  
ATCCCAAC**ACACGCAGCCAACTCCAGAA**

**Şekil 2.1.** TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesini içeren nükleotit dizisi ve bu bölge üzerinde ileri-geri primerlerin gösterimi. İleri primer yeşil renk ile, geri primer kırmızı renk ile ve çoğaltılan bölge ise altı çizilerek belirtilmiştir. Koyu renkli bölgede *Hin1II (NlaIII)* kesim enzimin tanıma dizisi belirtilmiştir. Altı çizili bölge içindeki genin normal dizisinde T olarak kodlanan mavi renkle gösterilen tek nükleotit, G ile yer değiştirdiğinde *Hin1II (NlaIII)* enzimi için kesim noktası oluşturulmaktadır.



**Tablo 2.1.** TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesinin PCR ile çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>1X25µL</b>
Kalıp DNA	2 µl
10X PCR Tamponu	2,5 µl
2.5 Mm dNTP karışımı	2 µl
100 pmol ileri primer	0,2 µl
100 pmol geri primer	0,2 µl
Hot Start Taq polimeraz (5 U/ µl)	0,25 µl
Steril distile H <sub>2</sub> O	14,85 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>Σ= 25 µl</b>

**TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesi için PCR koşulları**

Ön Denatürasyon	95°C	10 dakika	
Denatürasyon	94°C	1 dakika	} 35 Döngü
Bağlanma	56°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	7 dakika	

**TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesinin primer dizisi**

İleri (F) primer: 5' ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT 3'

Geri (R) primer: 5' TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT 3'

TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesinin PCR'ı için; Tablo 2.1'de verilen miktarlarda hazırlanan karışım ile kalıp DNA buz üzerinde iyice karıştırılarak Biometra Thermal Cycler cihazına konulmuştur. Reaksiyon yukarıda verilen sıcaklık koşullarında ve sürelerinde 35 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3.2. MMP-9 Geninin (-1562 C/T) Polimorfik Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

MMP-9 geninin promotorundaki (-1562 C/T) polimorfik bölgeyi içine alan 435 bç'lik bölgenin nükleotit dizisi ve primerlerin yeri Şekil 2.2 'de gösterilmiştir. Optimize edilmiş PCR karışımının bileşenleri ve miktarları Tablo 2.2.'de verilmiştir.

**GCCTGGCACATAGTAGGCC**TTTAAATACAGCTTATTGGGCCG  
GGCGCCATGGCTCATGCCCGTAATCCTAGCACTTTGGGAGGC  
CAGGTGGGCAGATCACTTGAGTCAGAAGTTCCAGCCTGGTCAA  
CGTAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTTAGCCA  
GGCGTGGTGGC**GCAT**GCCTATAATACCAGCTACTCGGGAGGC  
TGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGCAGATGTTGCA  
GTGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGCGAA  
AACAGAGTGATACTACACCCCCCAAAAATAAAATAAAATAAATA  
AATACAACCTTTTTGAGTTGTTAGCAGGTTTTTCCCAAATAGGGC  
TTTGAAGAAGGTGAATATAGACCCTGCCC**GATGCCGGCTGGCT**  
**AGGAAG**

**Şekil 2.2.** MMP-9 gen dizisi üzerinde ileri-geri primerlerin ve çoğaltılan 435 bç'lik bölgenin gösterimi. İleri primer yeşil renk ile, geri primer kırmızı renk ile ve çoğaltılan bölge ise altı çizilerek belirtilmiştir. Koyu renkli bölgede *PaeI* (*SphI*) kesim enzimin tanıma dizisi belirtilmiştir. Altı çizili bölge içindeki genin normal dizisinde C olarak kodlanan mavi renkle gösterilen tek nükleotit, T ile yer değiştirdiğinde *PaeI* (*SphI*) enzimi için kesim noktası oluşturulmaktadır.

**Tablo 2.2.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) polimorfik bölgesinin PCR ile çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>1X25<math>\mu</math>L</b>
Kalıp DNA	2 $\mu$ l
10X PCR Tamponu	2.5 $\mu$ l
25 Mm MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
10 Mm dNTP karışımı	0.5 $\mu$ l
100 pmol ileri primer	0.2 $\mu$ l
100 pmol geri primer	0.2 $\mu$ l
Taq DNA polimeraz (5U/ $\mu$ l)	0.8 $\mu$ l
Steril distile H <sub>2</sub> O	15.8 $\mu$ l
<b>Toplam Hacim</b>	<b><math>\Sigma</math>= 25 <math>\mu</math>l</b>

**MMP-9 geninin (-1562 C/T) polimorfik bölgesine ait PCR koşulları**

Ön Denatürasyon	95°C	5 dakika	}	<b>35 Döngü</b>
Denatürasyon	94°C	1 saniye		
Bağlanma	62°C	45 saniye		
Uzama	72°C	45 saniye		
Son Uzama	72°C	5 dakika		

**MMP-9 geninin (-1562 C/T) polimorfik bölgesinin primer dizisi**

İleri (F) primer: 5' GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC 3'

Geri (R) primer: 5' CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC 3'

MMP-9 geninin (-1562 C/T) polimorfik bölgesinin PCR'ı için; Tablo 2.2.'de verilen miktarlarda hazırlanan karışım ile kalıp DNA buz üzerinde iyice karıştırılarak Biometra Thermal Cycler cihazına konulmuştur. Reaksiyon yukarıda verilen sıcaklık koşullarında ve sürelerinde 35 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü**

PCR işleminden sonra oluşan ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Ürünlerin uzunluklarını belirlemek amacı ile 100-10000 bp'lik belirteç (Fermantas) kullanılmıştır.

##### **2.2.4.1. TNF-R2 PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü**

TNF-R2 geninin tek nükleotit polimorfizmini belirlemek üzere, 242 bp'lik bölgenin PCR işlemi ile çoğaltılmasından sonra oluşan ürün, 60 ml hacmindeki, 3 µl Etidyum Bromür içeren %1.5'luk agaroz jelle her bir kuyucuğa 8 µl'lik hacimde ve 2 µl yükleme boyası eklenerek yüklenmiştir. PCR ürünü 100 Volt'luk elektroforetik alanda 45 dakika boyunca 1XTBE tamponu içerisinde yürütülmüştür. Bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

##### **2.2.4.2. MMP-9 PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü**

MMP-9 geninin tek nükleotit polimorfizmini belirlemek üzere, 435 bp'lik bölgenin PCR işlemi ile çoğaltılmasından sonra oluşan ürün, 60 ml hacmindeki, 3 µl Etidyum Bromür içeren %1.5'luk agaroz jelle her bir kuyucuğa 8 µl'lik hacimde ve 2 µl yükleme boyası eklenerek yüklenmiştir. PCR ürünü 100 Volt'luk elektroforetik alanda 45 dakika boyunca 1XTBE tamponu içerisinde yürütülmüştür. Bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

#### **2.2.5. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile Belirlenmesi**

Restriksiyon enzimleri, DNA'yı özgül tanıma bölgelerinden keserek, parçalara ayıran enzimlerdir. RFLP yöntemi; DNA'nın bu enzimler kullanılarak kesilmesi sonucunda elde edilen ürünlerin, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek bantlar halinde görüntülenmesi ve değerlendirilmesi esasına dayanır.

MMP-9 (-1562) C/T ve TNF-R2 (+587) T/G gen polimorfizmlerini belirlemek amacıyla MMP-9 geni için *PaeI* (*SphI*) (Fermentas)ve TNF-R2 geni için ise *Hin1II* (*NlaIII*) (Fermentas) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır.

Kullanılan restriksiyon endonükleazların tanıma dizileri aşağıda belirtilmiştir.

*PaeI* (*SphI*) 'nin Tanıma Dizisi:

5'...G C A T G ↓ C...3'

3'...C ↑ G T A C G ....5'

*Hin1II* (*NlaIII*) 'nin Tanıma Dizisi

5'...C A T G ↓.....3'

3'...↑ G T A C.....5'

### **2.2.5.1. TNF-R2 (+587 T/G) Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP yöntemi ile Belirlenmesi**

TNF-R2 genine ait PCR ürünleri aşağıda verilen miktarlarda enzim, tampon ve distile su ile reaksiyona sokulmuş ve enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 12-16 saat inkübe edilerek kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **1x30µl'lik RFLP karışımı**

PCR ürünü            15 µl

10xTampon B        2 µl

*Hin1II* (*NlaIII*)    1.5 µl (U)

Steril distile su     11.5 µl

RFLP sonucu oluşan kesim ürünleri 133 ve 109 bp'likuzunlukta oldukları için %2'lik agaroz jelde yürütülmüşve 100-1000 bp'lik DNA belirteçi (Gene Ruler) kullanılmıştır. Kesim ürününden 20 µl alınarak 5 µl yükleme boyası ile karıştırılmış ve 7 µl Etidyum Bromür içeren agaroz jele yüklenmiştir. 1XTBE tamponu içerisinde 1 saat boyunca 90 Volt'luk elektroforetik alanda yürütülerek bantların ayrılması sağlanmıştır. Oluşan bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

### **2.2.5.2. MMP-9 (-1562 C/T ) Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi**

MMP-9 genine ait PCR ürünleri, aşağıda verilen miktarlardaki enzim, tampon ve distile su ile reaksiyona sokulmuş ve enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 12-16 saat inkübe edilerek kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **1x30 µl'lik RFLP karışımı**

PCR ürünü	15 µl
10xBuffer B	2 µl
PaeI enzimi	1 µl(5U)
Steril distile su	12 µl

RFLP sonucu oluşan kesim ürünleri 247 ve 188 bç'lik uzunlukta oldukları için %2,5'lik agaroz jelde yürütülmüş ve 100-1000 baz çiftlik DNA belirteci(Gene Ruler) kullanılmıştır. Kesim ürününden 20 µl alınarak 5 µl yükleme boyası ile karıştırılmış ve 7 µl Etidyum Bromür içeren %2'lik agaroz jele yüklenmiştir. 1X TBE tamponu içerisinde 1 saat boyunca 90 Volt'luk elektroforetik alanda yürütülerek bantların ayrılması sağlanmıştır. Oluşan bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

### **2.2.6. İstatistiksel Analizler**

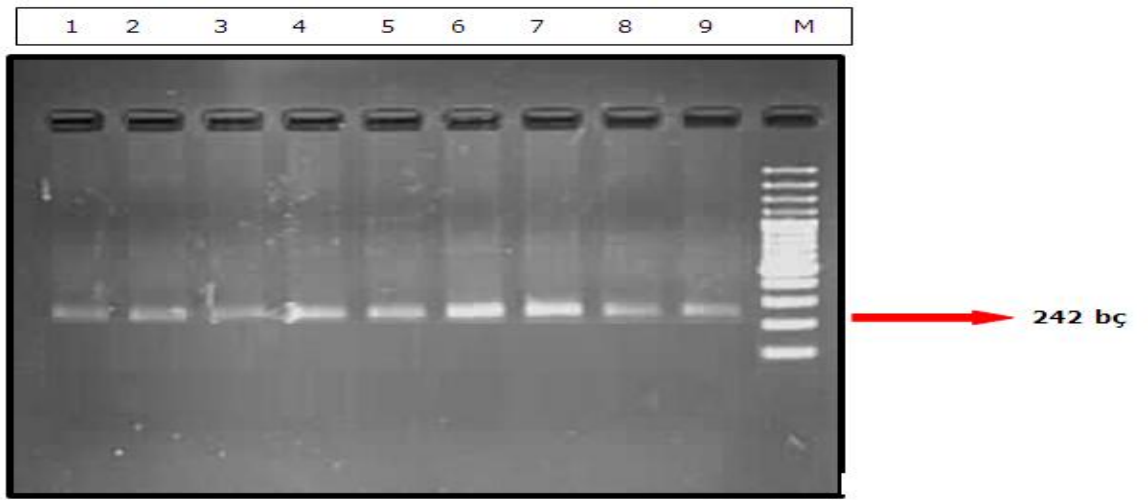
Araştırmamızda, elde edilen verileri değerlendirebilmek için SPSS version 15.0 for Windows (SPSS, Inc, USA) istatistik paket programı kullanılmıştır. Bu araştırmada, TNF-R2 ve MMP-9 tek nükleotit polimorfizmleri için çalışma gruplarımız olan kronik periodontitis, agresif periodontitis ve kontrol grupları arasında bu iki gen bölgesi için gen polimorfizm frekansları açısından fark bulunup bulunmadığı Ki-kare (Pearson Ki-kare ve Fisher' in kesin Ki-kare testi) testleri ile değerlendirilmiştir. Farkları p<0.001 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. PCR Sonuçları

##### 3.1.1. TNF-R2 Geni PCR Sonuçları

TNF-R2 geninin 6. ekzonuna ait +587 pozisyondaki polimorfizmi içeren nükleotit dizisinin PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürün, 242 bç büyüklüğünde olup bu ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.1.'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** TNF-R2 geninin 6. ekzonunda ait +587 pozisyonundaki polimorfizmi içeren 242 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi.( M: 100 bç'lik belirteç)

##### 3.1.2. MMP-9 Geni PCR Sonuçları

MMP-9 geninin promotor bölgesine ait (-1562) pozisyondaki polimorfizmi içeren nükleotit dizisinin PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucunda elde edilen ürün 435 bç büyüklüğünde olup, bu ürünün agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



**Şekil 3.2.** MMP-9 promotor bölgesinin (-1562) pozisyonundaki polimorfizmi içeren 435 bç'lik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. (M: 100 bç'lik belirteç )

### 3.2. RFLP Sonuçları

Yapılan çalışmada, TNF-R2 gen polimorfizmi araştırması için 54 kronik, 47 agresif olmak üzere toplam 101 periodontitis hastası ve 54 sağlıklı birey; MMP-9 gen polimorfizmi araştırması için, 99 kronik, 71 agresif olmak üzere toplam 170 periodontitis hastası ve 60 sağlıklı birey çalışılmış, bu bireylerin kan örneklerinden elde edilen DNA'nın, PCR ile çoğaltılmasından sonra TNF-R2 (+587 T/G) ve MMP-9 (-1562 C/T) polimorfik gen bölgelerine ait RFLP analizleri yapılmıştır.

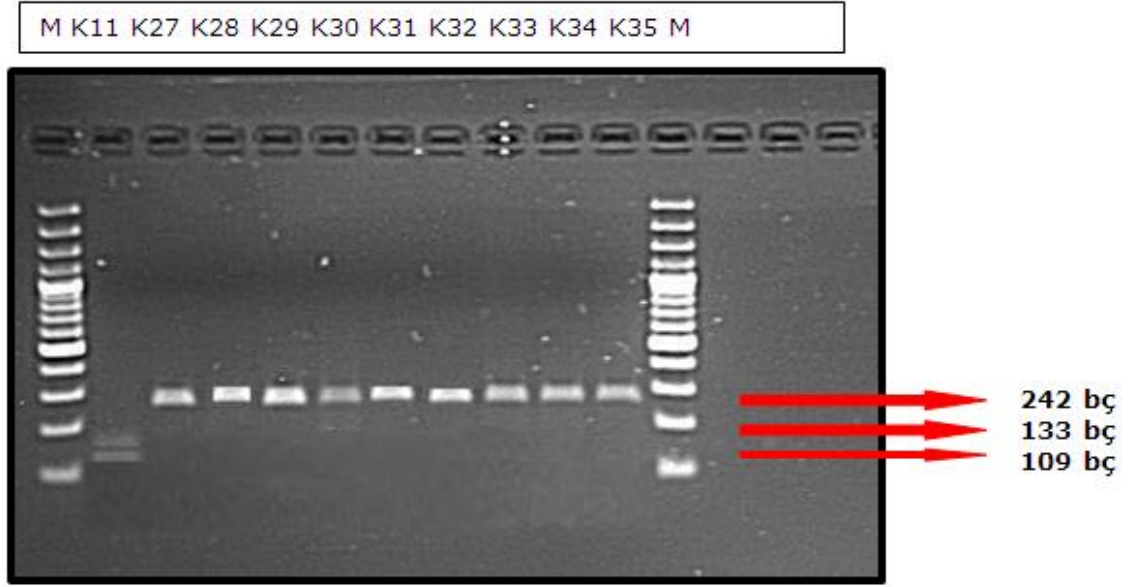
#### 3.2.1. TNF-R2 (+587 T/G) Polimorfik Bölgesinin *Hin1II (NlaIII)* Enzimi Kesim Sonuçları

*Hin1II (NlaIII)* enzimi ile yapılan kesimler sonucu:

1. Homozigot TNF-R2 (+587) GG genotipi: 133bç + 109bç uzunluğunda iki fragment
2. Heterozigot TNF-R2 (+587) TG genotipi: 242bç + 133bç + 109bç uzunluğunda üç fragment
3. Homozigot TNF-R2 (+587) TT genotipi: 242bç uzunluğunda fragment oluşmuştur.

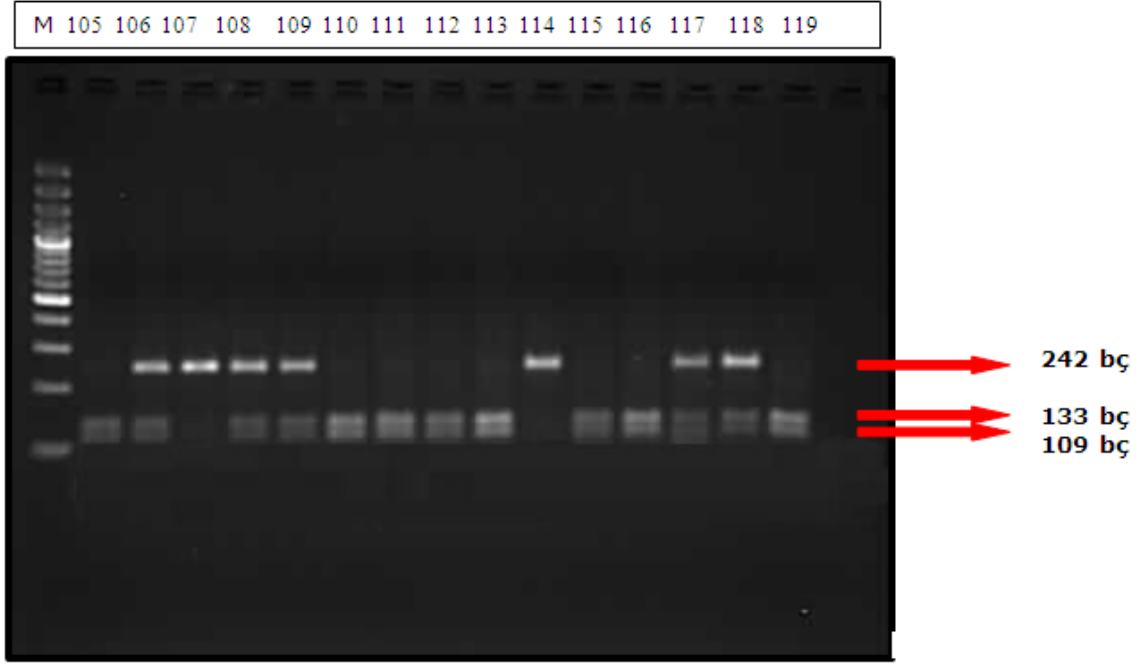
Fragmentlerin jel görüntüleri bu üç genotip açısından değerlendirilmiş ve bireylerin TNF-R2 (+587) polimorfizmine ait genotip profilleri belirlenmiştir.





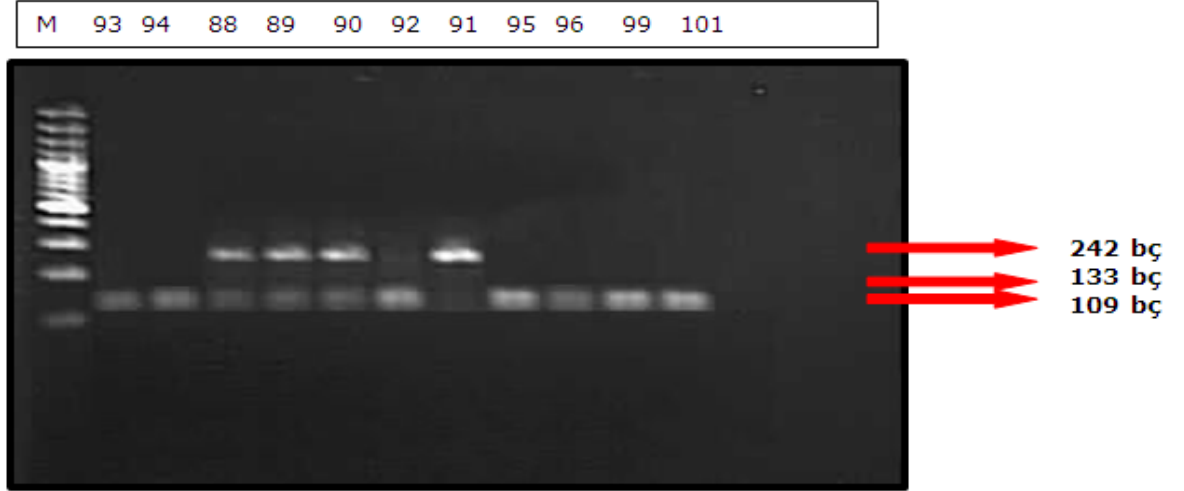
**Şekil 3.3.** TNF-R2 geninin (+587 T/G) bölgesinin *Hin1II* enzimi ile kesimi sonucu K11, K27-K35 numaralı kontrollerden elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç).

Bu polimorfizmini taşıyan ve GG genotipine sahip örnek, Şekil 3.3. 'te ikinci kuyucukta bulunan K11 numaralı kontrol grubuna ait bireydir. Homozigot TT genotipini taşıyan ve RFLP sonucu kesilmeden kalan kontrol grubu üyeleri ise sırasıyla K27, K28, K19, K30, K31, K32, K33, K34, K35 numaralı bireylerdir.



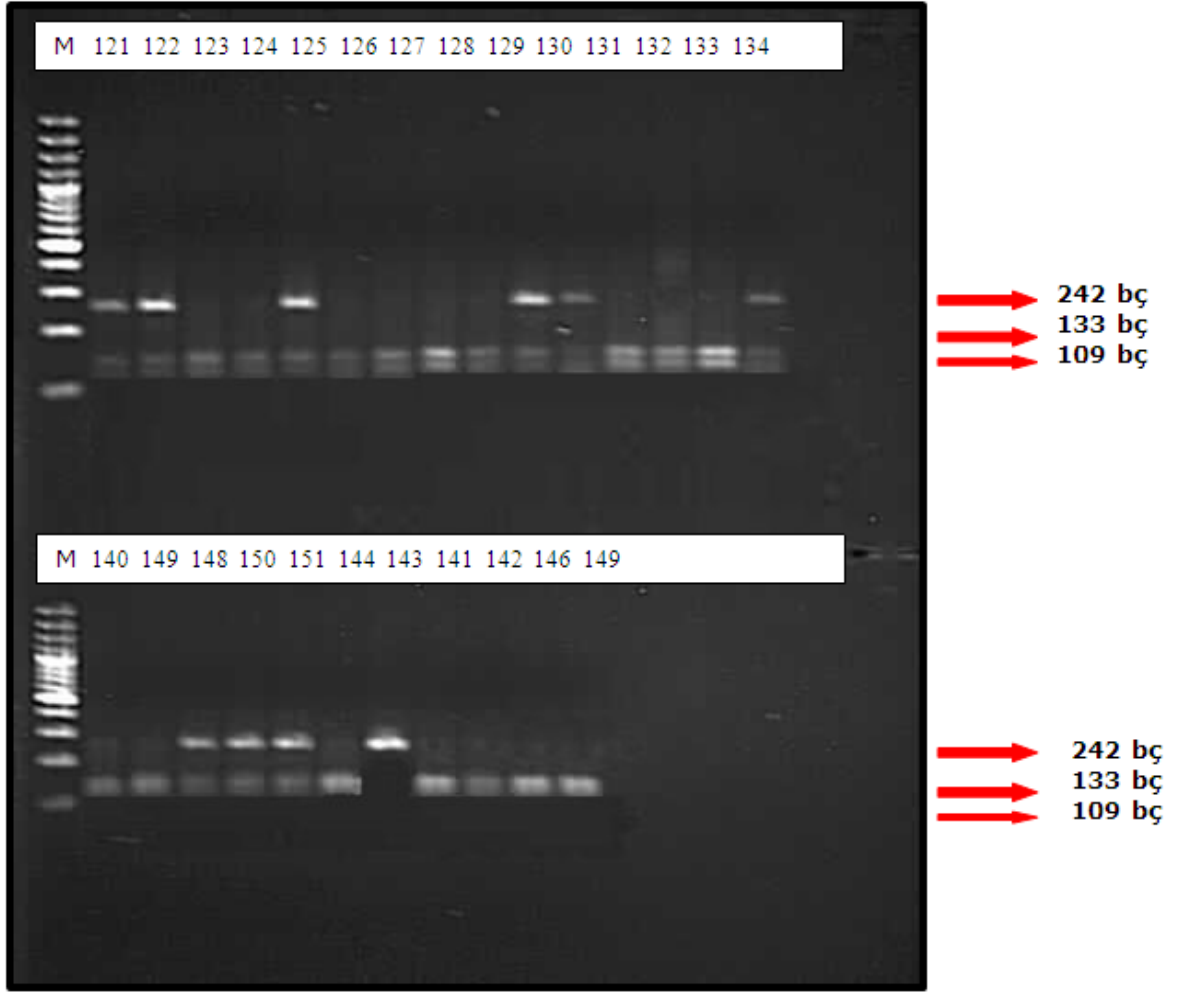
**Şekil 3.4.** TNF-R2 geninin (+587 T/G)polimorfik bölgesinin *Hin1II* enzimi ile kesimi sonucu 105-119 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç)

Şekil 3.4.'te her üç genotipe ait fragmenti içeren bir jel görüntüsü yer almaktadır. Bu şekle göre 107 ve 114 numaralı örnekler TNF-R2 (+587 T/G ) polimorfizmini taşımadığından *Hin1II* enzimi ile kesilmemiş ve 242 bç'lik tek bir fragment olarak kalmıştır. 105, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 119 numaralı örnekler ise bu bölgeye ait tek nükleotit polimorfizmini içerdiğinden dolayı *Hin1II* enzimi ile kesime uğramış ve sonuç olarak 133 bç ve 109 bç olmak üzere iki fragment oluşumu gözlenmiştir. Heterozigot genotipe sahip olan örnekler ise 106, 108, 109, 117, 118 numaralı bireylerdir ve kesim sonucu 242, 133 ve 109 bç'lik üç ayrı fragment oluşmuştur.



**Şekil 3.5.** TNF-R2 geninin (+587 T/G) polimorfik bölgesinin *Hin1II* enzimi ile kesimi sonucu 93,94,88,89,90,92,91,95,96,99,101 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100 bç'lik belirteç ifade edilmektedir.

TNF-R2 (+587 T/G) tek nükleotit polimorfizmini taşıyan ve GG genotipine sahip örnekler, Şekil 3.5'te 93, 94, 92, 95, 96, 99, 101 numaralı bireyler iken; Şekil 3.6. (a)'da 123, 124, 126, 127, 128, 129, 132, 133 numaralı bireylerdir. Homozigot TT genotipini taşıyan ve RFLP sonucu kesilmeden kalan örnekler ise Şekil 3.5. 'te 91; Şekil 3.6.(b) 'de ise 143 numaralı bireylerdir. heterozigot genotipine (TG) sahip bireyler Şekil 3.5. 'teki 88, 89, 90 numaralı bireyler; Şekil 3.6 '(a)'da 121, 122, 125, 130, 131, 134 numaralı bireyler ve Şekil 3.6.(b)'deki 148, 150, 151 numaralı bireylerdir.



**Şekil 3.6.** TNF-R2 geninin (+587 T/G) bölgesinin *Hin1II* enzimi ile kesimi sonucu üst tarafta 121-134 ve alt tarafta ise 140, 149, 148, 150, 151, 144, 143, 141, 142, 146, 149 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç)

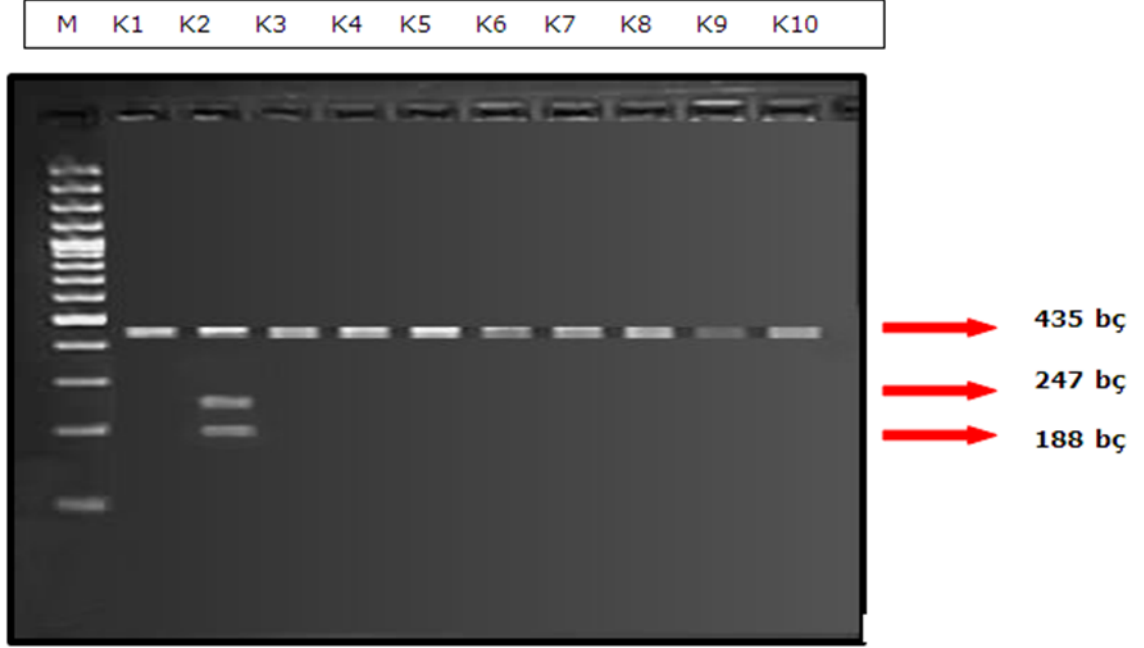
### 3.2.2. MMP-9 Promotoru (-1562 C/T) Polimorfik Bölgesinin *PaeI* (*SphI*) Enzimi Kesim Sonuçları

*PaeI* (*SphI*) enzimi ile yapılan kesimler sonucu;

1. Homozigot MMP-9 (-1562) TT genotipi: 247bç + 188bç uzunluğunda iki fragment
2. Heterozigot MMP-9 (-1562) CT genotipi: 435bç + 247bç + 188bç uzunluğunda üç fragment

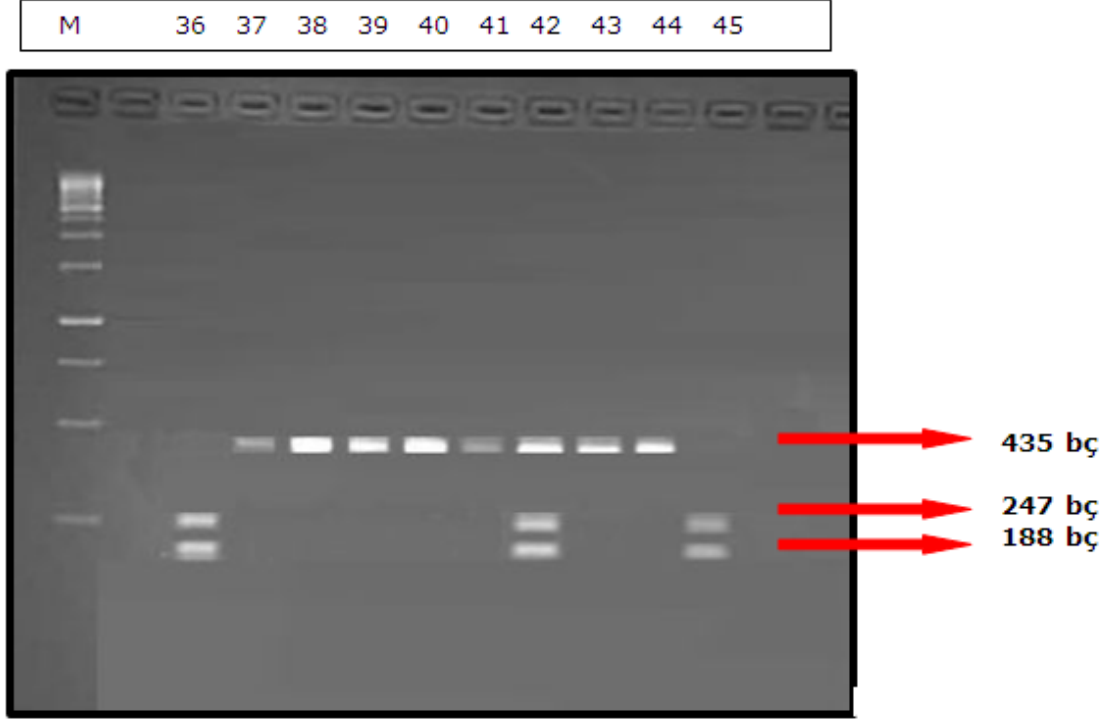
3. Homozigot MMP-9 (-1562) CC genotipi: 435bç uzunluğunda fragment oluşmuştur.

Fragmentlerin jel görüntüleri bu üç genotip açısından değerlendirilmiş ve bireylerin bu polimorfizme ait genotip profilleri belirlenmiştir.



**Şekil 3.7.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) bölgesinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu K1-K10 numaralı kontrollerden elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç)

MMP-9 (-1562 C/T) tek nükleotit polimorfizminde heterozigot CT genotipine sahip örnek, Şekil 3.7.'de ikinci kuyucukta bulunan K2 numaralı bireydir. Homozigot CC genotipini taşıyan ve RFLP sonucu kesilmeden kalan kontrol grubu üyeleri ise sırasıyla K1, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10 numaralı bireylerdir.

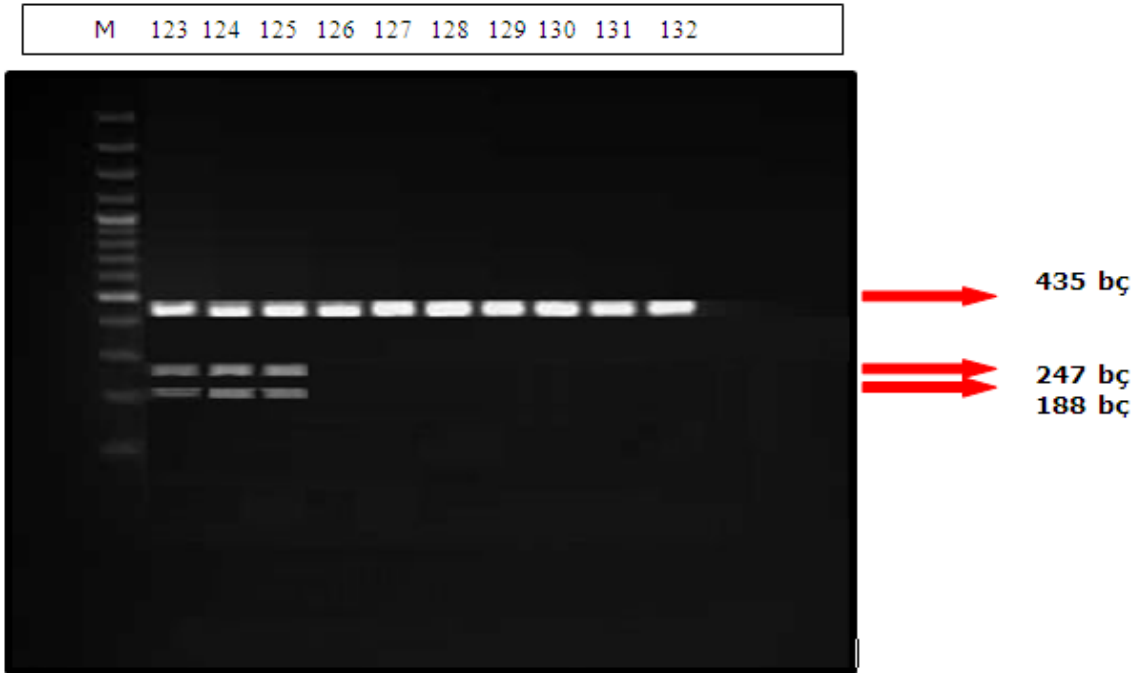


**Şekil 3.8.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) bölgesinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu 36-45 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. ( M : 250 bç'lik belirteç)

Şekil 3.8.' de her üç genotipe ait fragmenti içeren bir jel görüntüsü yer almaktadır. Bu şekle göre 37, 38, 39, 40, 41, 43 numaralı örnekler MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmini taşımadığından *PaeI* enzimi ile kesilmemiş ve 435 bç'lik tek bir fragment olarak kalmıştır. 35 ve 45 numaralı örnekler ise bu bölgeye ait tek nükleotit polimorfizmini içerdiğinden dolayı *PaeI* enzimi ile kesime uğramış ve sonuç olarak 247 bç'lik ve 188 bç'lik olmak üzere iki fragment oluşumu gözlenmiştir. Heterozigot genotipe sahip olan örnek ise 42 numaralı bireydir ve kesim sonucu 435, 247 ve 188 bç'lik üç ayrı fragment oluşmuştur.



**Şekil 3.9.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) bölgesinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu 144-157,161 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç)



**Şekil 3.10.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) bölgesinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu 123-132 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç).



**Şekil 3.11.** MMP-9 geninin (-1562 C/T) bölgesinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu 166-175 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. (M:100 bç'lik belirteç)

MMP-9 (-1562 C/T) tek nükleotit polimorfizminde heterozigot CT genotipine sahip örnekler, Şekil 3.9.'da 146, 150, 153, 154 numaralı bireyler iken Şekil 3.10. ve Şekil 3. 11.'de ise 123, 124, 125 ve 167, 168, 171, 173, 174 numaralı bireylerdir. Homozigot CC genotipini taşıyan ve RFLP sonucu kesilmeden kalan örnekler ise Şekil 3.9. 'da 144, 145, 147, 148, 149, 151, 152, 155, 156, 157, 161; Şekil 3.10. 'da 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 numaralı bireylerdir. Şekil 3.11. 'de ise 166, 169, 170, 172, 175 numaralı bireyler homozigot CC genotipine sahiptir.

### 3.3. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda bulunan gruplar, TNF-R2 (+587) T/G gen polimorfizmi için, cinsiyet ve yaş açısından değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerle hasta bireylerin karşılaştırılması yapıldığında, cinsiyet ve yaş bakımından hastaların periodontitise yatkınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum hastalığın genetik faktörlerle ilişkisi araştırılırken



benzer grupların seçildiğini ifade etmekte olup, genetik polimorfizmin hastalıkla ilişkisini araştırırken daha anlamlı sonuçlar sunmaktadır ( $p>0,001$ ) [Tablo 3.1.].

**Tablo 3.1.** TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi için kontrol, KP ve AP gruplarının cinsiyet ve yaş açısından karşılaştırılması

		Grup			
		Kontrol n(%)	Kronik Periodontitis n(%)	Agresif Periodontitis n(%)	p
Cinsiyet	Erkek	21 (38,9)	28 (51,9)	16(34,0)	0,166
	Kadın	33 (61,1)	26 (48,1)	31 (66,0)	
Yaş ortalaması		28,1	31,8	34,2	

Çalışmamızda TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmine ait RFLP sonuçlarına göre, 54 bireylik KP grubunda TNF-R2 (+587) TT homozigot genotipi 9 (%16,7) bireyde, TNF-R2 (+587) TG heterozigot genotipi 22 (%40,7) bireyde ve TNF-R2 (+587) GG homozigot genotipi ise 23 (%42,6) bireyde gözlenmiştir. Agresif periodontitis grubuna ait 47 bireyde, TNF-R2 (+587) TT homozigot genotipi 8 (%17) bireyde, TNF-R2 (+587) TG heterozigot genotipi 16 (%34) bireyde ve TNF-R2 (+587) GG homozigot genotipi ise 23 (%48,9) bireyde belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait 54 bireyde ise TNF-R2 (+587) TT homozigot genotipi 33 (%61,1) bireyde, heterozigot TG genotipi 10 (18,5) bireyde, homozigot GG genotipi ise 11 (%20,4) bireyde gözlenmiştir. Kontrol, KP ve AP grupları arasında genotipler ve allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Allel frekansı açısından kontrol grubunda T allel frekansı yüksek oranda bulunurken; KP ve AP hasta grubunda ise G allel frekansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Genotip frekansları açısından KP ve kontrol grupları ile AP ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenirken ( $p<0,001$ ) KP ve AP grupları arasında genotip frekansları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0,770$ ;  $p>0,001$ ) [Tablo 3.2.].

**Tablo 3.2.** TNF-R2 (+587) T/G gen polimorfizmine ait kontrol KP ve AP gruplarının genotip ve allel frekans dağılımları

			Grup			$\chi^2$	sd	p
			Kontrol n(%)	Kronik Periodontitis n(%)	Agresif Periodontitis n(%)			
TNF-R2	Genotipler	TT	33 (61,1)	9 (16,7)	8 (17,0)	32,238	4	<0,001
		TG	10 (18,5)	22 (40,7)	16 (34,0)			
		GG	11 (20,4)	23 (42,6)	23 (48,9)			
	Allel Frekansı	T	76 (70,4)	40 (37,0)	32 (34,0)	34,197	2	<0,001
		G	32 (29,6)	68 (63,0)	62 (66,0)			

Çalışmamızda kullandığımız gruplar, MMP-9 (-1562 C/T) gen polimorfizmi için, cinsiyet ve yaş açısından da değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerle hasta bireylerin karşılaştırılması yapıldığında, cinsiyet ve yaş bakımından hastaların periodontitise yatkınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,001$ ). Bu durum hastalığın genetik faktörlerle ilişkisi araştırılırken benzer grupların seçildiğini ifade etmektedir [Tablo 3.3.].

**Tablo 3.3.** MMP-9 (-587 C/T) gen polimorfizmi için kontrol, KP ve AP gruplarının cinsiyet ve yaş açısından karşılaştırılması

		Grup			p
		Kontrol n (%)	Kronik Periodontitis n (%)	Agresif Periodontitis n (%)	
Cinsiyet	Erkek	23 (38,3)	48 (48,5)	23 (32,4)	0,098
	Kadın	37 (61,7)	51 (51,5)	48 (64,6)	
Yaş ortalaması		28,1	31,8	34,2	

Çalışmamızda MMP-9 (-1562 C/T) gen polimorfizmine ait RFLP sonuçlarına göre, 99 bireylik KP grubunda MMP-9 (-1562) CC homozigot genotipi 70 (%70,7) bireyde, MMP-9 (-1562) CT heterozigot genotipi 26 (%26,3) bireyde ve MMP-9 (-1562) TT homozigot genotipi ise 3 (%3) bireyde gözlenmiştir. 71 bireylik AP grubunda, MMP-9 (-1562) CC homozigot genotipi 46 (%64,8) bireyde, MMP-9 (-1562) CT heterozigot genotipi 23 (%32,4) bireyde ve MMP-9 (-1562) TT homozigot genotipi ise 2 (%2,8) bireyde belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait 60 bireyde ise MMP-9 (-1562) CC homozigot genotipi 57 (%95) bireyde, heterozigot CT genotipi 2(%3,3) bireyde, homozigot TT genotipi ise 1 (%1,7) bireyde gözlenmiştir. Kontrol, KP ve AP grupları arasında genotipler ve allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p<0,001$ ). Allel frekansı açısından kontrol grubunda C alleli frekansı yüksek oranda bulunurken; KP ve AP hasta grubunda T alleli frekansının yüksek olduğu belirlenmiştir. Genotip frekansları açısından KP ve kontrol grupları ile AP ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenirken ( $p<0,001$ ) KP ve AP grupları arasında genotip frekansları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0,774$ ,  $p>0,001$ ) [Tablo 3.4.].

**Tablo 3.4.** MMP-9 (-1562) C/T gen polimorfizmine ait kontrol KP ve AP gruplarının genotip ve allel frekans dağılımları

			Grup			$\chi^2$	sd	p
			Kontrol n (%)	Kronik Periodontitis n (%)	Agresif Periodontitis n (%)			
MMP-9	Genotipler	CC	57 (95,0)	70 (70,7)	46 (64,8)	22,019	4	<0,001
		CT	2 (3,3)	26 (26,3)	23 (32,4)			
		TT	1 (1,7)	3 (3)	2 (2,8)			
	Allel frekansı	C	116 (96,7)	166 (83,8)	115 (81)	15,318	2	<0,001
		T	4 (3,3)	32 (16,2)	27 (19)			

Çalışmamızda bulunan iki gen bölgesi ile ilgili genotip ve allel frekansı dağılımlarının karşılaştırılması Tablo 3.5.'te toplu olarak verilmiştir.

**Tablo 3.5.** TNF-R2 ve MMP-9 SNP gen polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansı dağılımlarının karşılaştırılması

			Kontrol n (%)	KP n (%)	AP n (%)	$\chi^2$	sd	p
TNF-R2	Genotip	TT	33 (61)	9 (16,7)	8(17)	32,238	4	<0,001
		TG	10(18,5)	22(40,7)	16(34)			
		GG	11(20,4)	23(42,6)	23(48)			
	Allel frekansı	T	76(70,4)	40(37)	32(34)	34,194	2	<0,001
		G	32(29,6)	68(63)	62(66)			
MMP-9	Genotip	CC	57(95)	70(70,7)	46(64,8)	22,019	4	<0,001
		CT	2(3,3)	26(26,3)	23(32,4)			
		TT	1(1,7)	3(3)	2(2,8)			
	Allel frekansı	C	116(96,7)	166(83,8)	115(81)	15,318	2	<0,001
		T	41(3,3)	32(16,2)	27(19)			

### 3.4. Tartışma

Periodontitis, patojen mikroorganizma kaynaklı ürünlere verilen bağışıklık cevabı sonucu başlatılan, çevresel ve genetik etmenlerin kompleks etkilerinin rol oynadığı çok faktörlü, enfeksiyonel bir hastalıktır [13]. Konakçının yangısal cevabını etkileyen genetik faktörler, hastalığa yatkınlıkta ve hastalığın çeşitli aşamalarının seyrinde önem arz etmektedir [37].

Genetik koda ait bazı varyasyonlar, kodlanan genin farklı ifadesi ya da fonksiyonel değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Farklı genotipe sahip bireylerin oluşmasına yol açan bu durum, bireylerin hastalığa yatkınlıklarını ve hastalığın şiddetini arttırabilmektedir [38]. Bu nedenle son yıllarda hastalıklar ile gen polimorfizimleri arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmak ve hastalıklara ilişkin aday genleri tespit etmek, hastalığa tanı koymada ve tedavi yollarını belirlemede önemli bir yol gösterici olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bağışıklık ve yangısal cevap ile bağlantılı birçok gen polimorfizminin, periodontitisin yangısal aşamalarında hastalığa karşı olan duyarlılığı ve hastalığın şiddetini arttırdığı bilinmektedir. Bu anlamda periodontitisle ilişkili gen polimorfizmlerinin önemli bir kısmını sitokin gen polimorfizimleri oluşturmaktadır. Sitokin polimorfizmlerinden biri TNF- $\alpha$  gen polimorfizmidir. TNF- $\alpha$ 'nın yüzey reseptöründen biri TNF-R2'dir. Bu reseptör periodontitisinin çeşitli yangısal aşamalarının başlamasında ve hastalığın patogeneğinde aktif rol almaktadır. Periodontitis ve TNF-R2 gen polimorfizmi arasındaki ilişki çeşitli popülasyonlarda birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Shimada ve arkadaşlarının 2009 yılında Japon popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi ile kronik periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda bu gen polimorfizmi ile kronik periodontitis arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0,0075$ ). Bu çalışmada +587 G allelinin frekansı kronik periodontitis grubunda kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir [45]. Kim ve arkadaşlarının Kore popülasyonunda yaptığı bir çalışmada ise generalize agresif periodontitis ile TNF-R2 (+587 T/G) arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan çalışmada generalize agresif periodontitisli grupta, TT genotipi %7,5; TG genotipi %32,5; GG genotipi %60 oranlarında bulunmuştur. T alleli frekansı açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmiş ve TNF-R2 (+587 T/G)

polimorfizminin hastalık ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [163]. Fujita ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada da 14 fonksiyonel gen polimorfizmi ile periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırılmış, TNF-R2 gen polimorfizmleri ile çeşitli periodontal hastalıklar arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir [137]. Kobayashi ve arkadaşları, 319 periodontitisli hasta ve 303 kontrol grubunu kapsayan bir çalışmada TNF-R2 gen polimorfizminin kronik periodontitis ile ilişkisini saptamıştır [156] Morita ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, Fujita ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarını destekler nitelikte TNF-R2 'nin yüksek ekspresyonunun periodontitis için belirteç olabileceği vurgulanmıştır [159]. Schenkein ve arkadaşları ise, TNF-R2 geninin ekspresyonunun periodontitisli hastalarda arttığını ve bu artan ekspresyonun immün cevapta etkili olan sitokinlerden IL-6'nın salınımını arttırdığını rapor etmişlerdir [160]. Ikezawa ve arkadaşlarının yürüttüğü bir klinik çalışmada, kronik periodontitisli hastaların DOS'undan alınmış örneklerde TNF- $\alpha$  reseptörleri olan TNF-R1 ve TNF-R2 genlerinin ifadesi oldukça yüksek bulunmuş ve bu iki reseptörün gen polimorfizmlerinin kronik periodontitis ilişkili olabileceği vurgulanmıştır [161]. Khoshhal ve arkadaşları İran'da TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmi çalışmasında 35-72 yaşları arasındaki kronik periodontitisli bireyleri ve kontrol grubunu kapsayan bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda kontrol grubu ile kronik periodontitisli grup arasında TNF-R2 gen polimorfizmi açısından anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir ( $p=0,58$ ) [162]. Shimada ve arkadaşlarının, GAP ve TNF-R1 ve TNF-R2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmasında ise, GAP ve TNF-R2 gen polimorfizmi arasında bir ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir [164].

TNF-R2 (+587 T/G) gen polimorfizmine ait Türk popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme yaptığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla yapılan istatistiksel analizler sonucunda, periodontitis ile bu gen polimorfizmi arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, kontrol, AP ve KP grupları arasında genotip ve allel frekansları açısından anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Genotip frekanslarına bakıldığında homozigot GG genotipi oranları gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. GG genotipi AP grubunda %48,9 oranında gözlenirken, KP grubunda %42,6 ve kontrol grubunda %20,4 olarak gözlenmiştir. Polimorfik allel olan G alleli frekanslarının da gruplar arasında

değişiklik gösterdiği ve G alleli taşıma oranının hasta gruplarda kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, Türk popülasyonunda, TNF-R2 (+587) homozigot GG genotipinin ve polimorfik G alleli taşımanın hastalığın insidansını ve şiddetini arttırdığı yorumuna varılabilmektedir.

Literatürdeki çalışmalardan Shimada ve arkadaşlarının, Kim ve arkadaşlarının, Fujita ve arkadaşlarının, Kobayashi ve arkadaşlarının, Morita ve arkadaşlarının, Ikezawa ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara benzer olarak; Khoshhal ve arkadaşlarından ise farklı olarak çalışmamız, hem homozigot GG genotip varlığında hastalığın sıklığının artması hem de G alleli frekansları arasındaki anlamlı fark bulunması nedeniyle, genotipe G alleli taşımanın periodontitis açısından risk taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle Türk popülasyonunda TNF-R2 (+587) polimorfik G alleli taşımanın, periodontitis ile ilişkili bir risk faktörü olarak göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir. Hastalığa ilişkin elde edilen bu bulgu üzerinde, daha kapsamlı ve daha fazla bireyi içerecek çalışmaların planlanması halinde, ileride bu genotipin ya da allelin, hastalığa ait bir belirteç olarak kullanılma imkanı sağlayabileceği düşünülmektedir. Popülasyonu daha çok yansıtan daha geniş kapsamlı araştırmalara ek olarak, ailesel çalışmaların ve haplotip analizlerinin yapılmasının da, hastalığa ait koruma ve risk faktörlerini belirleme açısından etkili olabileceği düşünülmektedir.

Periodontitis hastalığının yıkım aşamalarının gerçekleşmesinde TNF-R2 gibi bazı sitokinlerle birlikte birçok proteinaz da rol oynamaktadır. Çeşitli faktörlerle tetiklenen immün mekanizmalar konak hücrelerini korurken, hastalığın çeşitli aşamalarında yıkıcı etkilerini artırarak konak dokularına zarar verebilmektedir. Periodontitiste bu doku yıkımında etkili proteinazlardan biri MMP-9'dur. MMP-9, periodontitiste doku yıkımının başlaması ve artmasında oldukça önemli etkilere sahiptir. Bu nedenle periodontitis ile bu proteinaza ait gen polimorfizmi arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Rai ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, MMP-9'un erken periodontitis tanısı ve tedavisi için belirteç olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır [166]. Zhang ve arkadaşları, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmde, T alleli taşımanın makrofaj aktivitesini arttırdığını ve periodontitiste doku yıkımında etkili olduğunu

belirtmişlerdir [167]. Coratti ve arkadaşları, MMP-9'nun periodontitiste ECM yıkımında kritik etkisi olduğunu ve özellikle doku yıkımını başlatmada bu genin ekspresyonunun artmasının oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır [169]. Isaza-Guzman ve arkadaşları MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizm ve periodontitis arasındaki ilişkiyi Kolombiya popülasyonunda araştırmış ve bu popülasyonda polimorfizm ile periodontitis arasında ilişki bulamamışlardır ( $p=0,0663$ ) [170]. Loo ve arkadaşları ise, MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ve kronik periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırmış ve anlamlı sonuç bulmuşlardır [171]. Li ve arkadaşları, Çin popülasyonunda aynı gen polimorfizmini çalışmışlar ve Çin popülasyonu için T alleli taşımanın periodontitise yatkınlığı arttırdığını bildirmişlerdir [172]. Carneiro ve arkadaşlarının Brezilya popülasyonu ile yaptığı bir başka araştırmada ise, periodontal lezyonlarda MMP-9 gen ekspresyonun arttığını ve apikal periodontitis lezyonlarında ECM yıkımından MMP-9 geninin artan aktivitesinin sorumlu olabileceğini göstermişlerdir [173]. Keles ve arkadaşları Türk popülasyonunda MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ve kronik periodontitis arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada kronik periodontitis tipi olan generalize kronik periodontitisli hasta grubu ve kontrol grubu bulunmaktadır. Çalışma sonucunda generalize kronik periodontitis ve bu polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir [174]. Bundan farklı olarak, Wang ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda yaptığı başka bir araştırmada MMP-9 gen polimorfizmi ve GAP arasındaki korelasyon incelenmiştir. Yapılan çalışmada MMP-9 gen polimorfizmi ve GAP arasında ilişki bulunamamıştır [175]. Hallo ve arkadaşları Çek popülasyonunda, MMP-9 gen polimorfizmi ve kronik periodontitis hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve Çek popülasyonunun bu polimorfizm için risk taşımadığını ortaya koymuşlardır [177]. Pan ve arkadaşları periodontitis ve MMP-9 gen polimorfizmini 628 hasta ve 689 kontrol grubu kullanarak yapmışlardır. Yapılan çalışma doğrultusunda periodontitis ve MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [178]. Gürkan ve arkadaşları Türk popülasyonunda GAP ile MMP-9 (-1562 C/T) polimorfizmi ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmada T alleli taşıma oranı kontrol ve GAP'li hastalar arasında farklı oranlarda gözlenmiştir. T alleli taşıma oranının kontrol grubunda daha yüksek olduğu belirtilmiştir [176]. Gürkan ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı bir başka çalışmada MMP -9,-2,-12 gen polimorfizmleri



ile kronik periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır. MMP-9 promotor bölgesinde -1562. pozisyonda yer alan tek nükleotid polimorfizminde T alleli taşıma durumunun kronik periodontitis için daha az risk taşıdığı belirtilmiştir ve MMP-9 ile kronik periodontitis arasında sınırlı anlamlı bir fark elde edilmiştir ve bu nedenle bu gen polimorfizmi ile gelecekte yapılacak çalışmaların önemi vurgulanmıştır [165].

MMP-9 (-1562 C/T) gen polimorfizmine ait Türk popülasyonunu tanımlayan bir örnekleme yaptığımız çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular sonucunda, periodontitis ile bu gen polimorfizmi arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Özellikle CC ve CT genotip frekansları açısından kontrol, AP ve KP grupları arasında oldukça farklı oranlar gözlenmiştir. Yabancı genotip olan MMP-9 (-1562) CC genotipi, kontrol grubunda hasta gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu genotip kontrol grubunda %95 oranında gözlenirken, AP grubunda %64,8 ve KP grubunda ise %70,7 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle Türk popülasyonunda bu genotipin, periodontitis açısından bir koruma faktörü olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamıza ait dikkat çekici bir diğer sonuç, heterozigot CT genotipi özellikle AP ve KP gruplarında kontrol grubuna göre oldukça yüksek oranda gözlenmiştir. Bu genotip oranı kontrol grubunda %3,3 olarak belirlenmişken, AP grubunda %32,4 ve KP grubunda %26,3 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, CT genotipinde, kontrol-AP, kontrol-KP olmak üzere gerçekleştirilen karşılaştırma gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. MMP-9 heterozigot genotip varlığı, kontrol bireylerinde en az saptanırken hasta grubunda artış göstermiştir. Hastalık tiplerinin kendi içerisinde test edilmesi sonucu, hastalığın hızlı ilerleyen ve şiddetli ataçman kaybı görülen tipi olan agresif periodontitis grubunda heterozigot genotip varlığının, kronik periodontitis grubuna göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, Türk popülasyonunda, MMP-9 (-1562) heterozigot CT genotipinin, hastalığın insidansını ve şiddetini arttırdığı düşünülmektedir. Heterozigot genotip varlığında görülen hastalığa yatkınlık nedeni T alleli varlığı ile desteklenmiştir. T alleli frekansına ilişkin yapılan istatistiksel değerlendirmede, hem kontrol hem de hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklar bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalardan Rai ve

arkadaşlarının, Zhang ve arkadaşlarının, Loo ve arkadaşlarının, Carneiro ve arkadaşlarının, Keles ve arkadaşlarının, Pan ve arkadaşlarının, Gürkan ve arkadaşlarının elde ettikleri verilere benzer olarak; Isaza-Guzman ve arkadaşlarının, Hallo ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarından ise farklı olarak, çalışmamız hem heterozigot genotip varlığında hastalığın sıklığının artması hem de T alleli frekansları arasındaki anlamlı fark bulunması nedeniyle, genotipe T alleli taşımanın periodontitis açısından risk taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle Türk popülasyonunda bu heterozigot genotipinin, periodontitis ile ilişkili bir risk faktörü olarak göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmüştür. Hastalığa ilişkin elde edilen bu bulgu üzerinde, daha kapsamlı ve daha fazla bireyi içerecek çalışmaların planlanması halinde, ileride bu genotipin ya da allelin, hastalığa ait bir belirteç olarak kullanılma imkanı sağlayabileceği düşünülmektedir. Popülasyonu yansıtan daha geniş kapsamlı araştırmalara ek olarak, ailesel çalışmaların ve haplotip analizlerinin yapılmasının da, hastalığa ait koruma ve risk faktörlerini belirleme açısından etkili olabileceği yorumuna gidilmiştir.

Periodontitis, patojene, konakçıya, çevresel ve genetik faktörler gibi birçok faktörden etkilenen bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinde çeşitli gen polimorfizmlerinin etkisi olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmanın, bu kompleks hastalığın patogenezinin anlayıp, yüksek riskli bireylerin erken tanısını kolaylaştırmasına ve hastalığa ilişkin yeni tedavi yaklaşımlarının gelişmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu anlamda çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, bu iki gen bölgesinin Türk popülasyonu için gelecekte hastalığın tanısı için aday biyomarkır (belirteç) olabileceğini düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A., Clinical Periodontology, Tenth Edition, Saunders Company, **2007**.
- [2] Loesche, W.J., Grossman, N.S., Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment, Clinical Microbiology, 14(4), 727-752, **2001**.
- [3] Mariotti, A., Dental plaque-induced gingival diseases, Annals of periodontology, 4(1), 7-19, **1999**.
- [4] Kinane, D.F., Peterson, M., Stathopoulou, P.G., Environmental and Other Modifying Factors of The Periodontal Disease, Periodontol 2000, 40(1), 107-119, **2006**.
- [5] Mariotti, A., Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium, Oral Biology and Medicine, 5(1), 27-53, **1994**.
- [6] Hart, T.C., Kornman, K.S., Genetic Factors in the Pathogenesis of Periodontitis, Periodontology 2000, 14, 202-215, **1997**.
- [7] Williams, R.C., Periodontal disease, The New England Journal of Medicine, 322, 6, **1990**.
- [8] Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., Periodontal diseases, Lancet, 366, 1809-1820, **2005**.
- [9] Armitage, G.C., Development of classification system for periodontal disease and conditions, Annals of Periodontology, 4, 1-6, **1999**.
- [10] Wiebe, C.B., Putnins, E.E., The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology, Journal of the Canadian Dental Association, 66, 594-7, **2000**.
- [11] Albandar, J.M., Rams, T.E., Global epidemiology of periodontal diseases: an overview, Periodontology 2000, 29, 7-10, **2002**.
- [12] Socransky, S.S., Haffajee A.D., Microbiology of periodontal disease, In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, eds. Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 4th ed., Copenhagen: Blackwell Munksgaard, 106-139, **2003**.

- [13] Bascones-Martinez, A., Figuero-Ruiz, E., Periodontal diseases as bacterial infection, *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 9, 75-91, **2004**.
- [14] Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Smith, C., Dibart, S., Microbial risk indicators for attachment loss, *Journal of Periodontal Research* , 26, 293-296, **1991**.
- [15] Tatakis, D.N., Trombelli, L., Modulation of clinical expression of plaque induced gingivitis, *Journal of Clinical Periodontology*,31, 229- 238, **2004**.
- [16] Kinane, D.F., Causation and pathogenesis of periodontal disease, *Periodontology 2000*, 25, 8-20, **2001**.
- [17] Armitage, G.C., Development of a classification system for periodontal disease and conditions, *Annals of Periodontology*, 4, 5-10, **1999**.
- [18] Ford, P.J., Gamonal, J., Seymour, G.J., Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis, *Periodontology 2000*, 53, 111-123, **2010**.
- [19] Clerehugh, V., Periodontal diseased in children and adolescents, *British Dental Journal*, 204, 8, **2008**.
- [20] Flemming, T.F., Periodontitis, *Annals of Periodontology*,4(1), 32-38, **1999**.
- [21] Loesche, W.J, Grossman, N.S., Periodontal disease as a specific, *Clinical Microbiology*, 14(4), 727-752, **2001**.
- [22] Chen, L.L., Wu, Y.M., Yan, J., Sun, W.L., Sun, Y.Z., Ojcius D., Association between coinfection of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis, *Chinese Medical Journal*, 118, 915-921, **2005**.
- [23] Consensus Report for Periodontal diseases: Patogenesis and microbial Factors: *Annals of Periodontol*, 1, 926-932, **1996**.
- [24] Genco, R.J., Host responses in periodontal diseases: current concepts, *Journal of Periodontology*, 63, 338-355, **1962**.

- [25] Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases, A critical assesment, *Journal of Periodontal Research*, 26, 195-212, **1991**.
- [26] Hamlet, S., Ellwood, R., Cullinan, M., et al., Persistent colonisation with *Tannarella forsythensis* and loss of attachment in adolescents, *Journal of Dental Research*; 83: 232-235, **2004**.
- [27] Heitz-Mayfield, L.J.A., Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 196-209, **2005**.
- [28] Novak, M.J., Classification of diseases and conditions affecting the periodontium, *Carranza's Clinical Periodontology*, 64-74, **2002**.
- [29] Cobb, C.M., Williams, K.B., Gerkovitch, M.M., Is the prevalence of periodontitis in the USA in decline?, *Journal of Periodontology* 2000,50, 13-24, **2009**.
- [30] Williams, R.C., Periodontal disease, *The New England Journal of Medicine*, 322 ,6, **1990**.
- [31] Petit, M.D., Van Steenberg, T.J., Timmerman, M.F., De Graaf, J., Van Der Velden, U., Prevalence of Periodontitis and Suspected Periodontal Pathogens in Families of Adult Periodontitis Patients, *Journal of Clinical Periodontology*, 21, 76-85, **1994**.
- [32] Loe, H., Theilade, E., Jensen, S.B., Experimental ginigivitis in man, *Journal of Periodontology*, 36, 177-187, **1965**.
- [33] Graves, D.T., Oskoui, M., Volejnikova, S., Naguib, G., Cai, S., Desta, T., Kakouras, A., Jiang, Y., Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P.gingivalis* infection, *Journal of Dental Research*, 80 (10), 1875-1879, **2001**.
- [34] Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., Kent, R.J., Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 134-144, **1998**.
- [35] Larsen, P.M., Mediators of inflammation, *Annual Review of Immunology*, 1, 335-359, **1983**.

- [36] Takashiba, S., Naruishi, K., Gene Polymorphism in Periodontal Health and Disease, *Periodontology* 2000,40, 94-106, **2006**.
- [37] Kornman, K.S., di Giovine, F.S., Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis, *Annals of Periodontology*, 3, 108-120, **1998**.
- [38] Hart, T.C., Kornman, K.S., Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis, *Periodontology* 2000, 14, 202-215, **1997**.
- [39] Yoshie, H., Galicia, C.J., Kobayashi, T., Tai, H., Genetic polymorphisms and periodontitis, *International Congress Series* 1284, 131-139, **2005**.
- [40] Loos, B.G., John, R.P., Laine M.L., Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action, *Journal of Clinical Periodontology*; 32 (6), 159-179,**2005**.
- [41] Michalowicz, B.S., Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis, *Journal of Periodontology*, 71, 1699-1707,**2000**.
- [42] Van Dyke, T.E., Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis, *Periodontology* 2000, 45, 10-13, **2007**.
- [43] Wajant, H., Pfeffer, K., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Tumor necrosis factors in 1998, *Cytokine Growth Factor Review* 9, 297-302, **1998**.
- [44] Boyce, F.B., Li P., Yao, Z., et al., TNF-alpha and pathologic bone resorption,*The Keio Journal of Medicine*, 54, 127-131, **2005**.
- [45] Shimada, Y., Tai, H., Endo, M., Kobayashi, T., Akazawa, K., Yamazaki, K., Association of tumornecrosis factor receptor type 1 2 587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology*, 31, 463–469, **2005**.
- [46] Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., Matrix Metalloproteinases: a review, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4, 197-250, **1993**.
- [47] Ingman, T., Tervahartiala, T., Ding, Y., Tschesche, H., Haerian, A., Kinane, D.F., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients, *Journal of Clinical Periodontology*, 23, 1127-1132, **1996**.

- [48] Soder, B., Airila, M.S., Soder, P.O., Kari, K., Meurman, J., Levels of matrix metalloproteinases-8 and -9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood, *Journal of Periodontal Research*, 41, 411-417, **2006**.
- [49] Gurkan, A., Emingil, G., Saygan, B., Atilla, G., Cınarcık, S., Kose, T., Berdeli, A., Gene polymorphisms of matrix metalloproteinase-2, -9 and -12 in periodontal health and severe chronic Periodontitis, *Archives of Oral Biology*, 53, 337 – 345, **2007**.
- [50] Creadenta, *Perodontoloji-Dişeti Hastalıkları*, **2004**.
- [51] Lisgarten, M.A., Pathogenesis of periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology*, 13, 418-430, **1986**.
- [52] Offenbacher, S., Periodontal diseases: Pathogenesis, *Annals of Periodontology*, 1, 879-925, **1996**.
- [53] Borch, T.S., Holmstrup, P., Bendtzen, P.K., Nielsen, C.H., In vitro cytokine responses to periodontal pathogens: generalized aggressive periodontitis is associated with increased IL-6 response to *Porphyromonas gingivalis*, *Scandinavian Journal of Immunology*, 71, 440–446, **2010**.
- [54] Birkedal-Hansen, H., Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction, *Journal of Periodontal Research*, 28, 500-510, **1993**.
- [55] Krieg, A., Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA, *Springer Semin Immunopathol*, 22, 97-105, **2000**.
- [56] Dixon, D.R., Bainbridge, B.W., Darveau, R.P., Modulation of the innate immune response within the periodontium, *Periodontology* 2000, 35, 53-74, **2004**.
- [57] Perez, H.L., Sanchez, G.M., Becerra, J.F., Redox environment in inflammatory periodontal disease, **2004**.
- [58] Bascones-Martinez, A., Figuero-Ruiz, E., Periodontal diseases as bacterial infection, *Medicina Oral Patologia*, 9, 75-91, **2004**.

- [59] Baker, P., Dixon, M., Evans, R., Dufour, L., Johnson, E., Roopenian, D., CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma -interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone lose in mice, *Infect Immun*, 67, 2804-2809, **1999**.
- [60] Sandros, J., Karlsson, C., Lappin, D.F., Madianos, P.N., Kinane, D.F., Papapanou, P.N., Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection, *Journal of Dental Research*, 79(10), 1808-1814, **2000**.
- [61] Baumgartner, J., Watkins, B., Bae, K., Xia, T., Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections, *Journal of Endodontics*, 25, 413-415, **1999**.
- [62] Kinane, D.F., Hajishengallis, G., Polymicrobial infections, biofilms and beyond, *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 404-405, **2009**.
- [63] Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E.I., Houry-Haddad, Y., Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response, *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 406–410, **2009**.
- [64] Slots, J., Kamma, J., Sugar, C., The herpesvirus-Porphyromonas gingivalis-periodontitis axis, *Journal of Periodontal Research*, 38(3), 318-323, **2003**.
- [65] Janeway, R., Innate Immun recognition, *Annual Review of Immunology* 20, 197-216, **2002**.
- [66] Lamster, I.B., Wilson, T.G., Kornmann, K.S., Inflammatory response in periodontal disease, *Fundamentals of Periodontics*, 160-167, **1996**.
- [67] Springer, T.A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell*, 76, 301-314, **1994**.
- [68] Kantarcı, A., Oyaizu, K., Neutrophil mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis:findings from localized aggressive periodontitis, *Journal of Periodontology*, 74, 66-75, **2003**.
- [69] Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S., The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, *Periodontology 2000*, 14, 33-53, **1997**.



- [70] Topoll, H., Zwadlo, G., Lange, D., Sorg, G.J., Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis, *Journal of Periodontology Research*, 24, 106-112, **1989**.
- [71] Zappa, U., Reinking-Zappa, M., Graf, H., Espeland, M. Cell populations and episodic periodontal attachment loss in humans, *Journal of Clinical Periodontology*, 18, 508-515, **1991**.
- [72] Aoyagi, T., Sugawara-Aoyagi, M., Yamazaki, K., Hara, K., Interleukin-4 and IL-6 producing memory T cells in peripheral blood and gingival tissues in periodontitis patients with high serum antibody titers to *Porphyromonas gingivalis*, *Oral Microbiology and Immunology*, 10, 304-310, **1995**.
- [73] Gemmel, E., Seymour, G.J., Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease, *Periodontology* 2000, 35, 21-41, **2004**.
- [74] Rosenkoetter, M., Reder, A.T., Oger, J.J., Antel, J.P., T cell regulation of polyclonally induced immunoglobulin secretion in humans, *Journal of Immunology*, 132, 1779-1783, **1984**.
- [75] Schenkein, H.A., Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease, *Periodontology* 2000, 40, 77-93, **2006**.
- [76] Oppenheim, J.J., Ruscetti, F.W., Faltynek, C. Cytokines. D.P. Stites, A.J., *Basic and Clinical Immunology*, 105-123, **1994**.
- [77] Balkwill, F.R., Burke, F., The cytokine network, *Immunology Today*, 9, 299-304, **1989**.
- [78] Opal, S.M., DePalo, V.A., Anti-inflammatory Cytokines, *Chest Clinic*, 117, 1162-1172, **2000**.
- [79] Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis, *The Journal of Clinical Investigation*, 88, 1747-1754, **1991**.
- [80] Dinarello, C.A., Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist, *International Reviews of Immunology*, 16, 457-499, **1998**.

- [81] The pathogenesis of periodontal diseases, Academy reports in Journal of Periodontology, 70, 457-470, **1999**.
- [82] Bartold, P.M., Narayanan, A.S., Molecular and cell biology of periodontal tissues, Periodontology 2000, 40, 29–49, **2006**.
- [83] Seymour, G., Gemmell, E., Cytokines in periodontal disease:where to from here?, Acta Odontologica Scandinavica, 59, 167-173, **2001**.
- [84] Graves, D.T., Cochran, D., The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, Journal of Periodontol, 74, 391-401, **2003**.
- [85] Liew, F.Y., T (H)1 and T (H)2 cells: a historical perspective, Nature reviews Immunology, 2, 55-60, **2002**.
- [86] Shapira, L., Soskolne, W.A., Sela, M.N., Offenbacher, S., Barak, V., The secretion of PGE2, IL-1 beta, TNF-alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients, Journal of Periodontology, 65, 139-146, **1994**.
- [87] Zedler, S., Bone, R.C., Baue, A.E., T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns, Critical Care and Medicine, 27, 66-72, **1999**.
- [88] Shiau, H.J., Reynolds, M.A., Sex differences in destructive periodontal disease: a systemic review, Journal of Periodontol, 81(10), 1379-1389, **2010**.
- [89] Pilon, M., Williams-Miller, C., Cox, D.S., Interleukin-2 levels in gingival crevicular fluid in periodontitis, Journal of Dental Research, 70, 550, **1991**.
- [90] Sigusch, B., Klinger, G., Glockmann, E., Simon,H., Early onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes, Journal of Periodontology, 69, 1098-104, **1998**.
- [91] Yamazaki, K., Nakajima, T., Aoyagi, T., Hara, K., Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease, Journal of Periodontal Research, 28, 324-334, **1993**.

- [92] Yamazaki, K., Nakajima, T., Gemmell, E., Polak, B., Seymour, G.J., Hara, K., IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue, *Journal of Oral Pahtology & Medicine*, 23, 347-353, **1994**.
- [93] Aoyagi, T., Sugawara-Aoyagi, M., Yamazaki, K., Hara, K., Interleukin-4 and IL-6 producing memory T cells in peripheral blood and gingival tissues in periodontitispatients with high serum antibody titers to Porphyromonas gingivalis, *Oral Microbiology and Immunology*, 10, 304-310, **1995**.
- [94] Gemmell, E., Marshall, R.I., Seymour, G.J., Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease, *Periodontology 2000*, 14, 112-143, **1997**.
- [95] Landi, L., Amar, S., Polins, A.S., Van Dyke, T.E., Host mechanisms in the pathogenesis of periodontal disease, *Current Opinion in Periodontology*, 4, 3-10, **1997**.
- [96] Ebersole, J.L., Cappelli, D., Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases, *Periodontology 2000*, 23, 19-49, **2000**.
- [97] Czuprynski, C.J., Haak-Frendscho, M., Cytokines in bacterial and fungal infections, 591-608, **1997**.
- [98] Lindemann, R.A., Economou, J.S., Rothermel, H., Production of interleukin-1 and tumor nekrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lypopolysaccharides, *Journal of Dental Research*, 67, 1131-1135, **1998**.
- [99] Jardinski, J.J., Stashenko, P., Feder, L.S., Leung, C.C., Peros, W.J., Rynar, J.E., Localization ofinterleukin-1 beta in human periodontal tissue, *Journal of Periodontology*, 62, 36-43, **1991**.
- [100] Roberts, F.A., McCaffery, K.A., Michalek, S.M., Profile of cytokine mRNA expresion in chronic adult periodontitis, *Journal of Dental Research*, 76, 1833-1839, **1997**.
- [101] Honda, T., Domon, H., Okui, T., Kajita, K., Amanuma, R., Yamazaki, K., Balance of inflammatoryresponse in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions, *Clinical and Experimental Immunology*, 144, 35-40, **2006**.

- [102] Graves, D.T., Cochran, D., The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, *Journal of Periodontology*, 74, 391-401, **2003**.
- [103] König, A., Mühlbauer, R.C., Fleisch, H., Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [3H]tetracycline excretion from prelabeled mice, *Journal of Bone and Mineral Research*, 3(6), 621-7, **1998**.
- [104] Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S., Graves, D.T., IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis, *Journal of Immunology*, 160, 403-409, **1998**.
- [105] Pfizenmaier K., Wajant H., Grell M., Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7, 271-277, **1996**.
- [106] Vilcek, J., Lee, T.H., Minireview: tumor necrosis factor, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (12), 7317-7316, **1991**.
- [107] Mocellin, S., Rossi, C.D., Pilati, P., Nitti, D., Tumor necrosis factor cancer and anticancer therapy, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16, 35-53, **2005**.
- [108] Peschon, J.J., Torrance, D.S., Stocking, K.L., Glaccum, M.B., Otten, C., Willis, C.R., Charrier, K., Morrissey, P.J., Ware, C.B., Mohler, K.M., TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles of p55 and p75 in several models of inflammation, *The Journal of Immunology*, 160, 943-952, **1998**.
- [109] Van Dyke, T.E., Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis, *Periodontology 2000*, 45, 10-13, **2007**.
- [110] Wajant, H., Pfeffer, K., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., Tumor necrosis factors in 1998, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9, 297-302, **1998**.
- [111] Boyce, F.B., Li P., Yao, Z., et al., TNF-alpha and pathologic bone resorption, *The Keio Journal of Medicine*, 54, 127-131, **2005**.
- [112] Udagawa, N., Kotake, S., Kamatani, N., Takahashi, N., Suda, T., The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research*, 4, 281-289 doi:10.1186/ar431, **2002**.

- [113] Reynolds, J.J., Meikle, M.C., Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis, *Periodontology 2000*, 14, 144-157, **1997**.
- [114] Eley, B.M., Cox, S.W., Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid: a comparison of levels before and after periodontal surgery in chronic periodontitis patients, *Journal of Periodontology*, 63, 412-417, **1992**.
- [115] Papapanou, P.N., Periodontal diseases: Epidemiology, *Annals of Periodontology*, 1, 1-36, **1996**.
- [116] Baker, A.H., Edwards, D.R., Murphy, G., Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, *Journal of Cell Science*, 115, 3719-3727, **2002**.
- [117] Uitto, V.J., Overall, C.M., McCulloch, C., Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid, *Periodontology 2000*, 31, 77-104, **2003**.
- [118] Dahan, M., Nawrocki, B., Elkaim, R., Soell, M., Bolcato-Bellemin, A.L., Birembaut, P., Tenenbaum, H., Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva, *Journal of Clinical Periodontology*, 28, 128-136, **2001**.
- [119] Reynolds, J.J., Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation, *Journal of Periodontology*, 2, 70-76, **1996**.
- [120] Visse, R., Nagase, H., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure function and biochemistry, *Circulation Research*, 92, 827-839, **2003**.
- [121] Palosaari, H., Pennington, C.J., Larmas, M., Edwards, D.R., Tjäderhane, L., Salo, T., Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue, *European Journal of Oral Science*, 111, 117-127, **2003**.
- [122] Murphy, G., Knauper, V., Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?, *Matrix Biology*, 15, 511-518, **1997**.

- [123] Ryan M.E., Golub L.M. (2000). Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy, *Periodontology* 2000, 24: 226-238.
- [124] Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S., The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, *Periodontology* 2000, 14, 33-53, **1997**.
- [125] Iredale, J.P., Tissue Inhibitors of Metalloproteinase in Liver Fibrosis, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 43-53, **1997**.
- [126] Palosaari, H., Wahlgren, J., Larmas, M., Rönkä, H., Sorsa, T., Salo, T., Tjaderhane, L., The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1, *Journal of Dental Research*, 79, 77-84, **2000**.
- [127] Benbow, U., Brinckerhoff, C.E., The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?, *Matrix Biology*, 15, 519-526, **1997**.
- [128] Ryan, M.E., Golub, L.M., Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy, *Periodontology* 2000, 24, 226-238, **2000**.
- [129] Dollery, C.M., McEwan, J.R., Henney, A.M., Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease, *Circulation Research*, 77(5), 863-8, **1995**.
- [130] Opendakker, G., Van den Sten, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Coillie, E.V., Masure, S., Proost, P., Damme, J.V., Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology, *Journal of Leukocyte Biology*, 69, 851-859, **2001**.
- [131] Woessner, J.F., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, *The FASEB Journal*, 5(8), 2145-54, **1991**.
- [132] Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., Matrix Metalloproteinases, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2), 197-250, **1993**.

- [133] Lijnen, H.R., Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis, *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 163-7, **2002**.
- [134] Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme(TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity, *Biochemistry*, 41(30), 9462-9, **2002**.
- [135] Yu, Q., Stamenkovic, I., Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes & Development*, 14(2), 163-76, **2000**.
- [136] Sachidanandam, R., A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, 409, 928-933, **2001**.
- [137] Fujita, N.J., Fallin, D., Lanchbury, J.S., Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology, *Clinical Genetics*, 58, 250-264, **2000**.
- [138] Michalowicz, B.S., Aeppli, D., Virag, J.G., Periodontal findings in adult twins, *Journal of Periodontology*, 62, 293-299, **1991**.
- [139] Boughman, J.A., Astemborski, J.A., Suzuki, J.B., Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships, *Journal of Clinical Periodontology*, 19(4), 233-9, **1992**.
- [140] Corey, L.A., Nance, W.E., Hofstede, P., Schenkein, H.A., Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population, *Journal of Periodontology*, 64(12), 1205-8, **1993**.
- [141] Mucci, L.A., Bjorkman, L., Douglass, C.W., Pedersen, N.L., Environmental and heritable factors in the etiology of oral diseases – a population-based study of Swedish twins, *Journal of Dental Research*, 84, 800-805, **2005**.
- [142] Takashiba, S., Naruishi, K., Gene polymorphisms in periodontal health and disease, *Periodontology 2000*, 40, 94-106, **2006**.
- [143] Ho, Y.P., Lin, Y.C., Yang, Y.H., Ho, K.Y., Wu, Y.M., Tsai, C.C., Cyclooxygenase-2 Gene-765 single nucleotide polymorphism as a

protective factor against periodontitis in Taiwanese, *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (1), 1-8, **2008**.

- [144] Xie, C.J., Xiao, L.M., Fan, W.H., Xuan, D.Y., Zhang, J.C., Common single nucleotide polymorphisms in cyclooxygenase-2 and risk of severe chronic periodontitis in a Chinese population, *Journal of Clinical Periodontology*, 36(3), 198-203, **2009**.
- [145] Carvalho, F.M., Tinoco, E.M., Deeley, K., Duarte, P.M., Faveri, M., Marques, M.R., Mendonça, A.C., Wang, X., Cuenco, K., Menezes, R., Garlet, G.P., Vieira, A.R., FAM5C contributes to aggressive periodontitis, *PLoS One*. 7, 5(4), e10053, **2010**.
- [146] Hart, T., Kornman, K.S., Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis, *Periodontology 2000*, 14, 202-215, **1997**.
- [147] Loos, B.G., John, R.P., Laine M.L., Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action, *Journal of Clinical Periodontology*, 32 (6), 159-179, **2005**.
- [148] Amer, A., Singh, G., Darke, C., Dolby, A.E., Association Between HLA Antigens and Periodontal Disease, *Tissue Antigens*, 31, 53-58, **1998**.
- [149] Annells, M.F., Hart, P.H., Mullighan C.G., Heatley, S.L., Robinson, J.S., McDonald, H.M., Interleukins-1, -4, -6, -10, Tumor Necrosis Factor, Transforming Growth Factor- $\beta$ , FAS, and Mannose-Binding Protein C Gene Polymorphisms in Australian Women: Risk Of Preterm Birth, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 2056-67, **2005**.
- [150] Berglundh, T., Donati, M., Hahn-Zoric, M., Hanson, L.A., Padyukov, L., Association of the -1087 IL 10 Gene Polymorphism with Severe Chronic Periodontitis in Swedish Caucasians, *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 249-254, **2003**.
- [151] Caffesse, R.G., De La Rosa R.M., De La Rosa G.M., Weltman, R., Effect of Interleukin-1 Gene Polymorphism in a Periodontally Healthy Hispanic Population Treated with Mucogingival Surgery, *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 177-180, **2002**.
- [152] Cullinan, M.P., Sachs, J., Wolf, E., Seymour, G., The Distribution of HLA-A and -B Antigens in Patients and Their Families with Periodontosis, *Journal of Periodontal Research*, 15, 177-184, **1990**.



- [153] Schenkein, H.A., Finding Genetic Risk Factors for Periodontal Disease, *Periodontology* 2000, 30, 79-90, **2002**.
- [154] Barton, A., John, S., Ollier, W. E. R., Silman, A., Worthington, J., Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I in Caucasians, *Arthritis & Rheumatism* 44, 61–65, **2001**.
- [155] Bridges, S.L., Jenq, G., Moran, M., Kuffner, T., Whitworth, W. C., McNicholl, J., Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes, *Arthritis & Rheumatism*, 46, 2045–2050, **2002**.
- [156] Kobayashi, T., Nagata, S., Murakami, S., Takashiba, H., Kurihara, Y., Izumi, Y., Numabe, H., Watanabe, M., Kataoka, A., Nagai, J., Hayashi, H., Ohyama, Y., Okamoto, Y., Inagaki, H., Yoshie H., Genetic Risk Factors for Periodontitis in a Japanese Population, *Journal of Dental Research*, 88, 89-95, **2009**.
- [157] Kinane, D.F., Hodge, P., Eskdale, J., Ellis, R., Gallagher, G., Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis, *Journal of Periodontal Research*, 34, 379–386, **1999**.
- [158] Komata, T., Tsuchiya, N., Matsushita, M., Hagiwara, K. & Tokunaga, K., Association of tumor necrosis factor receptor2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus, *Tissue Antigens*, 53, 527–533, **1999**.
- [159] Morita, C., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Hatta, N., Kikuchi, Y., Arinobu, Y., Otsuka, T., Sawabe, T., Harashima, S., Nagasawa, K., Niho, Y., Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese, *Arthritis & Rheumatism*, 44, 2819–2827, **2001**.
- [160] Soga, Y., Nishimura, F., Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba, S., Murayama, Y., Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF- $\alpha$ ) -1031/ -863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese, *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 524-531, **2003**.
- [161] Ikezawa, I., Tai, H., Shimada, Y., Komatsu, Y., Galicia, J.C., Yoshie, H., Imbalance between soluble tumour necrosis factor receptors type 1 and

2 in chronic periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 1047–1054, **2005**.

- [162] Masoumeh,K., Hengameh K., Panah,M., Kadkhodazadeh, F. V., Association of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 2 Gene Polymorphism with Severe Chronic Periodontitis, *Implant Dentistry* (, 3(2):69–72, **2011**.
- [163] Kim, S., Kim O., Ho Yang, K., Research Poster Presentation: Gene Polymorphism of TNF and TNFR 2 in Korean Generalized Aggressive Periodontitis, *Journal of Periodontology*, 1, 121-123, **2009**.
- [164] Shimada, Y., Tai, H., Endo, M., Kobayashi, T., Kyamazaki, K., Yoshie, H., Analysis of TNF receptors Polymorphisms in Japanese Patients with Aggressive Periodontitis, 2002 San Diego Convention Center Exhibit Hall, Periodontal Research, Diagnosis/Epidemiology Program, IADR/AADR/CADR 80th General Session, **2002**.
- [165] Gurkan, A., Emingil, G., Saygan, B.H., Atilla, G., Cınarcık, S.,Kose, T., Berdeli, A., Gene polymorphisms of matrix metalloproteinase-2,-9 and -12 in periodontal health and severe chronic periodontitis, *Archives of oral biology*, 53,337–345, **2008**.
- [166] Rai, B., Khrab, S., Jain K., Anad, S., Biomarkers in periodontitis oral fluids, *Journal of oral science*, 50(1), 53-56, **2008**.
- [167] Zhang, B., Henney, A., Eriksson, P., Hamsten, A., Watkins, H., Ye,S., Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1, *Journal of Human Genetics*, 105, 418-423, **1999**.
- [168] Vokurka, J., Klapus, L., Pantuckova, P., Kukletova,Lubomi´r Kukla, M., Holla, L., The association of MMP-9 and IL-18 gene promoter polymorphisms with gingivitis in adolescents, *archives of oral biology*, 54, 172–178, **2009**.
- [169] Mauro, V., Corottia, S., Willian, F., ZambuzziKatiu, B.S., PintoVanessa, S., LaraJose, M., Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development, *Archives of Oral Biology*, 54, 764–771, **2009**.
- [170] Diana, M., Isaza-Guzman, G., Arias-Osorio C., Martı´nez-Pabon, C., Sergio, I., Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and

tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1:A pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9 -1562C/T gene promoter polymorphism, Archives of Oral Biology 56, 401–411, **2011**.

- [171] Wings, T.Y., Loo, M.W., Jin, L.J., Mary, N.B., Cheung, G.R., Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis, Archives of oral biology 56 , 1081-1090, **2011**.
- [172] Li, G., Yue, Y., Tian, Y., Li, J., Wang, M., Liang, H., Liao, P., Wings, T.Y., Mary, N.B., Louis, W.C., Cytokine, 60, 552–560, **2012**.
- [173] Carneiro, E., Menezes, R., Garlet, G., Brandão, R., Bramante, C., Figueira, R., Sogayar, M., Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions, Endodontology, 107(1), **2009**.
- [174] Keles, G.C., Gunes, S., A., Sumer, P., Sumer, M., Kara, N., Bagci, H., Koprulu, H., Association of Matrix Metalloproteinase-9 Promoter Gene Polymorphism With Chronic Periodontitis, Journal of Periodontology, 77(9), 1510-1514, **2006**.
- [175] Chen, D., Wang, Q., Ma, Z.W., Chen, F.M., Chen, Y., Xie, G.Y., Wang, Q.T., Wu, Z.F., MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 gene polymorphisms in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis, Journal of Clinical Periodontology, 34, 384–389, **2007**.
- [176] Gurkan, A., Emingil, G., Saygan, B., Atilla, G., Cınarcık, G., Kose, T., Berdeli, A., Matrix Metalloproteinase-2, -9, and -12, Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis, Journal of Periodontology, 78, 12, **2007**.
- [177] Holla, L., Fassmann, A., Vanek, J., Vasku, A., Functional Polymorphisms in the Matrix Metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis, Journal of Periodontology, 77, 11, **2006**.
- [178] Pan, Y., Li, D., Cai, Q., Zhang, W., Ma, J., Wang, M., Wang, L., MMP-9 -1562C/T contributes to periodontitis susceptibility, Journal of Clinical Periodontology, 10, 1191-1205, **2012**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: GÜLCAN KUYUCUKLU

Doğum Yeri: TEKİRDAĞ

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: gulcankuyucuklu@hacettepe.edu.tr

Adresi: H.Ü. Beytepe Kampüsü Öğrenci Evleri N Blok No:230 ANKARA

## Eğitim

Lise: Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Advanced (ileri)

## İş Deneyimi (-)

## Deneyim Alanları

Moleküler genetik, genetik polimorfizm, hastalık mekanizmaları

## Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.(Proje no: 06 01 201 004) Proje Bütçesi:95.500 TL'dir.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

## Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Gülcan Kuyucuklu, Güliz Nigar Güncü, Esra Baltacıoğlu, Erhan Dursun, Erkan Şüküroğlu, Sibel Sümer, Ferda Alev Akalın, Gene Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase-9 in Chronic and Aggressive Periodontitis in Turkish Population, FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES

CONGRESS Mechanisms in Biology, 6-11 Temmuz, St. Petersburg, RUSYA,  
**2013.**

## EKLER

### Ek-1

### Muayene Formu

**MUAYENE FORMU**

**I.**

Adı Soyadı: Semra Topuz Diş Hek.Fak.Dosya No:

Doğum Tarihi: 1975 Cinsiyet: K

Adres: ^

Telefon: 305 15 76

**Tıbbi Özgeçmiş:**

Sistemik Hastalıklar: —

Kullandığı İlaçlar: —

**Soy Geçmişi :** (Ailede periodontitis açısından) Coğrafi Bölge - Ankara

Periodontitis 1.Dereceden Akrabalarda  2.Dereceden Akrabalarda

**Alişkanlıklar:**

Sigara: Günde.....paket sigara / günde .....yıl 1992-2003'e kadar  
günde 10 adet.

Alkol: nadiren

**Dental Özgeçmiş:**

1. Dental muayene sıklığı 10 ayda bir / şikayeti olduğunca

2. Son dental tedavinin şekli deherteg + 20 yaş gelimi

3. Geniş kapsamlı dental tedavi hikayesi:

Çekimler: 4/6 Zamanı: 2005 Sebebi: perödontitis  
2006

4. Geçirmiş olduğu periodontal hastalıklar ve tedavileri: deherteg + kineteg

5. Oral hijyen:

a) Diş fırçalama metodu Defru

b) Diş fırçalama sıklığı günde 2

c) Fırçanın tipi

d) Macun kullanımı

e) Diş ipi ara yüz fırçası ve benzeri hijyenik uygulamalar

1

Ek-1 devam ediyor.

KLİNİK TEŞHİS:

CEP DERİNLİĞİ:  $435/6/26 = 2,98$

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
533	325	312	112	213	515	217	417	515	312	312	213	324	515		
333	215	211	111	312	325	533	554	535	223	113	322	523	785		
		114	313	312	311	715	723	422	213	511	111	111		445	
		311	111	313	223	413	313	223	323	212	213	224		353	

ATAÇMAN KAYBI:  $498 = 3,32$

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
		010		010	010								111		
							110	111	111				111		
		100			020	012	110	110	010	010	010	011		110	
		210	110			013	222	222	210			011		114	

GINGİVAL İNDEKSİ:  $12 \times 14 / 26 = 1,22$

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
3/4	5/4	2/4	1/4	2/4	3/4	3/4	6/4	6/4	5/4	4/4	5/4	3/4	6/4	0/4	
	6/4	4/4	4/4	5/4	3/4	7/4	5/4	5/4	5/4	3/4	4/4			7/4	

KANAMA İNDEKSİ: 20

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
+	+					+	+	+	+	+			+	+	
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		+	

PLAK İNDEKSİ:  $40/4 = 0,1384$

8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
3/4	2/4	1/4	1/4	2/4	2/4	3/4	2/4	0	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4	
	4/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	0	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4		3/4	

Radyografik Kemik kaybı Derecesi (Yüzde Bölge):

1	2	3	4	5	6	7	8								
3/4	2/4	1/4	1/4	2/4	2/4	3/4	2/4	0	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4		
	3/4	2/4	2/4	1/4	1/4	1/4	0	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4			

## Ek-1 devam ediyor.

### H.Ü.DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU:

#### Doktorun Beyanı

Kronik periodontitis, ağızda diş kaybına yol açan bir dişeti hastalığıdır. Hastalığın tanısı, başlangıcı ve seyrinde etkili birçok faktör mevcuttur. Periodontal hastalıkta genetik faktörlerin önemini açığa çıkarmaya yönelik yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi "Kronik Periodontitisli Hastalarda MMP-1, -3, -9, TNF- $\alpha$ , Lenfotoksin- $\alpha$  ve TNFR2 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi" dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, çok sayıda dişinizi kaybetmenize yol açabilecek dişeti rahatsızlığınızın olmasıdır. Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Dişhekimliği fakültesi Periodontoloji Anabilim dalı ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın ortak katılımı ile genetik faktörlerle periodontal hastalığa yatkınlık ve şiddeti arasında bir ilişki olup olmadığını ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir. Bu araştırma, hastalar üzerinde yürütülecek olan klinik çalışmalar ve Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülecek olan laboratuvar çalışmalarından oluşacaktır.

Bu çalışmada yapılacak klinik uygulamalar; medikal ve dental hikayenin alınması, periodontal ve dental yapının incelenmesi (klinik ölçümler), kan alınması, DNA izolasyonu ve gen polimorfizmlerinin incelenmesi ile istatistiksel analizden oluşacaktır. toplumdaki değişen gen dağılımının bizim toplumumuzda incelenmesi, toplumumuzdaki durumu ortaya çıkartacaktır ve gelecekte hayata geçecek olan gen tedavi yöntemleri için yararlı bilgiler oluşturabilecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dt.Güliz N. Güncü tarafından Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda, Yrd.Doç.Dr. Esra Baltacıoğlu tarafından da Karadeniz Teknik Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda klinik muayene ve uygulamalar yapılacaktır. Bu uygulamalarda ilk olarak detaylı bir anamnez formu ile medikal ve dental hikaye alınacak daha sonra periodontal ve dental yapının incelenmesi amacıyla klinik ölçümler yapılacaktır. Bu aşamadan sonra hemşireler tarafından kolunuzdan 10 ml (1 tüp) kadar kan alınacaktır. Bu kandan genetik materyal, DNA elde edilecektir. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DNA izolasyonu ve gen polimorfizm çalışmaları yapılacaktır.

Periodontal problemlerinizi dişeti iltihabıyla sınırlı olup, ileri periodontal cerrahi gerektirmiyorsa o zaman klinik ölçümler alındıktan sonra hastalığın tedavisi için diştaşı temizliği ve diş fırçalama yöntemleri gösterilecektir. İleri periodontal problemlerinizi varolduğunda, bu durumun tedavisi için ileri periodontal cerrahi tedavi yöntemleri uygulanacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaç dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.



## Ek-1 devam ediyor.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

**Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:** 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

**Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:** Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız.

**Klinik ölçümler sırasında oluşabilecek riskler:** Herhangi bir risk taşımamaktadır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir çalışmada yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmenizi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine iletilecektir.

**Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar:** Şu anda bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Toplumdan topluma değişen gen dağılımının bizim toplumumuzda incelenmesi, toplumumuzdaki durumu ortaya çıkartacak, ileride hastalığın erken tanısında kullanılabilir, genetik işaretler saptanabilecek ve gelecekte hayata geçecek olan gen tedavi yöntemleri için yararlı bilgiler oluşturabilecektir. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Uygulama sırasında oluşacak herhangi bir rahatsızlığınız tarafımızdan giderilmeye çalışılacaktır. Araştırma sırasında oluşabilecek hasar durumunda gereken tıbbi tedavi ve işlemler uygulanacaktır. Herhangi bir sorunuz olduğunda H.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.B.D'nda öğretim üyesi Doç.Dr.Alev Akalın veya araştırma görevlisi Dt.Güliz N. Güncü'ye 0/312/3052217-37 nolu telefondan, veya 0/312/3104440 nolu fakstan ve de Yrd.Doç.Dr. Esra Baltacıoğlu'na 0/462/3253017 nolu telefondan, veya 0/462/3775710 nolu fakstan ulaşabilirsiniz.

Araştırmamız 30 aylık süre içerisinde gerçekleştirilecektir. Çalışmaya mevcut periodontal problemlerinizin tamamı tedavi edilene dek katılacak, tedavi bitiminde takip periyoduna alınacaksınız. Araştırmanın sonucunda sağlıklı periodontal dokulara kavuşacak, bu durumun korunabilmesi için düzenli takibe alınacaksınız. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin tıbbi katkısı olacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavi, klinik ölçümler, ve laboratuvar incelemeleri yapılmaksızın aynen uygulanacaktır.

Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Çalışmamıza 250 denek, 200 kontrol grubundan oluşan toplam 450 birey katılacaktır. Çocuk yaş grubundan olan hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.

## Ek-1 devam ediyor.

### Hastanın Beyanı

Sayın Dr. Alev Akalın ve Dt. Güliz N. Güncü tarafından Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimalla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, hangi araştırmacıyı, hangi telefon ve adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

#### Katılımcı

Tarih

Adı,soyadı: Semra Toprak 16.07.07

Adres: HÜFTRYO

Tel: 3051576/180

İmza: 

#### Görüşme tanığı

Tarih

Adı,soyadı: Ceren Denizalp 16.07.07

Adres:

Tel: ---

İmza:

#### Katılımcı ile görüşen hekim

Tarih

Adı, soyadı, ünvanı: Erkan Selçukçu 16.07.07

Adres:

İmza: 

Ek-2

Etik Kurul izni



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/1159  
Konu :

17/11/2005

#### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Görüşme Tarihi : 27.10.2005  
Toplantı No : 2005/10  
Proje No : TBK 05/15 (Görüşme Tarihi: 27.10.2005)  
Karar No : TBK 05/15 -17

Üniversitemiz Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Alev Akalın'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, TBK 05/15 kayıt numaralı ve "*Kronik Periodontitisli Hastalarda MMP-1, -3, -9, TNF- $\alpha$ , Lenfotoksin- $\alpha$  ve TNFR2 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi*" konulu proje önerisi kurumumuzda değerlendirilmiş, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur (Başkan)
2. Prof.Dr. Sema Özer (Üye)
3. Prof.Dr. M. Emin Şenocak (Üye)
4. Prof.Dr. Meral Kanbak (Üye) KATILMADI
5. Prof.Dr. Türkan Eldem (Üye)
6. Prof.Dr. Gökhan Gedikoğlu (Üye)
7. Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye)
8. Prof.Dr. Ediz Demirpençe (Üye)
9. Doç.Dr. Alev Türker (Üye)
10. Doç.Dr. Ümit Yaşar (Üye)
11. Avukat Serpil Beşni (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: (0 312) 305 10 82 Faks: (0 312) 310 05 80 E-posta: hura@hacettepe.edu.tr