

"ADI SOYADI"

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



YÜKSEK LİSANS DOKTORA
TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2006

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

DOKTORA TEZİ

**AĞIZ DOKULARINI ETKİLEYEN İNFLAMATUVAR
HASTALIKLARDA ANTİOKSİDAN SİSTEMİN VE
SİTOKİN GEN POLİMORFİZMİNİN ROLÜ**

ŞULE CAN TROŞALA

**DANIŞMAN
PROF.DR.YEGANE GÜVEN**

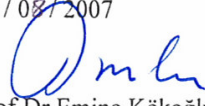
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

07 / 08 / 2007


Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Biyokimya
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Biyokimya
Tez Sahibi : Şule CAN TROŞALA
Tez Başlığı : Ağız Dokularını Etkileyen İnflamatuvar Hastalıklarda Antioksidan Sistemin ve Sitokin Gen Polimorfizminin Rolü
Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 27 / 06 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr. Müjdat UYSAL (Tez İzleme Komitesi Üyesi)



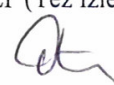
2.Prof.Dr. Yegane GÜVEN (Danışman)



3.Prof. Dr. Dilek YAYLALI (Tez İzleme Komitesi Üyesi)



4. Prof.Dr. Önder ŞİRİKÇİ



5.Prof.Dr. Ezel USLU



BEYAN

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

Şule Can Troşala

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ve tezimin tüm aşamalarında tecrübe ve bilgisinden yararlandığım, her türlü desteğini daima hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Yegane Güven'e, doktora eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, biyokimya laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Müjdat Uysal'a ve diğer değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin genetik kısmını oluşturan deney aşamalarında ise her türlü bilgi ve desteğini benimle paylaşan ve genetik laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan DETAE Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Uğur Özbek'e ve asistanı Ayşe Demirkan'a teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamalarının bir kısmında yine her türlü bilgi ve yardımını esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ezel Uslu'ya teşekkür ederim.

Tez olgularımın bir kısmının toplanmasında yardımcı olan İ.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Meral Ünür'e teşekkür ederim.

Laborantımız Özlem A. Türker'e de destek ve yardımları için teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, her zaman yanımda olan sevgili aileme, sabır ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-362/03112003

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. RAS'ın Tanımı ve Klinik Özellikleri.....	3
2.2. Epidemiyoloji	5
2.3. EtyopatogeneZ	6
2.3.1. Genetik Temel	6
2.3.2. İmmunopatogeneZ.....	7
2.3.3. RAS Oluşumunu Etkileyen Lokal Faktörler	7
2.3.4. RAS Oluşumunu Etkileyen Sistemik Faktörler.....	8
2.4. Sitokinler	9
2.4.1. IL-10.....	9
2.4.2. TNF- α	11
2.5. Tükürük.....	13
2.5.1. Tükürüğün Antioksidan Özellikleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Olgular	17
3.2. DNA İzolasyonu	18
3.2.1. DNA Miktar Tayini.....	18
3.3. Sitokin Gen polimorfizmlerinin Belirlenmesi.....	18
3.3.1. TNF α -308 G/A Tek Baz Polimorfizminin Belirlenmesi.....	18
3.3.2. IL-10 -1082 G/A Tek Baz Polimorfizminin Belirlenmesi	21

3.4. Biyokimyasal Analizler.....	24
3.4.1. Tükürük Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	24
3.4.2. Tükürükte Total Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	24
3.4.3. Tükürükte Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi.....	25
3.4.4. Tükürükte Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	27
3.4.5. Tükürükte Total Antioksidan Kapasitenin (TAK) Ölçülmesi.....	27
3.4.6. Tükürükte Malondialdehit (MDA) Ölçülmesi.....	28
3.4.7. Serum TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi.....	28
3.4.8. Serum IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
3.4. İstatistiksel Analizler.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Hastalar ile İlgili Genel Bilgiler.....	31
4.2. Kontrol ve Hasta Grubunda TNF- α /-308 ve IL-10/ -1082 Genotip Dağılımları.....	31
4.3. Serumda TNF- α ve IL-10 Düzeyleri ile Genotipler Arasındaki İlişkiler.....	31
4.4. Tükürükte Prooksidan-Antioksidan Denge ile İlgili Bulgular.....	32
4.5. Tükürük protein düzeyleri, akış hızı ve prooksidan-antioksidan denge arasında ilişkiler.....	32
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	48
ETİK KURUL KARARI	64
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.3.1: TNF α ve IL-10'un genotipleme yöntemleri ve amplikon uzunlukları.....	18
Tablo 3.3.1.1: TNF- α PZR ve enzim kesimi karışımı	19
Tablo 3.3.1.2: TNF- α PZR döngüsünün süre ve ısıları.....	20
Tablo 3.3.1.3: TNF- α geni PZR ürününün, NcoI enzimi ile kesim sonrasında elde edilen DNA parça büyüklükleri.....	20
Tablo 3.3.2.1 : IL-10 PZR ve enzim kesim karışımı.....	22
Tablo 3.3.2.2 : IL-10 PZR döngüsünün süre ve ısıları.....	22
Tablo 3.3.2.3: IL-10 gen polimorfizmini göstermek amacıyla yapılan allel spesifik PZR yönteminin ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenen allellerin şematik olarak gösterimi.....	23
Tablo 4.2.1: Kontrol ve hasta grubunda TNF- α ve IL-10 genotiplerinin dağılımı.....	34
Tablo 4.3.1: Kontrol ve hasta grubunun serumlarında TNF- α ve IL-10 düzeyleri.....	33
Tablo 4.3.2: Kontrol ve hasta grubunda genotip gruplamasına göre TNF- α düzeyleri.....	34
Tablo 4.3.3: Kontrol ve hasta grubunda genotip gruplamasına göre IL-10 düzeyleri.....	35
Tablo 4.3.4: Kontrol ve hasta grubu birlikte genotiplerine göre değerlendirildiğinde TNF- α ve IL-10 düzeyleri.....	35
Tablo 4.3.5: Ailesinde RAS hikayesi olan ve olmayan hastaların serum TNF- α düzeyleri.....	36
Tablo 4.4.1: Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde myeloperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit düzeyleri.....	37

Tablo 4.4.2:	Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde total peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri ile total antioksidan kapasite değerleri	38
Tablo 4.5.1:	Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde protein düzeyleri ve tükürük akış hızları.....	40
Tablo 4.5.2:	Kontrol ve hasta grubunda tükürük akış hızı ile myeloperoksidaz ve total antioksidan kapasite arasındaki korelasyonlar.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:	Minör aft	4
Şekil 2.2:	Majör aft	4
Şekil 2.3:	Herpetiform ülserler.....	5
Şekil 3.3.1.1:	TNF- α geni PCR ürününün, NcoI enzimi ile kesim sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	21
Şekil 3.2.2.1:	IL-10 geni PCR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	23
Şekil 4.3.1:	Kontrol ve hasta grubunda serum TNF- α ve IL-10 düzeyleleri.....	34
Şekil 4.3.2:	TNF- α genotip gruplandırmasına göre serum TNF- α düzeyleleri.....	36
Şekil 4.4.1:	Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde myeloperoksidaz aktiviteleri.....	37
Şekil 4.4.2:	Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde malondialdehit düzeyleleri.....	38
Şekil 4.4.3:	Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde total peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri.....	39
Şekil 4.4.4:	Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde total antioksidan kapasite değerleri.....	39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

RAS	Rekürrent aftöz stomatitis
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2.....	Interlökin-2
IL-10.....	Interlökin-10
MPO.....	Myeloperoksidaz
MDA.....	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK.....	Total antioksidan kapasite
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
PNL.....	Polimorf nükleer lökosit
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Troşala Can, Şule (2007). Ağız Dokularını Etkileyen İnflamatuvar Hastalıklarda Antioksidan Sistemin ve Sitokin Gen Polimorfizminin Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Rekürrent aftöz stomatitis (RAS), tekrarlayan oral ülserlerle karakterize olan bir hastalık olmakla beraber RAS hastaları diğer yönlerden sağlıklıdırlar. RAS'ın immunolojik, genetik ve mikrobiyal temeli olabileceği bazı literatürlerde bildirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF-alfa) -308 (G/A) ve Interlökin-10 (IL-10) -1082 (G/A) genetik polimorfizmleri ile RAS arasındaki muhtemel ilişkiyi araştırmak ve hastaların tükürüklerinde oksidan/antioksidan durumu belirlemektir.

Çalışmamızda 102 RAS hastası ve 108 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. 89 hasta ve 105 kontrolün TNF alfa -308 , 79 hasta ve 94 kontrolünde IL-10 -1082 genotiplemeleri yapılmıştır. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında TNF alfa ve IL-10 seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş, tükürük örneklerinde ise protein, myeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), total peroksidaz ve total antioksidan kapasite (TAK) tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Sağlıklı kontrol ve RAS hastalarının sitokin gen polimorfizmleri karşılaştırıldığında, hasta grupta TNF alfa AA/AG genotipi yüksek olduğu, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. IL-10 polimorfizmi için de istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Hasta grubunda kontrole göre tükürük MPO, SOD, total peroksidaz ve MDA değerleri yüksek bulunurken, TAK ise düşük bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışma enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin RAS hastalarında bozulduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Rekürrent Aftöz Stomatitis, Tümör nekroz faktör alfa, Interlökin-10, Myeloperoksidaz, Süperoksit dismutaz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-362/03112003

ABSTRACT

Troşala, Ş.C. (2007). The Role of Antioxidant System and Cytokine Gen Polymorphism on Oral Inflammatory Diseases. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biochemistry, PhD Thesis.

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is characterized by recurrent episodes of oral ulceration in an otherwise healthy individual. Some reports in the literature indicate that RAS may have immunological, genetic and microbiological bases.

The purpose of the study was to investigate a possible association between the Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) -308 (G/A) and Interleukin-10 (IL-10) -1082 (G/A) genetic polymorphisms in RAS and determine the oxidant/antioxidant status.

89 RAS patients and 105 healthy control were genotyped for TNF alpha and 79 RAS patients and 94 healthy control were genotyped for IL-10. TNF alpha and IL-10 levels were measured in serum with ELISA of RAS and controls. Salivary myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), total peroxidase, total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity, protein levels were measured. The cytokine genotyping results of patients were compared to those of healthy controls. It was found that TNF alpha -308 AA/AG polymorphism were higher in patient group than the healthy control but it is not statistically significant. No significant association was identified between TNF alpha -308 and IL-10 -1082 polymorphisms and RAS. Salivary MPO, SOD, total peroxidase activities and MDA levels were increased and TAC was decreased in patients with RAS in comparison with control subjects. In summary, this study demonstrated that enzymatic and nonenzymatic antioxidant defence systems are impaired in patients with RAS.

Key Words: : Recurrent aphthous stomatitis, Tumor necrosis factor alpha, Interleukin-10, Myeloperoxidase, Superoxide dismutase

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-362/03112003

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız içindeki mukoza tabakasının ağırlı inflamasyonu stomatitis olarak adlandırılmaktadır. Rekürrent aftöz stomatitis (RAS) ilk defa Hipokrat (İ.Ö.460-370) tarafından, oral mukozada lokalize olan ağırlı inflamasyon “aphthae” olarak tanımlanmıştır (142). Mukozal hastalıklar arasında en yaygın olarak görülmesine karşın sebebi tam olarak anlaşılamamıştır. Tüm dünyada RAS prevalansı %5-%66 olarak bulunmuştur (71,116). RAS lezyonları ilk olarak çocuklukta ya da adolesan dönemde ortaya çıkmakta ve yaş ile sıklığı ve şiddeti azalmaktadır. Kadınlarda RAS görülme sıklığı erkeklere göre biraz daha fazladır . Diş hekimliği ve tıp fakültesi öğrencileri gibi özel gruplarda yapılan çalışmalarda RAS prevalansı %50 olarak bulunmuştur (SLP: self-reported lifetime prevalence) (71). RAS’ın hastaların %80’inde 30 yaşından önce çıktığı ve daha geç yaşta RAS görülmesinin genellikle Behçet hastalığı gibi sistemik hastalıklarla ya da farklı hazırlayıcı faktörlerle ilgili olduğu bildirilmiştir (124). RAS’ın özellikle Kuzey Amerikada yaygın olduğu ve Amerika Birleşik Devletleri’nde beyaz ırktan olanlarda, siyah ırka göre üç kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (128,129). RAS’ın epidemiyolojisi, klinik tanımlaması, oluşma nedenleri ve semptomatik tedavisinde son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmış ve ilerleme kaydedilmiştir. Genetik, immunolojik, mikrobiyal, lokal ve sistemik faktörlerin RAS oluşumunda rol alabileceği ileri sürülmüşse de kesin bir sebep bulunamamıştır. Etiyolojisi bilinmediği için teşhisi tamamen hastanın geçmişine ve klinik değerlendirmeye göre yapılmakta ve teşhisi doğrulamak için herhangi bir laboratuvar testi bulunmamaktadır. Aftların tekrarını önleyici bir tedavi şekli bulunmamakla birlikte, lezyonların ciddiyetini ve tekrarını azaltan semptomatik tedavi uygulanmaktadır (71,142).

Oral ülserler, Crohn ve Çölyak gibi sistemik hastalıkların belirtisi olarak veya Behçet sendromunun bulgularından biri olarak da görülebilir. RAS hastalarında ise lezyonlar şiddetli ve sık aralıklarla ortaya çıkar ve sadece oral mukozada lokalize kalır. Genellikle hastalarda bu şekilde belirti verebilecek sistemik bir hastalık bulunmamaktadır (142). RAS’ın etiyopatogenezi tam olarak anlaşılamamıştır, fakat son yıllarda yapılan çalışmalar ile kesin bir sonuç bulunamasa da altta yatan sebebin immun sistem disfonksiyonu olduğu düşünülmektedir. RAS’lı hastaların kontrol ile karşılaştırıldığında, lezyon olan ve olmayan mukozalarında tümör nekroz faktör- α

(TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) ve interlökin-2 (IL-2)'nin mRNA seviyeleri artmış, interlökin-10 (IL-10) mRNA seviyesi ise azalmış olarak bulunduğu bildirilmiştir . IL-10, iyileşme sürecinde genellikle epitelizasyonu stimüle eder. RAS hastalarında düşük seviyede bulunması epitelizasyonun gecikmesine ve ülserlerin süresinin uzamasına neden olabileceği bildirilmiştir (20). Bu hastaların oral mukozasında anahtar proinflamatuvar stokin (TNF- α) ve antiinflamatuvar sitokin (IL-10) dengesindeki değişim RAS'ın patojenezinde önemli olabilir.

Bu nedenle çalışmamızda RAS oluşumu ile TNF- α ve IL-10 genetik polimorfizmi arasındaki mümkün olabilecek ilişkiyi belirlemek için hastaların bu sitokinler açısından genotiplemesinin yapılmasını ve bu sitokinlerin serum düzeylerinin değişip değişmediğini araştırmak istedik. Ayrıca tükürükte inflammatuvar yanıtta açığa çıkan ve doku hasarına da neden olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve doku hasarının göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyelerini saptamak istedik. Bunun yanında tükürüğün antioksidan savunma sisteminin parçası olan total peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), total antioksidan kapasite (TAK) tayinlerini yaparak inflamasyon ve doku hasarı göstergeleri ile korelasyon gösterip göstermediğini belirlemek istedik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RAS'ın Tanımı ve Klinik Özellikleri

RAS, ağız mukozasının ağrılı ve tekrarlayan bir veya daha fazla ülserler ile karakterize olan etiyojisi bilinmeyen inflamatuvar durumdur (106).

Ülserler 24 ile 48 saat sürebilen lokalize yanma ya da ağrı ile başlar. Lezyonlar, kırmızı halka ile çevrili, ortasında yüzeysel nekrotik bir merkez bulunan yuvarlak veya ovoid, ağrılı vesiküllerdir. Bu oluşumların patlaması ile gri beyaz renkli psödomembran oluşur. Sınırları belirgin ve kabarıktır. Kalın fibrinöz bir tabaka veya epitelizasyon oluşuncaya kadar ağrı üç ila dört gün devam edebilir. Lezyonlar, hastaların konuşma, çiğneme ve yutkunma fonksiyonlarını engelleyecek kadar ağrıya neden olabilir. Ülserlerin çoğu tedavi gerektirmeden kendiliğinden iyileşir. Remisyon döneminin ardından ise tekrar oluşurlar. Bazı hastalarda yılda 2 yada 4 defa gibi fazla olmayan sıklıkta çıkarken, diğerlerinde neredeyse devamlıdır ve eski lezyonlar iyileşirken yenileri gelişebilir (79,124).

RAS oral mukozanın keratinize olmayan veya daha az keratinize olmuş yüzeylerini etkiler. Bu yüzeyler; dudak ve yanak mukozası, maksillar ve mandibular kanallar, bağlı olmayan gingiva, yumuşak damak, ağız tabanı, dilin ön yüzeyi ve bademcikleri de içine alan üstte yumuşak damak altta dil ile sınırlı bölgede görülür. RAS lezyonları üç grup olarak sınıflandırılmıştır; Minör aftöz stomatitis, majör aftöz stomatitis ve herpetiform ülserler (116,124).

1- Minör RAS : RAS hastalarının %75-85'inde ve genellikle dudak, yanak mukozası, dilin ventral veya lateral yüzeyi ile ağız tabanında görülür. Bir yada daha fazla, küçük (<10 mm), oval yada yuvarlak, ağrılı, yüzeysel ülserlerdir. Lezyonların tekrarı birkaç yılda bir veya günler içinde olabilir ve skar bırakmadan 10 ile 14 günde iyileşir (124).



Şekil 2.1. Minör aft (71)

2-Majör RAS : RAS hastalarının %10-15'ini etkileyen en ciddi biçimidir ve genellikle dudak, yumuşak damak ile boğazda görülür. Majör RAS, periadenitis mukoza nekrotika rekürrens ya da Sutton hastalığı olarak da bilinir (102). Genellikle puberteden sonra ortaya çıkar. Lezyonlar görünüş olarak Minör RAS'a benzerdir fakat daha büyük (>10 mm), oval, derin ve çok ağrılı olur. Majör RAS lezyonları 10 ile 30 gün içinde skar bırakarak iyileşir (124).



Şekil 2.2. Majör aft (71)

3- Herpetiform ülserler : RAS hastalarının %5-10'unda görülür. Ülserlerin görünümü primer Herpes simpleks virüs (HSV) infeksiyonunun ağız içi lezyonlarına benzediği için bu şekilde isimlendirilmiştir fakat lezyonlardan HSV izole edilememiştir. Lezyon sayısı 10 ile 100 arasında değişir ve tüm ağız boşluğundaki yumuşak dokuya dağılmış şekilde olabilir. Ülserler küçük (2-3 mm), çok sayıda , yüzeysel ve ağrılı olurlar. Birleşme eğiliminde olup geniş ve düzensiz ülserleri oluştururlar. Skar

bırakmadan 7 ile 10 gün içinde iyileşirler. Kadınlarda daha sık görülür ve diğer tiplerden daha geç yaşta ortaya çıkar, ilk atak genellikle 2. veya 3. dekattadır (124).



**Şekil 2.3. Herpetiform
ülserler (71)**

2.2. Epidemiyoloji

Genel popülasyonun %20'sinin hayatlarının bir döneminde RAS hastası olduğu tahmin edilmektedir (53). Grup çalışmalarına göre RAS prevalansı %5-60 arasında değişmektedir. ABD'de kız hemşirelik öğrencilerinde %60 ve erkek diş hekimliği öğrencilerinde %56 ile en yüksek, % 5 ile de erkek yatan hastalarda ise en düşük insidans elde edilmiştir. Danimarkalı diş hekimliği öğrencilerinin %56'sının RAS ile uyumlu hikayeleri olduğu bildirilmiştir (37). Tayland'da bir grup diş hekimliği hastasının %46.7'sinde RAS olduğu bildirilmiştir (37,71,106)

Yetişkinlerde yapılan genel popülasyon çalışmalarında, RAS İsveçlilerde %2, İspanyollarda %1.9 ve Malezyalılarda %0.5 (APP: Acute point prevalence) olarak bulunmuştur. Kişilerin iki yıllık geçmişe dönük sorgulamalarında ise İsveçlilerin %17.7'sinde muhtemel RAS hikayesi olduğu belirlenmiştir. Kuveytli Bedevilerde RAS %5 ve Malezyalı yerlilerde ise %0.1 ile oldukça düşük bulunmuştur. Bununla birlikte RAS özellikle Kuzey Amerika'da çok yaygın olarak görülmektedir (3,71,142).

Hem yetişkin kadınlarda hem de kız çocuklarda RAS görülmesi daha fazla olabilir. Genç yaş gruplarında yüksek prevalans görülürken bu durum ilerleyen yaş ile birlikte azalmaktadır (3,27). ABD'de beyaz ırktan olanlarda siyah ırka göre RAS üç kat daha fazla görülmektedir (128).

Yüksek sosyoekonomik konumdaki çocuklarda, düşük konumdakilere göre iki kat fazla RAS görülmektedir (116,129). İlk ülser oluşumu genellikle ikinci dekatta ortaya çıksa da ailesinde RAS öyküsü olan çocukların %40'ında 5 yaşından önce ülserler görülmeye başladığı ve yaş ilerledikçe sıklığının arttığı bildirilmiştir (116).

Düzcede yaşları 13-16 arasında değişen 993 öğrenci üzerinde yapılan bir çalışmada RAS prevalansı %3.6 olarak bulunmuştur (113). İstanbul'un Kartal ilçesinde seçilen bölgelerde yaş aralığı 5-95 arasında değişen 765 kişide yapılan oral muayenede ise RAS prevalansı %1,2 olarak belirlenmiştir (102).

2.3. Etyopatogenezi

RAS'ın etiyojisi ve patogenezi kesin olarak bilinmese de oral mukozaya karşı bir immün reaksiyon ile ilişkili güçlü bir kalıtsal faktörün varlığı düşünülmektedir.

2.3.1. Genetik Temel

RAS'ı olan hastaların en az %40'ının ailesinde de bu hastalığın görüldüğü ve ailesinde RAS hikayesi olanlarda oral ülserlerin, olmayanlara göre çok erken yaşlarda ve daha ciddi belirtilerle kendini gösterdiği bildirilmiştir. Hem anne hem de babasında RAS olan çocuklarda %67-90 arasında RAS görüldüğü bildirilmiştir (20,71,106,124).

Bazı araştırmacılar RAS ile belirli insan lökosit antijenleri (Human Leucocyte Antigen:HLA) arasında değişik ilişkilerin olduğunu ileri sürerken, bir kısmı da herhangi bir ilişki saptayamamıştır. Bu durum çalışmaların farklı etnik gruplarla yapılması ve hasta sayısının az olması ile açıklanabilir. HLA B12, B51, Cw7'nin İsrailli, DR2 ve DR4'ün Türk, DR5 ve A28'in Yunan, DR7 ve MT3'ün Sicilyalı ve DRw9'un Çinli RAS hastalarında sıklığı fazla bulunmuştur. Bununla birlikte Sicilyalı hastalarda HLA B5 ve Yunan hastalarda HLA DR4 ile RAS arasında negatif ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (50,68,111,117,127)

Diğer HLA antijenlerine göre RAS ile HLA-B51 arasındaki bağlantının en anlamlı olduğu ileri sürülmüştür . Bununla birlikte HLA-B51 geninin RAS'dan sorumlu birincil lokus olmayabileceği buna yakın olan ve TNF- α ile ısı-şok proteinlerini (heat shock protein: hsp) kontrol eden diğer genlerinde buna dahil olabileceği ileri sürülmüştür (71,85,99).

2.3.2. İmmunopatojenez

RAS'ın immunopatogenezi başlıca T hücre aracılı immun yanıtın oluşturduğu ileri sürülmüştür. Preülseratif fazda yoğun lenfosit ve monosit infiltrasyonu olduğu ve bu durumun epitel hücre hasarı ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Lezyonların erken safhasında yer alan hücrelerin çoğu CD4+ T hücreleri iken ülseratif fazda bunların yerini CD8+ T hücrelerinin aldığı bildirilmiştir (20,61,64,88,122).

Hastaların periferik kanlarında CD8+ T lenfositlerinde artış ve/veya CD4+ T lenfositlerinde ise azalma olduğu bildirilmiştir (5,49,87,130). Aktif dönemdeki RAS hastalarının periferik kanlarında gamma delta ($\gamma\delta$) T hücreleri oranının, sağlıklı kontrole ve hastalık belirtisi olmayan RAS hastalarına göre arttığı veya değişmediği bildirilmiştir (49,114). $\gamma\delta$ T hücreleri IFN- γ ve TNF- α gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinleri üretirler. Sağlıklı oral mukozada $\gamma\delta$ T hücrelerinin bulunması pek yaygın değildir. Bununla birlikte RAS'lı hastaların oral lezyonlarında $\gamma\delta$ T hücrelerinin bulunduğu bildirilmiştir (49,105). RAS'da $\gamma\delta$ T hücreleri, antikora bağlı hücre aracılı sitotoksitede rol oynayabilir fakat bu hücrelerin artışına sebep olan uyarının ne olduğu hala belirsizdir.

Hastalarda lezyonel dokuda IL-2, IFN- γ ve TNF- α 'ya ait mRNA seviyeleri yüksek bulunurken IL-10 mRNA seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte aynı hastaların normal mukozasında da sağlıklı kontrol ile kıyaslandığı zaman IL-10 mRNA seviyesinin düşük olduğu bulunmuştur (20,104).

İn vitro çalışmalar ile RAS hastalarına ait periferik kan lökositlerinin oral mukozadaki epitel hücrelerde sitotoksik yıkımı arttırdığını bildirilmiştir (36,139). Bu durumda RAS, oral mukozaya karşı olan hücre aracılı sitotoksikite tipi bir reaksiyonun göstergesi olabilir. Buradan çıkan sonuca göre hastalığın immunopatogenezinde oral epitelyuma karşı lenfosit ve monositlerin sitotoksik reaksiyonları ülserasyon ile sonuçlanmakta fakat bu reaksiyonu başlatıcı etken hala bilinmemektedir.

2.3.3. RAS Oluşumunu Etkileyen Lokal Faktörler

RAS hastalarının bir kısmında lokal ve fiziksel travma ülserleri başlatıcı etken olabilir. Anestezik enjeksiyonlar, sert gıdalar, diş fırçalama ve diş tedavileri gibi lokal travmaların bu hastalarda neden ülser oluşumunu tetiklediği hala bilinmemektedir. RAS hastalarının lokal travmaya karşı aktif inflamatuvar medyatörleri kontrolsüz veya aşırı

salgılayabileceği ileri sürülmüştür (12). RAS hastalarının oral mukozasında oluşturulan travmayı takiben 24 saat içinde klinik olarak aft geliştiği, kontrollerde ise mukozal travma bölgesinin hızla iyileştiği gözlenmiştir(20,162).

Çoğu araştırma sigara kullanımı ile RAS arasında negatif ilişki olduğunu göstermiştir. Aşırı sigara kullananlarda, daha az kullananlara göre RAS prevalansı ve şiddetinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Son olarak Türk RAS hastalarında yapılan çalışmada, bu sonuçları desteklemektedir. Bununla birlikte RAS hastalarının çoğu sigara kullanmayan kişilerdir ve bu çalışmada da RAS hastalarının sadece %8.8'i aktif olarak sigara kullanırken, kontrol grubunda bu oran %25'tir. Bazı hastalar ise sigara kullanımını bıraktıktan sonra lezyonların ortaya çıktığını bildirmişlerdir (146). RAS ve inflamatuvar barsak hastalığında nikotinin yararlı olabileceği bildirilmiştir. Bu durum nikotinin sinir fonksiyonu üzerine etkisi ve doğrudan antiinflamatuvar etki göstermesi sonucu olabilir (106). Nikotin içeren tabletler RAS sıklığını kontrol etmek için kullanılabilir (124).

Bazı araştırmacılar peynir, çikolata, kahve, yer fıstığı, badem, çilek, domates (özellikle kabuğu), gluten, azo boyaları, tad arttırıcılar ve koruyucu maddeler gibi gıdaların ya da gıda katkı maddelerinin ülserleri başlatan faktör olabileceğini ileri sürmüşler, fakat bu durum diğer araştırmacılar tarafından onaylanmamıştır (71).

2.3.4. RAS Oluşumunu Etkileyen Sistemik Faktörler

Çoğu RAS'lı hasta genel durum bakımından sağlıklıdır. Bazı sistemik hastalıklarda da klinik olarak RAS'a benzeyen oral ülserasyonlar oluşabilir. Bu hastalıklar içinde Behçet Sendromu, MAGIC (mouth and genital ulcers with inflamed cartilage) sendromu, Sweet sendromu (acute febrile neutrophilic dermatosis), siklik nötropeni, çölyak hastalığı (gluten sensitive enteropathy), Crohn hastalığı, ülseratif kolit, periyodik ateş ile birlikte aft, farenjit ve adenit (PFAPA) sendromu, gastrointestinal bozukluklar ile birlikte veya ayrı olarak çeşitli beslenme yetersizlikleri, HIV enfeksiyonunu da kapsayan diğer primer ve sekonder immun yetersizlikler yer alır (71,124,142,106).

Nadiren, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar genital ülserlerin yanı sıra RAS benzeri oral ülserler oluşturabilirler (60). Nicorandil tedavisi sırasında RAS benzeri yüzeysel ülserasyonlar ortaya çıkabilir. Bununla birlikte ilaca bağlı olarak oluşan

ülserler, RAS'dan farklı olarak tekrar etmezler ve nicorandil tedavisinin kesilmesi ile kaybolurlar (32).

Bazı araştırmacılar RAS hastalarının %20'sinde demir, folik asit veya B₁₂ vitamini eksikliği olduğunu bildirmişler, fakat bu durum diğer araştırmacılar tarafından onaylanmamıştır. Bu eksiklikler RAS'ın patogenezinde önemli olsa da bazı çalışmalar demir ya da vitamin takviyesinin hastalarda nadiren iyileşme sağladığını bildirilmiştir (45,57,66,109,110,161).

2.4. Sitokinler

Sitokinler, küçük molekül yapılı suda çözünebilen veya membrana bağlı olabilen protein ya da glikoprotein yapılı ve bir hücreden diğerine bilgi aktaran moleküllerdir. Sitokinler inflammatuar aktivitelere göre pro-inflammatuar (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β) ve antiinflammatuar (IL-1Ra, IL-10) olarak da alt gruplara ayrılmıştır. Sitokinlerin otokrin, parakrin veya sistemik etkileri olabilir. Sitokin aracılı proinflammatuar etki yine antiinflammatuar sitokinler veya sitokin reseptör spesifik antagonizm ile inhibe edilebilir. Bu uyarıcı ve inhibe edici faktörler arasındaki denge normal hücre fonksiyonu için esansiyeldir ve bazı hastalıklarda sitokin üretiminde dengesizlik olduğu gözlenmiştir. Bu rahatsızlıklara, sitokinlerin sentezi, sekresyonu ve katabolizması gibi aşamalarda olabilecek etkiler sebep olabilir. Sitokin gen polimorfizminin sitokin sekresyonu üzerinde fonksiyonel etkilerinin önemli olduğunu anlaşılmaması ile kişiler arasında görülen farklı sitokin sekresyon kapasiteleri, bu kişilerin bazı hastalıklara karşı hassasiyetini etkileyebilir (7,78,92,131,136,149)

2.4.1. IL-10

IL-10 ilk defa 1991 yılında sitokin sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır (150). 160 amino asitten oluşur. CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile aktive olmuş monositler, makrofajlar ve B hücreleri IL-10'un hücrel kaynaklıdır. IL-10'un hücre aracılı ve sitotoksik inflammatuar cevabı azaltarak antiinflammatuar etki gösterir. Bu etki kısmen IL-10'un monosit-makrofajların HLA II ekspresyonunu ve antijen sunumunu baskılaması ile gerçekleştiği bildirilmiştir (8). Buna ilave olarak IL-10 antijene karşı T hücrelerinin proliferasyonunu, monosit/makrofaj ve nötrofillerin proinflammatuar sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) üretimini ve doğal öldürücü hücrelerin IFN- γ üretimini inhibe eder. IL-

10'un makrofajların reaktif oksijen türleri üretimini ve aynı zamanda antimikrobiyal aktivitelerini baskılayıcı etkisi de vardır. TNF- α , IL-6, IL-12, glukokortikoidler, adrenalin ve PGE2'nin makrofajlardan IL-10 sentezini arttırdığı gösterilmiştir (47,48,59).

IL-10 geni bastırılmış farelerde yapılan çalışmalarda , IL-10'un inflamatuvar cevaba karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda farelerde kronik enterokolit gelişmiş ve kolondaki lezyonlarda mononükleer hücre infiltrasyonu ve IL-1, IL-6, TNF- α , nitrik oksit seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte IL-10'un infesiyona duyarlılığı da artırdığı bildirilmiştir (86).

Bu sonuçlara göre, IL-10'un başlıca fonksiyonunun konağın zararlı immun yanıtını sınırlandırmak olduğu düşünülebilir.

IL-10 geni 1q31-q32 kromozomunda lokalizedir. Gen dört eksondan oluşur. Fare IL-10 geninde çeşitli transkripsiyonel düzenleyici sekans elemetleri tanımlanmıştır fakat insanlarda IL-10 transkripsiyonu hakkında çok az bilgi vardır (43).

Diğer taraftan ikizler ve aileler üzerinde yapılan çalışmalar ile IL-10 üretiminin yaklaşık olarak %70 oranında çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir (154). Başlıca IL-10 üretimi transkripsiyon seviyesinde kontrol edilmekte ve -1082 protomer bölgesinde A allelinin varlığı ya da yokluğu IL-10 üretimi ile ilgili olduğu gösterilmiştir (144).

Beyaz ırkta tanımlanmış üç tane tek baz değişimi polimorfizmi vardır. Bunlar -1082 (G $\rightarrow$ A), -819 (C $\rightarrow$ T) ve -592 (C $\rightarrow$ A)'de lokalizedir ve düşük IL-10 üreten haplotip veya ATA olarak adlandırılmıştır. Bu polimorfizmler IL-10 üretimi ile bağlantılıdır. IL-10 GCC haplotipinin periferel kan mononükleer hücre kültüründe yüksek IL-10 üretimi ile ilgili olduğu bulunmuştur (144). ATA haplotipinin ise düşük transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. (31).

IL-10, immun yanıtı düzenleyici etkisinin yanında B hücreleri ve otoreaktif B hücrelerinin çoğalmasına neden olur. Tip I diyabetik hastalarda otoreaktif B hücreleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve IL-10 üretimi ile bu hücrelerin artışı arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular otoimmun hastalıklardan romatoid artrit, sistemik lupus erythematosus ve Sjögren sendromu ile de tutarlılık göstermektedir. İlerlemiş periodontitisi olan hastalarda da kontrole göre otoreaktif B hücrelerinin altı kat arttığı bulunmuş ve IL-10 ile ilişkili olarak otoreaktif B hücrelerinin periodontal

hastalıkların patogeneğinde rol alabileceği ileri sürülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmada İsveçli kronik periodontitisi olan hastalarda IL-10'un yüksek üretimi ile ilişkili olan GG allelinin daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (17).

IL-10 polimorfizmi kronik hepatit C hastalarının tedavisinde önemli rol oynadığı öne sürülmüştür. Yüksek IL-10 düzeyi ile ilişkili genotipi taşıyan kronik hepatit C hastalarının, IFN- α tedavisine cevabı zayıf olmuştur. Kendiliğinden iyileşme gösteren hepatit C hastalarında düşük TNF- α ve yüksek IL-10 üretimi ile ilişkili genotiplerin ikisinin birden anlamlı derecede sık görüldüğü bildirilmiştir (90). Bu sonuçlara göre IL-10 genetik özelliğine göre hastalara kişisel klinik strateji uygulanabileceği düşünülebilir.

RAS hastalarının normal mukozalarında kontrole göre düşük IL-10 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (20). Bununla birlikte İngiliz RAS hastalarında IL-10 -1082 (G→A) polimorfizmi araştırılmış fakat hastalık ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. (11).

2.4.2. TNF- α

TNF- α ilk defa farelerde tümörleri nekrotize edebilen makrofaj türevli faktör olarak tanımlanmıştır. Membrana bağlı 233 aminoasitten oluşan prekürsör protein olarak sentezlenir ve TNF- α dönüştürücü enzim ile 157 aminoasitten oluşan çözünür formu meydana gelir. Çözünür molekül TNFR1 ve TNFR2 reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir (42,58,120).

Aktive monosit/makrofajlar lokal ve dolaşımdaki TNF- α 'nın başlıca kaynağıdır. Buna ek olarak beyinde (glial hücrelerde) ve kalpte (kardiyak myositlerde) lokal olarak TNF- α üretilir (120). Normal konsantrasyonlarda TNF- α 'nın doku yenilenmesi ve onarımı, inflamasyon, sitotoksik reaksiyonlar ve anti-tümoral immunité gibi yaraları vardır. Diğer yandan TNF- α 'nın serumda yüksek seviyede olması akut şok gelişimi ve doku hasarı, katabolik hormon salınımı, gastrointestinal nekroz, akut renal tübüler nekroz, adrenal hemoraji ve ateş oluşumuna neden olmaktadır. TNF- α 'ya kronik olarak düşük dozda maruz kalınırsa, kilo kaybı, anoreksiya, protein katabolizması, lipid tüketimi, hepatosplenomegali, subendokardiyal inflamasyon, insülin direnci ve akut faz proteini salınımı gerçekleşmektedir (112). İnflamasyon indüksiyonundaki önemli rolü nedeniyle TNF- α romatoid artrit, multipl skleroz, diyabet, astım, Crohn hastalığı gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda ve ayrıca

kanserde potansiyel zararları olduğu gösterilmiştir (112). Doğal ya da cerrahi müdahale ile menopoza giren kadınlarda dolaşımdaki TNF- α düzeyinin arttığını bildiren çalışmalar vardır. Bununla birlikte postmenopozal osteoporozda TNF- α 'nın osteoblast aktivitesini inhibe ettiği ve osteoklastojenezisi stimüle ettiği gösterilmiştir. (65,152).

Makrofajlardan salgılanan TNF- α , endotel hücrelerini uyararak E ve P selektinler ile, özellikle ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule-1), ve VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) gibi integrin ligandlarının ekspresyonunu artırır. İnflamasyon bölgesindeki kan damarlarından geçen efektör T hücreleri, zayıfça selektinlere bağlanır ve endotelial yüzeyde yuvarlanırlar. Bu efektör T hücrelerinin integrinleri endotelde kendi ligandları ile karşılaşınca, T hücreleri endotele daha sıkı yapışır ve kan damarlarından inflamasyon bölgesine olan göç süreci başlar (18,151).

TNF- α geni 6p21.3 kromozomunda ve MHC (Majör Histocompatibility Complex) sınıf III bölgesinde HLA-DR ve HLA-A genleri arasında lokalizedir (120,163). 4 eksondan oluşur. Genin çok sayıda kompleks hastalıklara hassasiyet oluşturan allelik varyasyonları vardır. Örneğin nadir olan TNF- α (-308'de adenozin) allelinin transkripsiyonda 6-7 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir. (77,156). TNF- α inhibisyonunun, Crohn hastalığı ve romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisine yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (44). TNF- α inhibitörleri olan pentoksifilin ve talidomidin oral ülserlerin iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (89). Örneğin, talidomid adlı ilaç doza bağlı olarak ve diğer sitokinlerin üretimini etkilemeksizin, seçici bir şekilde monositlerden TNF- α üretimini inhibe eder. Talidomid, TNF- α mRNA'sının yarılanma ömrünü yaklaşık olarak 30 dakikadan 17 dakikaya indirir. Günde 100 mg talidomid tedavisi uygulanan RAS'lı hastalarda ağrı azalma ve erken iyileşme görülmüştür (13,22,25,40). Aynı şekilde IL-10'da Th-1 hücrelerinde sitokin sentezini baskılayıcı etki gösterdiğinden sitokin sentez inhibitörü olarak bilinmektedir ve TNF alfa mRNA seviyesini azaltıcı etki gösterir (98).

İngiltere de 95 beyaz ırktan olan RAS hastası üzerinde yapılan çalışmada TNF- α , tumor nekroz factor- β (TNF- β) ve vitamin D reseptör genlerinin polimorfizmi ile hastalık arasında bir ilişki bulunamazken, interlekin-1 β (IL-1 β) ve interlekin-6 (IL-6) ile kuvvetli ilişki bulunmuştur (10,12). Brezilyalı RAS hastalarında da IL-1 β ve TNF- α 'nın heterozigot genotiplerinin anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (52).

2.5. Tükürük

Tükürük submandibular, sublingual ve parotis olmak üzere majör tükürük bezleri ile minör tükürük bezlerinin salgıları ve diş eti oluğu (DOS) sıvısının karışımından oluşur. Tükürüğün %99'u sudan oluşur. Geri kalan %1'ini ise, proteinler, glikoproteinler, lipidler gibi büyük organik moleküller, glikoz, üre gibi küçük moleküller ve sodyum, kalsiyum, klorür ve fosfat gibi elektrolitler oluşturur (72,94).

Tükürüğün yumuşak doku onarımında yer alan pek çok biyokimyasal sistem ve lizozim, laktoferrin, tükürük peroksidazı gibi çeşitli antibakteriyel bileşenleri bulunmaktadır. Önemli etkileri olan proteinler arasında farklı molekül ağırlıklı musinler, glikozillenmiş veya serbest amilazlar, prolince zengin proteinler, histidine zengin proteinler (histatinler), sistin kapsayan proteinler (sistatinler), tirozince zengin proteinler (staterin ve diğerleri), laktoferrin, lizozim ve peroksidazlar sayılabilir. Albümin, bazı immünglobülinler gibi proteinler, hormon, vitamin ve üre, ürik asit gibi azotlu bileşikler de kandan tükürük salgısına karışan moleküllerdir (35).

2.5.1. Tükürüğün Antioksidan Özellikleri

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak serbest radikaller ve reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROM oluşmaktadır. Bu bileşikler organizmadaki güçlü savunma sistemi sayesinde zararlı etkilerini ortaya koymadan etkisiz hale getirilirler. Buna karşın prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biomoleküllere hasar verir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile ROM'nin hücre hasarında önemli rol oynadığı ve birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ateroskleroz, amfizem/bronşit, kanser, inflamasyon, romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus, ülseratif kolit, akut renal yetmezlik, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar, Parkinson hastalığı, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (21,29,75,83,148).

Dışardan vücudumuza aldığımız maddeler ile ilk temas eden biyolojik ortam tükürüktür ve sadece ağız için değil aynı zamanda genel sağlık içinde önemi vardır. Tükürüğün temel görevi ağız ve üst gastrointestinal kanalı çeşitli zararlı etkenlere karşı

korumaktır. Benzer şekilde serbest radikaller ve ROM ile antioksidanlar arasındaki dengesizliğin çeşitli oral patolojilerin başlangıcı ve gelişiminde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür. Serbest radikallerin oral mukozaya saldırısının enfeksiyondan kansere kadar çeşitli sonuçlara yol açabileceği bildirilmiştir (103). Ağızda, serbest radikaller ve ROM fizyolojik olarak polimorf nükleer lökositlerden (PNL) kaynaklanır. Fizyolojik olarak çiğneme fonksiyonunun lipid peroksidasyonu gibi reaksiyonları arttırması nedeniyle tükürük serbest radikal aracılı oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bununla birlikte gingival inflamasyonda DOS miktarı artar ve inflamatuvar cevaptan kaynaklanan ürünler tükürüğe geçer. Bu nedenle tükürüğün antioksidan kapasitesine karşı ilgi artmış ve ölçülmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir (9,74).

Tükürük antioksidan sistemi çeşitli molekül ve enzimleri kapsar. Bunlardan her ikisi de suda çözünen ürik asit molekülü ve peroksidaz enzimi en önemlileridir. Lipoproteinler tarafından taşınan ve yağda çözünen antioksidanlar tükürükte düşük konsantrasyonda bulunur ve total antioksidan kapasitenin %10'unu oluşturur (26).

Tükürük antioksidan sistemi içinde yer alan enzimlerden peroksidaz enzimi birinci derecede etkili iken süperoksit dismutaz (SOD) enziminin antioksidan rolü peroksidaza göre daha azdır. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz ise tükürükte çok düşük antioksidan etkiye sahiptir.

İnsan tükürüğünde iki tip peroksidaz enzimi bulunmaktadır. Birincisi enzimatik özellikleri laktoperoksidaza benzeyen tükürük bezi kaynaklı olan peroksidaz, ikincisi ise PNL'den kaynaklanan myeloperoksidazdır (81).

Peroksidaz, tükürükte yer alan en önemli antioksidan enzim olmasına karşın tükürük proteinlerinin sadece %0,01'ini oluşturmaktadır. Tükürük peroksidazı hem içeren bir proteindir ve tiyosiyanatı okside ederek biyolojik olarak aktif olan hipotiyosiyanit iyonunu oluşturur. Hipotiyosiyanit tükürük bezi salgısının aktif komponentidir. Salgısal hücrelerde SOD ve oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hidrojen peroksit, tiyosiyanatın oksidasyonunu gerçekleştirmektedir. Oluşan hipotiyosiyanit çeşitli mikroorganizmaların büyüme ve metabolizmalarını inhibe ederek etki gösterir (30,67,107,118).

Hidrojen peroksit serbest radikal olmasa da biyolojik olarak önemli bir oksidandır çünkü hidroksil radikali oluşturabilme potansiyeli vardır. Bu nedenle hem oral hem de gastrointesinal mukoza için toksik etkilidir ve tükürükte bulunan

tiyosiyanat iyonunu okside eder. Tiyosiyanat, diğer biyolojik sistemlerde yer alan glutatyon gibi elektron verici olarak işlev görür ve bu reaksiyon peroksidaz tarafından katalizlenir. (41,103).

Hem grubu içeren myeloperoksidaz (MPO) enzimi de kan ve dokularda konağın korunmasında benzer role sahiptir. MPO monositler ve PNL'de bulunur. PNL hücrelerinde monositlere göre üç kat daha fazla MPO bulunmaktadır ve PNL hücrelerindeki total proteinin %5 kadarını oluşturmaktadır. MPO hücre içinde sitoplazmik sekretuar granüllerde depolanır . Uyarılmış hücrelerde MPO ve hidrojen peroksit fagolizozomlara ve extrasellüler ortama salgılanır. MPO hidrojen peroksit aracılığı ile klorür iyonunu okside ederek potansiyel bakterisid bir ajan olan hipokloröz asit (HOCL) üretir. MPO/hidrojen peroksit/klorür sisteminin antimikrobiyal aktivitesi, HOCl'in mikrobiyal hücre komponentleri ile doğrudan etkileşimi ya da oluşturduğu kloraminler gibi diğer okside edici ajanlar aracılığı ile bakterisid etki gösterebilir (4,23,46,100,158).

İnsanlarda üç tip SOD enzimi bulunmaktadır. Sitosolik Cu-Zn SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve extrasellüler SOD. Çeşitli fare dokuları ve hücre kültürlerinde TNF- α 'nın seçici olarak Mn-SOD mRNA'sını indüklediği gösterilmiştir (73). Cu-Zn SOD süperoksit anyon radikallerini dismutasyona uğratarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşturur. Bu enzimin antioksidan savunma sisteminde önemli rolü vardır (4,97). Immun sistem savunma hücrelerinin lezyon bölgesine infiltrasyonunu takiben o bölgede serbest radikallerin miktarı artar. Oluşan süperoksit radikallerinin dismutasyonu özellikle yüksek SOD aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Hidrojen peroksit, süperoksit radikallerinin dismutasyonu sonucu olarak SOD tarafından üretilmektedir. Artmış hidrojen peroksitin detoksifikasyonu tükürük peroksidazı tarafından gerçekleştirilir. SOD enziminin üretimi hücre ve dokularda oksidatif stres ile artmaktadır. Fakat extrasellüler sıvılardaki önemi azdır. Yaşlanma, menopoz ve osteoporoz artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma mekanizması ile bağlantılıdır. Postmenopozal periodontitisli kadınlarda yapılan bir çalışmada diş eti oluğu sıvısında SOD aktivitesi ve total antioksidan kapasite (TAK) menopozda olmayan periodontitisli ve sağlıklı kontrole göre düşük bulunmuştur (6).

Oral patojenik bakterilere karşı en önemli koruyucu olan PNL hücreleri, infeksiyon ve inflamasyon bölgesinde meydana gelen kemotaktik sinyallere cevap olarak damar duvarından dokuya göç ederler. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal

savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$ ve kloraminleri oluşturarak bakterileri öldürürler. Her ne kadar bu fonksiyonlar normal savunma sistemi için temel teşkil etse de çeşitli inflamatuvar reaksiyonlar sırasında PNL'ler hasarın daha da artmasına neden olabilmektedir (34,91,95,135).

Oral dokulardan tükürüğe geçen PNL hücrelerinin başlıca kaynağı dişeti oluşudur. Tükürükte MPO aktivitesinin ölçümü oral dokudaki inflamasyon yada infeksiyonun tespitinde ve tedavinin izlenmesinde hızlı ve objektif metod olma özelliği sağlayabilir. Tükürük hipotonik olduğu ve deterjan benzeri maddeler içerdiğinden PNL hücreleri hızla lizise uğradığı için MPO aktivitesi ölçümü PNL hücrelerinin sayılmasına göre daha avantajlıdır (101,140,141,159).

Diğer taraftan tükürük antioksidanlar açısından da zengin bir vücut sıvısıdır(82). Tükürüğün başlıca antioksidan bileşeni ürik asittir ve konsantrasyon bakımından serumdakine benzerlik gösterir. Diğer tükürük antioksidanları arasında yer alan albumin ve askorbik asidin konsantrasyonları ise serumdan daha düşüktür (103,119). Total antioksidan kapasitenin %70'den fazlasının ürik asit tarafından sağlandığı bildirilmiştir (123).

Serbest radikal ve ROM tarafından zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Membranlardaki oksidatif hasar membran akışkanlığında artış, bütünlüğünde bozulma ve membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktivasyonu ile sonuçlanır (38,56,108,153). Malondialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvuru testidir. Tükürükteki MDA seviyesinin sistemik oksidatif stresden etkilenmediği ve gingivitisli hastaların tükürüklerinde miktarının arttığı bildirilmiştir (24).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmada RAS'lı hastalar ve kontrol olmak üzere iki farklı grup kullanılmıştır. Hasta grubu, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalı ve Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi Dermatoloji Kliniği'ne başvuran, 19-74 yaş aralığındaki RAS'lı hasta bireyler arasından seçilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması 39.86 ± 13.2 (ortalama $\pm$ SD; median 38 yıl) olarak bulunmuştur.

Kontrol grubu ise RAS hikayesi bulunmayan 18-65 yaş aralığındaki sağlıklı bireyler arasından seçilmiştir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 37.5 ± 10.86 (ortalama $\pm$ SD; median 38 yıl) olarak bulunmuştur.

Çalışmaya son altı ay veya daha uzun süredir tekrarlayan oral aftöz ülserasyonu olan, tam kan sayımı, serum B₁₂ ve folat düzeyi normal aralıkta olan kişiler dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda Behçet Sendromu, çölyak hastalığı, Crohn hastalığı, ülseratif kolit ya da AIDS gibi oral aftöz ülserasyon oluşturabilecek sistemik hastalığı olanlar, hamile olanlar, sistemik steroid, immunomodülatör ya da sitotoksik ilaç tedavisi altında olanlar çalışmaya dahil edilmedi. Tüm hastalarda minör aftlar görülmekte olup, lezyonların aktif (1-2 günlük) ve ağrılı olduğu dönemde örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Hastalığın şiddetine göre üç grup oluşturulmuştur. A grubunda, tolere edilebilir ağrısı olan ve yılda 3-4 defa gibi daha az sıklıkta aft görülen hastalar, B grubunda her ay ağrılı aft görülen hastalar, C grubunda da yine her ay ağrılı aft görülen fakat bir ülser iyileşirken aynı anda yenisinin oluşmaya başladığı hastalar yer almıştır.

Hasta ve kontrol grubundan sabah saat 9.00-11.00 arasında örnek alımı gerçekleştirildi. EDTA'lı ve kuru tüplere kan örnekleri, buz üstünde tutulan steril falkon tüplere de fiziksel ya da kimyasal olarak stimüle edilmemiş istirahat tükürüğü toplandı. Hasta ve kontrollerin, tükürük örneklerinin alımından en az iki saat öncesine kadar herhangi bir gıda almamış olmasına dikkat edildi.

EDTA'lı kan örneği DNA izolasyonu için, kuru tübe alınan kan örneği ise serum elde etmek için kullanıldı. Tükürük örneği +4 °C ve 4000 rpm'de hemen santrifüj edildi. Elde edilen serum ve tükürük örnekleri -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

3.2. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpe alınan 3ml kan örneğinden DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon işlemi Genomik DNA Miniprep kiti (Bio Basic Inc) ile gerçekleştirildi. Kan örneği önce eritrosit lizis tamponu ile yıkandı, ardından 1500 rpm hızda çöktürülen lökositler kit içinden çıkan lökosit lizis tampon ve dışardan eklenen proteinaz K (50 mg/ml) ile 56 °C' de bekletilerek proteinlerin sindirimi gerçekleştirildi. Hücre lizatı kitin içinden çıkan filtreli tüplere alındı ve santrifüjleme ile filtreden geçirildi. Filtre birkaç kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra elüsyon tamponu ile filtredeki DNA çözülerek santrifüjleme yöntemiyle steril 1.5 ml'lik tüplere alındı. Elde edilen DNA örnekleri çalışma zamanına kadar + 4 °C derecede saklandı.

3.2.1. DNA Miktar Tayini

Elde edilen DNA örnekleri polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) reaksiyonuna konulması gereken miktarların belirlenmesi için NANODROP yöntemi ile ölçüldü. DNA miktar ve saflığının belirlenmesi için 260 ve 280 nm'lerdeki absorbans değerleri dikkate alınarak DNA miktarları ng/μl cinsinden değerlendirildi ve her bir PZR konulacak olan miktar μl cinsinden belirlendi.

3.3. Sitokin Gen polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Sitokinlerin genotipleme yöntemleri ve PZR sonucunda oluşan ampikon uzunlukları Tablo 3.3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.3.1. TNFα ve IL-10'un genotipleme yöntemleri ve ampikon uzunlukları

	Yöntem	Allel 1 (bç)*	Allel 2 (bç)
TNF -308 G/A	PCR + Enzim Kesimi (NcoI)	87+20	107
IL-10 -1082 G/A	Allel spesifik PCR	139	139

* baz çifti

3.3.1. TNFα -308 G/A Tek Baz Polimorfizminin Belirlenmesi

TNF-α geninde promotör bölgedeki 308. nükleotiddeki G / A tek nükleotid değişimi PZR ve Restriksiyon Enzim Kesim yöntemiyle gösterildi. PZR/restriksiyon Enzim Kesim karışımları ve amplifikasyon için gerekli PZR ısı

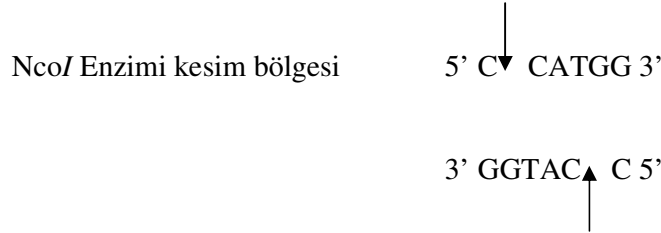
koşulları sırasıyla Tablo 3.3.1.1 ve Tablo 3.3.1.2’de yer almaktadır. 107 bç’lik PZR ürünü *NcoI enzimi ile kesilip, %4’lük agaroz jelde görüntülendi.

*TNF- α primer dizisi:

A1: 5’ AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3’

A2: 5’ TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3’

* NcoI Restriksiyon Enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır.



Tablo 3.3.1.1: TNF- α PZR ve enzim kesimi karışımı

TNF- α PZR karışımı	TNF- α Enzim Kesimi Karışımı
10X Tampon : 3 μ l (50 mM KCL, 10mM Tris-HCL)	PZR ürünü : 20 μ l
MgSO ₄ : 2.8 μ l	Tampon : 3 μ l
dNTPs (2 mM) : 3 μ l	NcoI : 0.2 μ l
Primer (mix) (10 pmol/ μ l) : 1 μ l	Bidistile Su : 6.8 μ l
Taq polimeraz (10 U/ μ l) : 0.15 μ l	Enzim kesimi ısısı: 37 °C’de 3 saat
Bidistile su : 16.55 μ l	
DNA: 100 ng	

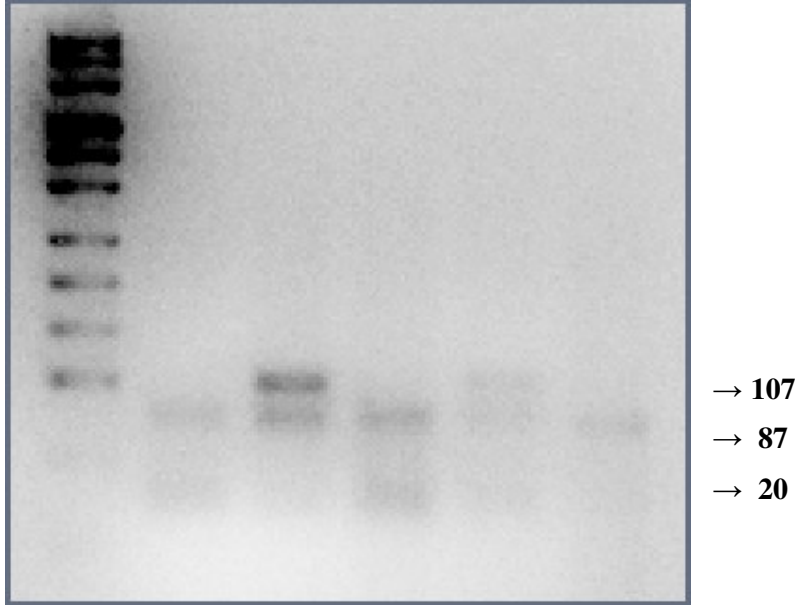
Tablo 3.3.1.2 : TNF- α PZR döngüsünün süre ve ısıları

PZR ısıları	Süre	Döngü
94 °C	3 dakika	30
94 °C	40 saniye	
60 °C	40 saniye	
72 °C	40 saniye	
72 °C	5 dakika	

*TNF- α geni PZR ürününün, *NcoI* enzimi ile kesim sonrasında elde edilen DNA parça büyüklükleri Tablo 3.3.1.3’de yer almaktadır. G nükleotidi Alel 1 (87+20 bç), A nükleotidi de Alel 2 (107 bç) olarak genotiplendi.

Tablo 3.3.1.3 : TNF- α geni PZR ürününün, *NcoI* enzimi ile kesim sonrasında elde edilen DNA parça büyüklükleri

Baz Çifti	HOMOZİGOT (A1A1)	HETEROZİGOT (A1A2)	HOMOZİGOT (A2A2)
107		_____	_____
87	_____	_____	
20	_____	_____	



Şekil 3.3.1.1 : TNF- α geni PZR ürününün, *NcoI* enzimi ile kesim sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

3.3.2. IL-10 -1082 G/A Tek Baz Polimorfizminin Belirlenmesi

IL-10 geninde promotör bölgedeki 1082. nükleotiddeki G / A tek nükleotid değişimi Alel Spesifik PZR yöntemiyle gösterildi. Her örnek için (A2 ve A3 primerleri ayrı kullanılmak suretiyle) iki ayrı tüp hazırlanarak eş zamanlı amplifikasyon yapıldı. Amplifikasyon kontrolü olarak da β Globin geni çoğaltıldı.

PZR karışımı ve amplifikasyon için gerekli PZR ısı koşulları sırasıyla Tablo 3.3.2.1 ve 3.3.2.2’de yer almaktadır. 139 bç PZR ürünü %4’lük agaroz jelde görüntülendi.

*IL-10 Primer dizisi:

A1: 5’AGC AAC ACT CCT CGT CGC AAC 3’

A2: 5’ CCT ATC CCT ACT TCC CCC 3’

A3: 5’ CCT ATC CCT ACT TCC CCT 3’

Tablo 3.3.2.1 : IL-10 PZR ve enzim kesim karışımı

A2 Primeri içeren karışım	A3 Primeri içeren karışım
10 x tampon : 2.5 µl	10 x tampon : 2.5 µl
MgSO ₄ : 1.5 µl	MgSO ₄ : 1.5 µl
dNTPs (2 mM) : 2.5 µl	dNTPs (2 mM) : 2.5 µl
Primer (β Globin F)1 (10 pmol/ µl) : 0.5 µl	Primer (β Globin F)1 (10 pmol/ µl): 0.5 µl
Primer (β Globin R)2 (10 pmol/ µl) : 0.5 µl	Primer (β Globin R)2 (10 pmol/ µl) : 0.5 µl
Primer A1 (10 pmol/ µl): 0.5 µl	Primer A1 (10 pmol/ µl): 0.5 µl
Primer A2 (10 pmol/ µl): 0.5 µl	Primer A3 (10 pmol/ µl): 0.5 µl
Taq polimeraz (10 U/ µl): 0.2 µl	Taq polimeraz (10 U/ µl): 0.2 µl
Bidistile su : 14,3 µl	Bidistile su : 14.3 µl
DNA : 100 ng	DNA : 100 ng

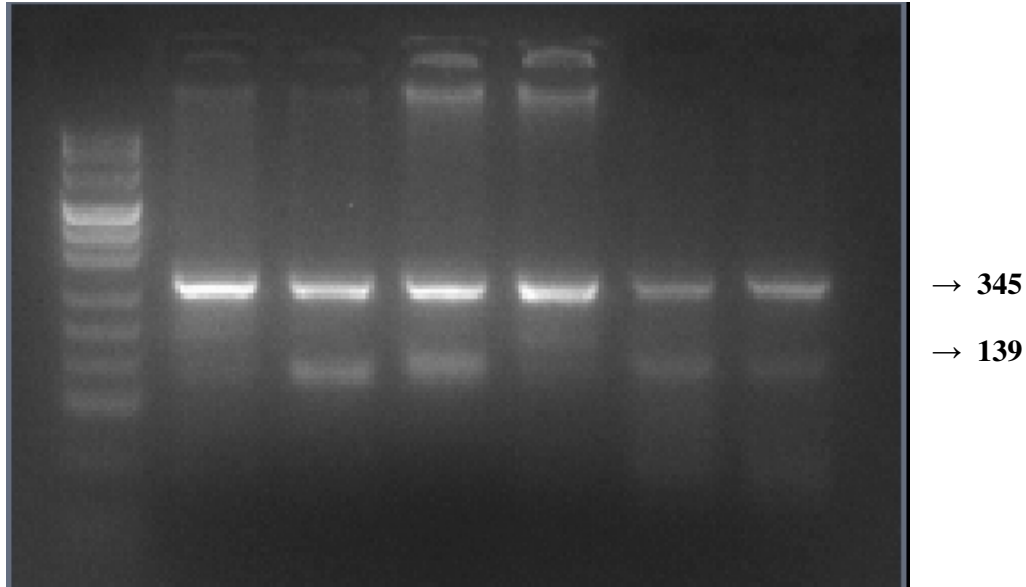
Tablo 3.3.2.2 : IL-10 PZR döngüsünün süre ve ısıları

PZR ısıları	Süre	Döngü
94 °C	2 dakika	30
94 °C	30 saniye	
60 °C	1 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	

*IL-10 geninin PZR ile amplifikasyonu sonucunda elde edilen DNA parça büyüklükleri Tablo 3.2.2.3’de yer almaktadır. G nükleotidi A2, A nükleotidi de A3 olarak genotiplendi. Ayrı primerler kullanılarak ayrı tüplerde hazırlanan PZR ürünlerinden hangisinde amplifikasyon olduysa genotipleme buna göre yapıldı.. Amplifikasyon kontrolü olarak da 345 bp’ lik β Globin geni çoğaltıldı.

Tablo 3.3.2.3: IL-10 gen polimorfizmini göstermek amacıyla yapılan allel spesifik PZR yönteminin ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülenen allellerin şematik olarak gösterimi.

Baz çifti	HASTA 1		HASTA 2		HASTA 3	
	β globin	β globin	β globin	β globin	β globin	β globin
	ve	ve	ve	ve	ve	ve
	A2	A3	A2	A3	A2	A3
	primeri	primeri	primeri	primeri	primeri	primeri
	karişımı	karişımı	karişımı	karişımı	karişımı	karişımı
345	+	+	+	+	+	+
139	+	-	-	+	+	+
SONUÇ:	A2/A2		A3/A3		A2/A3	
	HOMOZİGOT		HOMOZİGOT		HETEROZİGOT	



Şekil 3.2.2.1 : IL-10 geni PZR ürününün agaroz jel elektroforezi görüntüsü

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Tükürük Protein Düzeylerinin Belirlenmesi (133)

Tükürük örneklerindeki protein miktarının belirlenmesi için Bicinchoninic asit (BCA) yönteminden yararlanıldı.

Bu yöntemde iki değerlikli bakır (Cu^{2+}) iyonları alkali ortamda proteinlerdeki peptid bağları ile kompleks oluşturarak bir değerlikli bakıra (Cu^{1+}) indirgenir. Cu^{1+} iyonları bicinchoninic asidin sodyum tuzu ile reaksiyon vererek menekşe-mor renkli bir kompleks oluşturur. Bu rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Ayırıcılar

%1 Sığır serum albumini (BSA)

%4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

BCA çözeltisi (Sigma B9643)

İşlem

%1 BSA çözeltisi sulandırılarak 100, 250, 500, 750 ve 1000 μg 'lık çalışma standartları hazırlandı. Elisa cihazına ait plağa 10 μl standart ve tükürük örnekleri konuldu. Üzerlerine BCA ve %4'lük $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nin 50:1 oranında karıştırılması ile elde edilen çözeltiden 200 μl eklendi. Plak 2-3 dakika çalkalayıcıda karıştırıldı ve 37°C'de 30 dakika bekletildi. Standart ve örneklerin köre karşı absorbans değerleri Mikroplak okuyucuda ve 562 nm'de okundu. Protein miktarları standart grafiğinden hesaplandı ve mg/ml olarak ifade edildi.

3.4.2. Tükürükte Total Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi (132)

Tükürükte total peroksidaz aktivitesini belirlemek için kullanılan yöntemde, peroksidaz varlığında hidrojen peroksit hızla fenol ve 4-aminoantipirin ile reaksiyona girer ve 510 nm de en fazla absorbans veren pembe renkli kromojen olan quinonemine oluşur. Peroksidaz aktivitesi oluşan bu kromojenin miktarı ile doğru orantılıdır.

Ayrıraçlar

0.2 M	Potasyum fosfat tamponu (pH 7)
0.0017 M	Hidrojen peroksit
0.0025 M	4-Aminoantipirin
0.17 M	Fenol

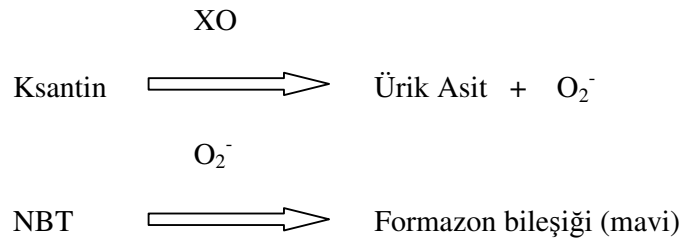
İşlem

0.0017 M hidrojen peroksit çözeltisi fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

4-aminoantipirin çözeltisi ise 0.17 M fenol çözeltisi içinde çözülerek hazırlandı. Deney tüplerine 1.4 ml fenol/4-aminoantipirin çözeltisi ve 1.5 ml hidrojen peroksit eklendi. Kör tübüne de 0.1 ml distile su, deney tüplerinede 0.1 ml tükürük eklendikten sonra 510 nm ve 25 °C'de absorbans değişimi 5 dakika boyunca izlendi. Dakikadaki absorbans değişimi bulundu. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon = 6.58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı. Enzim aktivitesi $\mu\text{mol/dak/ml}$ olarak belirlendi ve sonuçlar U/ml olarak verildi.

3.4.3. Tükürükte Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi (138)

Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu ile ortaya çıkan süperoksid anyon radikalleri, nitro blue tetrazolium (NBT)'u indirgeyerek mavi renkte bir formazon bileşiği oluştururlar.



Örnekteki SOD enzimi oluşan bu radikalleri alkali pH'da yakalayarak NBT indirgenmesini inhibe eder ve mavi renk oluşumu engellenir. Oluşan rengin şiddeti, SOD aktivitesi ile ters orantılıdır. 1 Ünite SOD aktivitesi, NBT'nin indirgenme hızını %50 inhibe eden enzim miktarı olarak belirlendi.

Ayrıçalar

0.3 mM	Ksantin
0.6 mM	EDTA
150 µM	Nitroblue tetrazolium (NBT)
400 mM	Na ₂ CO ₃
1g/L	BSA
2 M	Amonyum sülfat çözeltisi
0.167 U/ml	Ksantin oksidaz
8 mM	CuCl ₂

İşlem

SOD ölçümü için reaksiyon karışımı; ksantin, EDTA, NBT, Na₂CO₃ ve BSA çözeltileri sırası ile 10: 5: 5 : 3: 1.5 oranlarında karıştırılarak taze olarak hazırlandı ve pH 10.2'ye ayarlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi amonyum sülfat çözeltisi ile sulandırılarak hazırlandı. Kör tübüne 0.3 ml distile su, deney tüplerine 0.3'er ml tükürük örnekleri konuldu. Tüm tüplere reaksiyon karışımından 1 ml ilave edildi. 25°C 10 dakika bekletildikten sonra 0.05 ml ksantin oksidaz çözeltisi ilave edildi ve tekrar 25°C'de 20 dakika bekletildi. Sürenin sonunda tüm tüplere 0.05 CuCl₂ çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 560 nm'de distile suya karşı absorbanları okundu. Sonuçlar U/ml olarak verildi.

Hesap:

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{deney}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

3.4.4. Tükürükte Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi (70,134)

Hidrojen peroksit ve klorür iyonu (Cl^-) varlığında myeloperoksidaz hipoklorit iyonu (OCl^-) oluşturur. OCl^- monoklordimedonu diklordimedona dönüştürür ve sonuçta 290 nm de absorbans düşüşü gerçekleşir.

Ayırıcılar

0.1 mM	Potasyum fosfat tamponu (pH 6)
100 mM	KCl
24 μM	Monoklordimedon
0.1 mM	Hidrojen peroksit

İşlem

KCl, fosfat tamponu içinde çözüldü. 360 μl tampon, 20 μl monoklordimedon ve 100 μl tükürük örneği karıştırıldı ve 2-3 dakika 22 °C’de inkübe edildi. 20 μl hidrojen peroksit ilave edildikten sonra absorbans değişimi 290 nm’de 5 dakika boyunca izlendi.

Hesap

1 ünite myeloperoksidaz aktivitesi, dakikada 1 μmol monoklordimedonun diklordimedona dönüşümü ile gerçekleşen optik dansite azalışı olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar U/100 ml olarak verilmiştir.

3.4.5. Tükürükte Total Antioksidan Kapasitenin (TAK) Ölçülmesi (16)

Tükürükte, ferrik tripiridil-s-triazin (Fe^{3+} -TPTZ) kompleksinin ferröz (Fe^{2+} -TPTZ) forma indirgenmesi ile total antioksidan kapasite ölçülmüştür.

Ayırıcılar

40mM	HCl
300 mM	Asetat tamponu (pH 3.6)
10 mM	2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)
20 mM	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1 M	Askorbik asit

İşlem

10 mM TPTZ çözeltisi , 40mM HCl ile hazırlandı. FRAP ayıracı; 300 mM Asetat tamponu (pH 3,6), 10 mM TPTZ ve 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sırası ile 10:1:1 oranlarında karıştırılması ile taze olarak hazırlandı. 1 M askorbik asit çözeltisi sulandırılarak 1000, 750, 500, 250, 100 μM 'lık standartlar elde edildi. Standart tüplerine, 100'er μl her bir standart askorbik asit çözeltisinden, kör tübüne 100 μl distile su, deney tüplerine ise 100'er μl tükürük örnekleri konuldu. Tüm tüplere FRAP ayıracından 30 sn aralıkla 3 ml ilave edildi ve karıştırıldı. 6 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 593 nm'de köre karşı absorbensları okundu. Sonuçlar askorbik asit standardına göre hesaplanarak μM olarak verildi.

3.3.6. Tükürükte Malondialdehit (MDA) Ölçümü (62)

Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile yüksek ısı ve asit ortamda oluşturduğu pembe renkli kromojenin absorbensı 535 nm' de ölçüldü. MDA düzeyi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak nmol/ml olarak hesaplandı.

Ayıraçlar

%0,8 Tiyobarbitürik asit çözeltisi

%30 TCA çözeltisi

5 M HCl

İşlem

Vidalı kapaklı cam deney tüplerine 0.3'er ml tükürük örneği, kör tübüne 0.3 ml distile su konuldu. Üzerlerine 0.375 ml %0.8 TBA, 0.250 ml %30 TCA ve 25.5 μl 5 M HCl ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve kaynar su içinde 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 1000g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın absorbensı 535 nm'de ölçüldü.

3.3.7. Serum TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum örneklerinde TNF- α düzeyleri, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışıldı (BioSource International, Inc humanTNF- α kiti, Katalog No:KHC3011). hTNF- α 'ya spesifik monoklonal antikorla kaplı kuyucuklar üzerine

değeri bilinenen TNF- α standartları ve serum örnekleri eklendi. İlk inkübasyon sırasında hTNF- α antijeni sabit duran antikora bağlanır ve yıkama işleminin ardından hTNF- α 'ya spesifik olan biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İkinci inkübasyon sırasında eklenen bu antikor, birinci antikora bağlı halde olan hTNF- α 'ya bağlandı. Antikor fazlasının uzaklaştırılmasından sonra eklenen Streptavidin-Peroksidaz biotinlenmiş antikora bağlanır ve dört üyeli sandviç oluşturulur. Üçüncü inkübasyondan sonra bağlanmamış enzimler uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi ve ardından stop çözeltisinin eklenmesi ile oluşan renk 450 nm'de okundu. Örnekte bulunan hTNF- α miktarı ile oluşan rengin yoğunluğu doğru orantılıdır. Bu kitin çalışma aralığı 15.6-1000 pg/ml arası olup serum hTNF- α düzeylerini <1.7 pg/ml hassasiyetle ölçmektedir.

3.3.8. Serum IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi

Serum örneklerinde IL-10 düzeyleri, katı faz sandviç Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemiyle çalışıldı (BioSource International, Inc. Human IL-10 kiti, Katalog No:KHC0101). hIL10'a spesifik monoklonal antikora kaplı kuyucuklar üzerine değeri bilinenen hIL-10 standartları ve serum örnekleri eklendi. İlk inkübasyon sırasında hIL-10 antijeni sabit duran antikora bağlanır. Yıkama işleminin ardından hIL-10'a spesifik olan biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İkinci inkübasyon sırasında eklenen bu antikor, birinci antikora bağlı halde olan hIL-10'a bağlandı. Antikor fazlasının uzaklaştırılmasından sonra eklenen Streptavidin-Peroksidaz biotinlenmiş antikora bağlanır ve dört üyeli sandviç oluşturulur. Üçüncü inkübasyondan sonra bağlanmamış enzimler uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi ve ardından stop çözeltisinin eklenmesi ile oluşan renk 450 nm'de okundu. Örnekte bulunan hTNF- α miktarı ile oluşan rengin yoğunluğu doğru orantılıdır. Bu kitin çalışma aralığı 7.8-500 pg/ml arası olup serum IL-10 düzeylerini <1 pg/ml hassasiyetle ölçmektedir.

3.4 İstatistiksel Analizler

Yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak değerlendirildi. Süreklilik gösteren değişkenler için Tek Yönlü Varyans Analizi ve Student's t testi kullanıldı. Süreklilik göstermeyen veya ordinal yapıda değişkenler için Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenler için ise Chi-square (χ^2) testi kullanıldı. Spearman sıra korelasyon testi ile de aralarındaki ilişki incelendi. İstatistik anlamlılık iki yönlü ve $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hastalar ile İlgili Genel Bilgiler

- 1) Kontrol ve hasta grubunun ortalama yaşları sırasıyla 37.5 ± 10.8 ve 39.9 ± 13.2 (ort $\pm$ SD) olarak belirlendi.
- 2) Hasta grubundakiler hastalığın şiddetine göre sınıflandırıldığında %30.4'ü A, %39.2'si B ve %30.4'ü ise C grubunda yer aldı.
- 3) Hasta grubunda ilk aft görülme yaşı 30.2 ± 13.4 (ort $\pm$ SD) olarak belirlendi.
- 4) Hasta grubunda ortalama hastalık süresi 1 ile 40 yıl arasında değiştiği görüldü (9.66 ± 7.95).
- 5) Hastaların %54.9'unun ailesinde de RAS hikayesi olduğu saptandı.
- 6) Hasta grubunda postmenopozal dönemde olan kadın hastaların oranı %14.7, kontrol grubundakilerin oranı ise %10.2 olarak belirlendi.
- 7) Sigara kullananların oranı hasta grubunda %9.2, kontrol grubunda ise %21.3 olarak bulundu.

4.2. Kontrol ve Hasta Grubunda TNF- α /-308 ve IL-10/ -1082 Genotip Dağılımları

- 1) Hasta ve kontrol grubunda TNF- α 'nın -308 AA/AG ve GG genotipleri ile IL-10'un -1082 GG ve AA/AG genotiplerinin dağılımları Tablo 4.2.1' de gösterildi. Bulgularımıza göre, TNF- α ve IL-10'un genotip dağılımları kontrol ve hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi.

4.3. Serumda TNF- α ve IL-10 Düzeyleri ile Genotipler Arasındaki İlişkiler

- 1) Kontrol ve hasta grubunda serumda TNF- α ve IL-10 düzeylerine ilişkin bulgular Tablo 4.3.1'de verildi. Buna göre serum TNF- α düzeylerinin hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu, buna karşılık IL-10 düzeylerinin bir değişiklik göstermediği saptandı (Şekil 4.3.1).
- 2) Genotip gruplaması yapıldığında, serumda TNF- α ve IL-10 düzeylerinin gerek kontrol ve gerekse hasta grubunda bir farklılık göstermediği bulundu (Tablo 4.3.2 ve Tablo 4.3.3).

3) Kontrol ve hasta grupları birleştirilerek genotip gruplaması yapıldığında da serumda TNF- α ve IL-10 düzeylerinin gerek kontrol ve gerekse hasta grubunda bir farklılık göstermediği bulundu (Tablo 4.3.4, Şekil 4.3.2).

4) Ailesinde RAS olan hastaların olmayanlara göre serum TNF- α düzeylerinin yüksek olduğu saptandı (Tablo 4.3.5).

4.4. Tükürükte Prooksidan-Antioksidan Denge ile İlgili Bulgular

1) Hasta grubunda tükürükte MPO aktivitesi ve MDA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı. (Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.1 ve Şekil 4.4.2).

2) Hasta grubunda tükürükte total peroksidaz ve SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı. Hasta grubunda tükürükte TAK düzeyleri ise kontrole göre düşük olarak saptandı (Tablo 4.4.2, Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4).

4.5. Tükürük protein düzeyleri, akış hızı ve prooksidan-antioksidan denge arasında ilişkiler

1) Hasta grubunda tükürük protein miktarı kontrol grubuna göre yüksek olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubunda tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı (Tablo 4.5.1)

2) Spearman sıra korelasyon analizinde hasta grubunda tükürük akış hızı ile MPO aktivitesi arasında negatif yönlü orta güçte bir bağlantı saptandı, buna karşılık kontrol grubunda anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Hasta grubunda tükürük akış hızı ile TAK arasında pozitif yönlü zayıf bir bağlantı saptandı. Kontrol grubunda ise tükürük akış hızı ile TAK arasında pozitif yönlü orta güçte bağlantı bulundu (Tablo 4.5.2)

Tablo 4.2.1: Kontrol ve hasta grubunda TNF- α ve IL-10 genotiplerinin dağılımları

Genotip	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	OR (%98 CI)	p*
TNF-α				
AA/AG	17 (16.2)	23 (25.8)	1.80 (0.89-3.64)	0.11
GG	88 (83.8)	66 (74.2)		
IL-10				
GG	7 (7.4)	2 (2.5)	0.32 (0.06-1.60)	0.18
AA/AG	87 (92.6)	77 (97.5)		

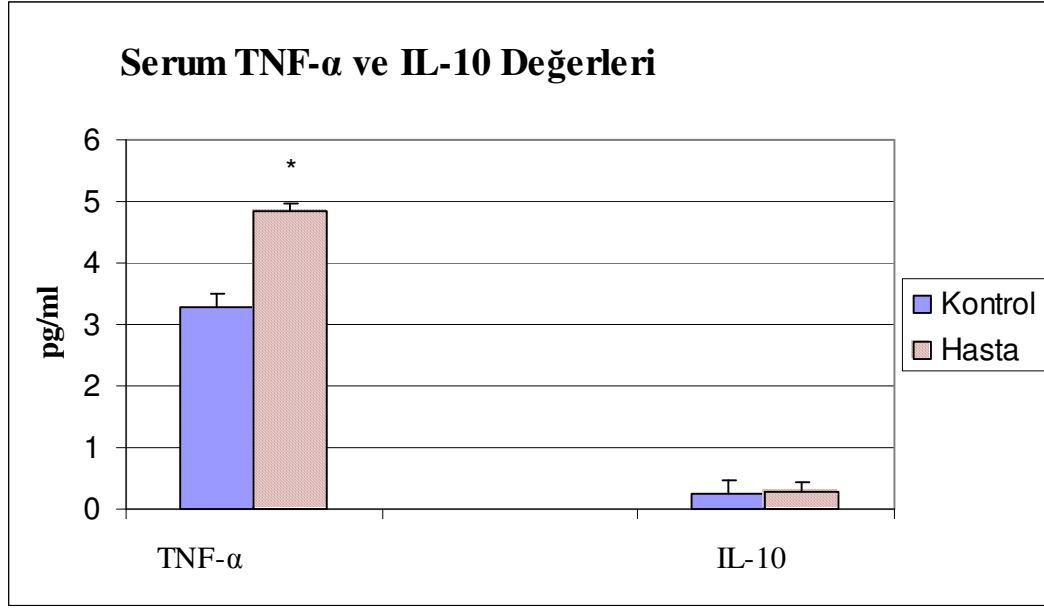
Fisher's Exact test

p*

Tablo 4.3.1: Kontrol ve hasta grubunun serumlarında TNF- α ve IL-10 düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

	Kontrol	Hasta
TNF-α (pg/ml)	3.28 $\pm$ 2.97 (n=107)	4.83 $\pm$ 3.57* (n=100)
IL-10 (pg/ml)	0.24 $\pm$ 0.77 (n= 94)	0.28 $\pm$ 0.93 (n=79)

*p<0.01



*p<0.01

Şekil 4.3.1: Kontrol ve hasta grubunda serum TNF- α ve IL-10 düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

Tablo 4.3.2: Kontrol ve hasta grubunda genotip gruplamasına göre TNF- α düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

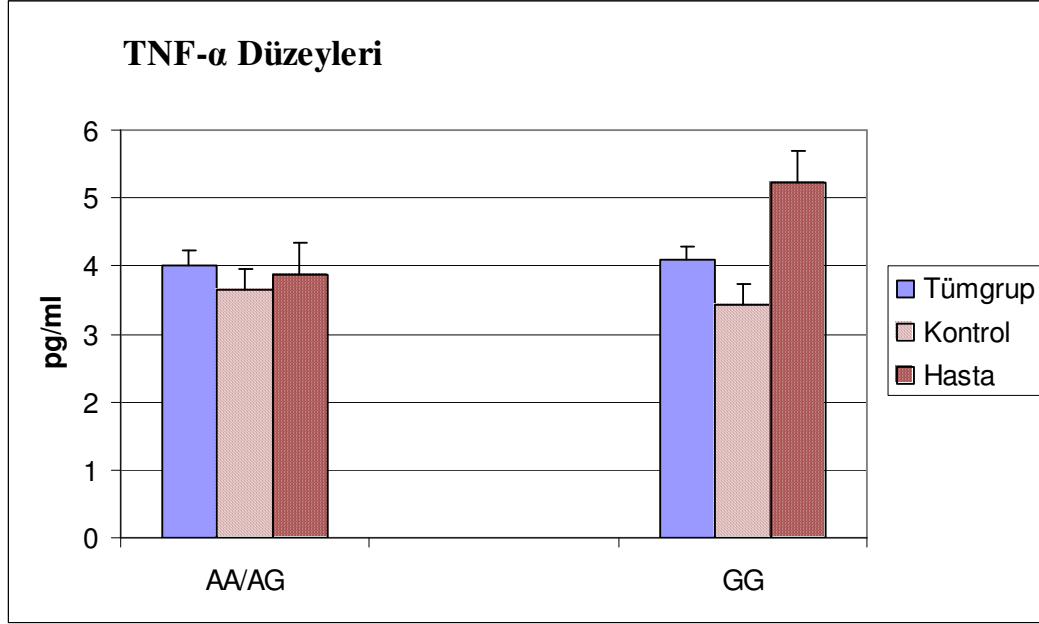
TNF- α Genotipi	Kontrol	Hasta
	TNF- α (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
AA/AG	3.65 $\pm$ 1.31 (n=17)	3.87 $\pm$ 2.88 (n=23)
GG	3.43 $\pm$ 2.97 (n=88)	5.23 $\pm$ 4.57 (n=66)

Tablo 4.3.3: Kontrol ve hasta grubunda genotip gruplamasına göre IL-10 düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

IL-10 Genotipi	Kontrol	Hasta
	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
GG	0.00 (n=7)	0.00 (n=2)
AA/AG	0.303 $\pm$ 0.852 (n=87)	0.163 $\pm$ 0.667 (n=77)

Tablo 4.3.4: Kontrol ve hasta grubu birlikte genotiplerine göre değerlendirildiğinde TNF- α ve IL-10 düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

TNF-α Genotipi	TNF-α (pg/ml)	IL-10 Genotipi	IL-10 (pg/ml)
AA/AG	4.01 $\pm$ 1.96 (n=40)	GG	0.00 (n=9)
GG	4.08 $\pm$ 2.01 (n=154)	AA/AG	0.201 $\pm$ 0.708 (n=164)



Şekil 4.3.2: TNF- α genotip gruplandırmasına göre serum TNF- α düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

Tablo 4.3.5: Ailesinde RAS hikayesi olan ve olmayan hastaların serum TNF- α düzeyleri (Ort $\pm$ SD)

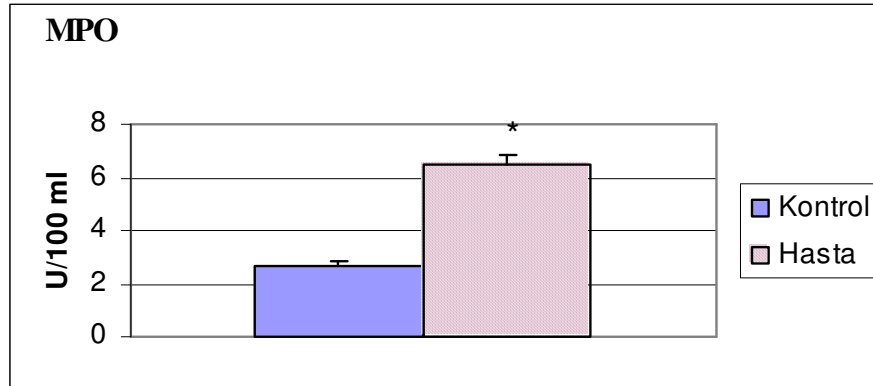
	Ailesinde RAS olan hastalar	Ailesinde RAS olmayan hastalar
TNF- α	0.31 $\pm$ 0.29*	0.24 $\pm$ 0.21
(pg/ml)	(n = 56)	(n = 46)

*p<0.05

Tablo 4.4.1: Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde myeloperoksidaz aktivitesi (MPO) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri (Ort± SD)

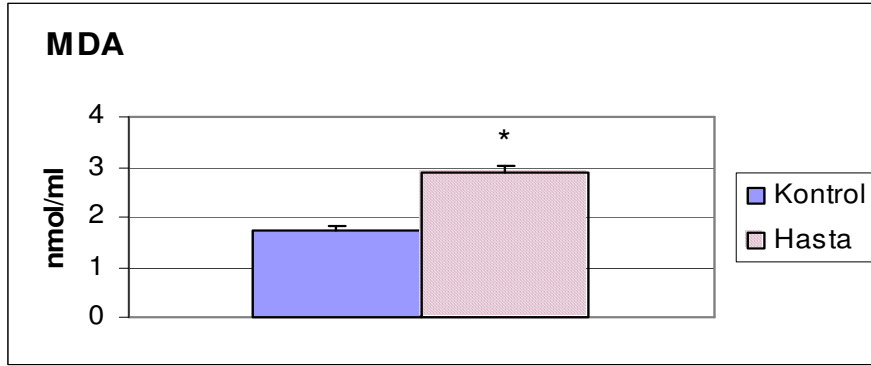
	Kontrol	Hasta
MPO (U/100ml)	2.69 ± 1.64 (n=108)	6.52 ± 3.07* (n=102)
MDA (nmol/ml)	1.73 ± 0.36 (n=108)	2.91 ± 0.44* (n=100)

* p<0.001



* p<0.001

Şekil 4.4.1: Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri (Ort± SD)



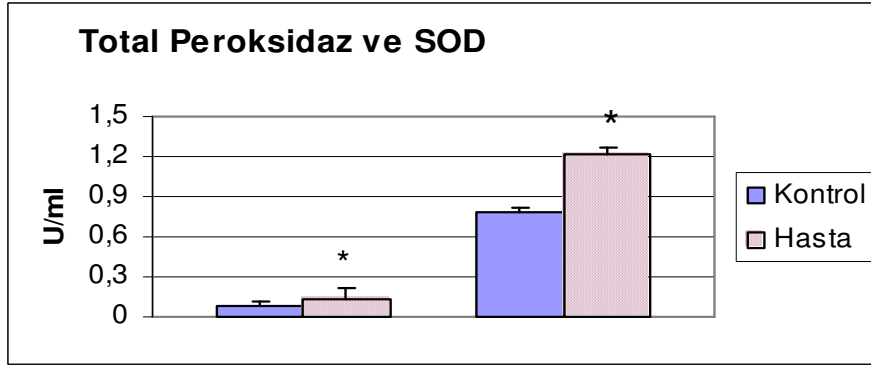
* p<0.001

Şekil 4.4.2: Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde malondialdehit (MDA) düzeyleri (Ort± SD)

Tablo 4.4.2: Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde total peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ile total antioksidan kapasite (TAK) değerleri (Ort± SD)

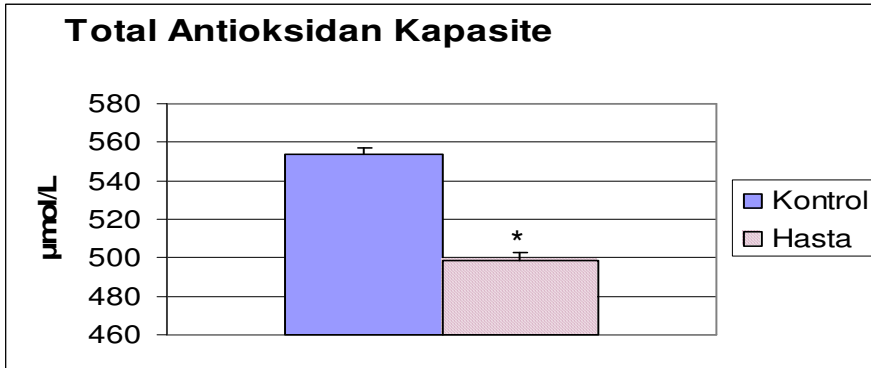
	Kontrol	Hasta
Total Peroksidaz (U/ml)	0.09 ± 0.06 (n=108)	0.13 ± 0.09* (n=101)
SOD (U/ml)	0.77 ± 0.26 (n=107)	1.22 ± 0.43* (n=102)
TAK (µmol/L)	553.3 ± 37.2 (n=108)	498.2 ± 48.0* (n=100)

* p<0.001



* $p < 0.001$

Şekil 4.4.3: Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde total peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri (Ort± SD)



* $p < 0.001$

Şekil 4.4.4: Kontrol ve hasta grubunun tükürüklerinde total antioksidan kapasite değerleri (Ort± SD)

Tablo 4.5.1: Kontrol ve hasta gruplarının tükürüklerinde protein düzeyleri ve tükürük akış hızları (Ort± SD)

	Kontrol (n=108)	Hasta (n=102)
Protein (mg/ml)	1.02 ± 0.27	1.27 ± 0.35*
Tükürük Akış Hızı (ml/dak)	0.88 ± 0.26	0.96 ± 0.45

*p<0.001

Tablo 4.5.2: Kontrol ve hasta grubunda tükürük akış hızı ile myeloperoksidaz (MPO) ve total antioksidan kapasite (TAK) arasındaki korelasyonlar

	Kontrol	Hasta
MPO	r = 0.07, AD (n=108)	r = -0.564** (n=102)
TAK	r = 0.386** (n=108)	r = 0.23* (n=100)

*p<0.05

**p<0.01

AD: Anlamlı değil

5. TARTIŞMA

RAS HASTALARINDA TNF-ALFA VE IL-10 POLİMORFİZMİ

Etyolojisi tam olarak belirlenemeyen ve oldukça yaygın olarak görülen oral inflamatuvar bir hastalık olan RAS'ın lokal ve sistemik pek çok faktör ile arasında bağlantı kurulmaya çalışılmış fakat şimdiye kadar kesin bir neden ortaya konmamıştır (71,124,106,142). Bazı araştırmacılar RAS'ın immunolojik, genetik ve mikrobiyolojik temeli olduğu yönünde görüşler ileri sürmüştür (20,49,52,85,87,114).

Hastaların %80'inde RAS lezyonlarının ilk olarak 30 yaş öncesi ve bu yaş civarında ortaya çıktığı bildirilmiştir (124). Çalışmamızda yer alan hastalarda da ilk aft görülme yaşı 30.19 ± 13.35 olarak belirlenmesi literatüre uygundur.

Bazı çalışmalar ile RAS'da immun sistemin rolü belirlenmeye çalışılsa da immunopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır . TNF- α 'nın önemli immun düzenleyici aktiviteleri nedeniyle RAS ile bu sitokin arasında kuvvetli bir ilişki olduğu düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalarda RAS hastalarının periferel kanlarında ve lezyonel mukozalarında TNF- α miktarı artmış olarak bulunmuştur (20,104,139). Çalışmamızda da hasta grubunun serum TNF- α düzeylerinin kontrole göre yüksek bulunması bu araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

RAS hastalarının en az %40'ının ailesinde de RAS hikayesi olduğu bildirilmiştir (106,124). Çalışmamızda yer alan hastaların %54.9'unun ailesinde RAS hikayesi olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda ailesinde RAS hikayesi olan hastaların serum TNF- α düzeylerinin olmayanlara göre daha yüksek olduğu da belirlenmiştir.

RAS hastalarının periferel kan ve ağız içindeki lezyonlarda artmış olan TNF- α düzeylerini bildiren çalışmalar olması bu hastalarda yüksek sitokin üretimi ile ilişkili olan genotiplerin varlığın düşündürmektedir (20,139). Bu amaçla farklı toplumlarda genetik polimorfizm çalışmaları yapılmıştır. Guimares ve ark. (52) Brezilyalılarda orta derecede TNF- α üretimi ile ilişkili olan genotipi RAS için yüksek risk olarak bildirmişlerdir. Bununla birlikte hasta ve kontrol grubunda olgu sayısının düşük olmasının yüksek TNF- α üretimine neden olan genotip ile hastalığın ilişkilendirilmesine olanak vermediğini ileri sürmüşlerdir. Guimares ve ark.'nın (53) başka bir çalışmalarında ise yine proinflamatuvar bir sitokin olan yüksek IL-1 β

üretimi ile ilişkili IL-1 β + 3954 polimorfizminin Brezilyalı RAS hastalarında daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bazrafshani ve ark. (12) beyaz ırktan olan 95 İngiliz RAS hastası ile yaptıkları çalışmada TNF- α , TNF- β ve vitamin D reseptör polimorfizmleri ile hastalık arasında bir ilişki bulamamışlardır. Başka bir çalışmalarında ise IL-1 β ve IL-6 polimorfizmleri ile RAS arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (10).

Şu ana kadar hiçbir çalışma TNF- α -308 (G/A) polimorfizmi ile RAS'i tam olarak ilişkilendirememiştir. Bununla birlikte RAS hastalarının serum ve lezyonlarında artmış TNF- α düzeyi ve endojen TNF- α inhibitörleri olan talidomid ile pentoksifillinin RAS hastalarında ağrının azalmasına ve erken iyileşmeye neden olması, TNF- α gen lokusunda olabilecek bir polimorfizmin yüksek TNF- α üretimi ile ilişkili olması ve sonuç olarak RAS hastalarında lezyonları başlatıcı faktör olabileceğini düşündürmektedir (51,126,155,165).

Çalışmamızda TNF- α -308 gen polimorfizmi ile RAS arasında bir ilişki ortaya çıkarılamamıştır. Bununla birlikte hasta grubunda yüksek TNF- α üretimi ile ilişkili AA/AG genotipleri kontrole göre % 9.6 oranında fazla ve kontrol grubunda da düşük TNF- α üretimi ile ilişkili GG genotipi hasta grubuna göre %9.6 oranında fazla olduğu belirlenmiş fakat sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.

TNF- α genetik polimorfizmi ve RAS arasında bağlantı kurulamasa da TNF- α 'nın RAS hastalığının patogeneğinde önemli rol oynadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bazı in vitro çalışmalarda TNF- α üretimi ve HLA alleleri arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür. HLA DR3, DR1, DR4 ve DR7'nin yüksek TNF- α üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (120). Bununla birlikte HLA-DR gen lokusuna yakın başka genlerin de TNF- α üretimi üzerine etkisi olabilir. Bu nedenle RAS oluşumuna neden olan genetik yatkınlıkta başka faktörlerin rol oynayabileceği ve RAS'ın oral mukozada lokalize olan bir hastalık olması nedeniyle lokal faktörlerin etkisinin daha fazla olabileceği düşünülebilir. Bunun dışında diğer çalışmalarda olduğu gibi hasta ve kontrol grubunda sayıların artırılması da TNF- α polimorfizmi ile ilgili sonucun daha anlamlı hale gelmesini sağlayabilir.

Borra ve ark. (19) RAS hastalarının aft ve kontrol mukoza örneklerinin analizinde Th1 gen bölgesinin Th2 gen bölgesine göre daha aktif olduğunu

bildirmişlerdir. Sistemik inflamatuvar yanıtta Th1 sitokinlerinden TNF- α ve Th2 sitokinlerinden IL-10 birbirine zıt yönde çalışır . TNF- α 'nın lokal ve sistemik inflamatuvar cevapların gücü, etkinliği ve süresini belirleyen geniş proinflamatuvar aktiviteleri vardır. IL-10 ise hümmoral immün cevabın harekete geçirilmesinin yanında inflamatuvar reaksiyonların sınırlandırılması ve sonlandırılmasında görev yapmaktadır. TNF- α , IL-10 üretimini indükleyerek kendi sentezini inhibe eder. RAS hastalarının lezyon olmayan normal oral mukoza keratinositlerinde IL-10 mRNA seviyesinin sağlıklı kontrollerin keratinositlerine göre daha düşük olduğu ve travma sonrası RAS hastalarında normal kişilere göre biyolojik olarak aktif IL-10 üretiminin daha az olduğu bildirilmiştir (20). Bunun sonucunda IL-10 üretiminin az olması, travma sonrası gelişen inflamatuvar cevabın baskılanmasında başarısızlığa ve oral mukozaya karşı gelişen hücre aracılı immün yanıtta değişimin artmasına neden olabilir. Çalışmamızda hasta ve kontrol serum IL-10 düzeyleri ile ilgili olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. Bununla birlikte hastalardan lezyonların başlangıç döneminde örnek alınması ve IL-10'un inflamatuvar yanıtta TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerden daha geç salınması nedeniyle serum IL-10 düzeyinde bir fark görülememiş olabilir.

TNF- α ve IL-10'un protomer bölgelerindeki tek baz değişimi ile gerçekleşen polimorfizmler sonucu bu sitokinlerin üretimi kişiler arasında farklılık göstermektedir (78,92). IL-10 -1082 G allelinin in vitro yüksek IL-10 üretimi ve -1082 A allelinin ise düşük IL-10 üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (144). RAS hastalarında IL-10 -1082 gen polimorfizmi farklı popülasyonlarda araştırılmış fakat anlamlı bir ilişki bulunamamıştır(11,52). Çalışmamızda da hasta ve kontrol grubunda yüksek veya düşük IL-10 üretimi ile ilişkili genotipler ile ilgili anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bununla birlikte araştırılan bu polimorfizmler RAS hastalarının oral mukozalarında tespit edilen IL-10'un fonksiyonel eksikliğinden sorumlu olmayabilirler. RAS hastalarında IL-10 üretimini etkileyen şimdiye kadar tanımlanmamış başka genetik polimorfizmler de söz konusu olabilir.

RAS Hastalarında Tükürük Antioksidan Sistemi

Tükürük bezleri salgıları ile oral boşluktaki homeostazın devamlılığını sağlayan önemli salgısal organlardır. Bununla birlikte tükürük, üst gastrointestinal kanal da

çeşitli zararlı etkenlere karşı korumaktadır. Tükürük peroksidazı, lizozim, laktoferrin gibi proteinler yumuşak doku onarımında yer alan önemli tükürük bileşenlerindendir (35).

Serbest radikaller, çeşitli mekanizmalar ile lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküllere hasar vermektedir. Serbest radikallerin oral mukozaya saldırısının enfeksiyondan kansere kadar geniş alanda sonuçları olduğu ileri sürülmüştür. Tükürüğün, hayvan modelinde oral kanserin başlaması ve ilerlemesini anlamlı derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (33,103). Ağızda, serbest radikaller ve ROM fizyolojik olarak PNL hücrelerinden kaynaklanır. Yetişkinlerde ağız boşluğuna yaklaşık olarak $0,5-2 \times 10^6$ PNL hücresi (1 ml tükürükte) göç etmektedir. Ağız içi inflamasyonu olan hastalarda hücre sayısı 5 kat artmaktadır. Bu koşullarda tükürükteki PNL seviyesi kandaki kadar yüksek olabilir. Tükürük hipotonik olduğu için bu hücreler hızla lizise uğrar. Bu nedenle PNL hücrelerinin sayılması yerine MPO aktivitesinin ölçümü daha avantajlıdır. MPO, elektron verici olarak klorür iyonunu kullanarak hipokloröz (HOCl) asit oluşumunu kataliz eder (157). MPO kaynaklı oksidasyon sonucu hücre ve dokularda meydana gelen hasar in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. Çok sayıda inflamatuvar hastalığın patogeneğinde bu mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir (158). Tükürükte MPO aktivitesi ölçümü oral dokudaki inflamasyon veya enfeksiyonun tespitinde ve tedavinin izlenmesinde hızlı ve objektif bir metod olabilir. MPO aktivitesi lökositlerin fagositik aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. RAS hastalarının periferik kandaki lökositlerinin normal fagositik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (147). RAS hastalarının tükürüklerinde ise PNL hücrelerinin fagositik aktivitelerinde azalma olduğu ileri sürülmüştür (93). RAS hastalarında preülseratif fazda gerçekleşen lenfositik hücre infiltrasyonu sonucu serbest radikallerin üretiminin arttığı ve yüksek oranda nötrofil süperoksit üretimi olduğu bunun sonucunda da epitel hücre hasarı meydana geldiği ileri sürülmüştür (1). Tükürük akış hızının azalmasına bağlı olarak ağız ortamında PNL hücrelerinin birikimi ve MPO aktivitesinde de artış olduğu bildirilmiştir (141). Çalışmamızda da hasta grubunda MPO aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve hasta grubunda MPO aktivitesi ile tükürük akış hızı arasında negatif yönlü ilişki saptanmıştır.

Sitokin sentezi ve ROM üretimi nötrofillerin en önemli immun düzenleyici mekanizmaları arasında yer alır. RAS hastalarının sağlıklı kontrole göre periferik

kandaki PNL hücrelerinin anlamlı derecede artmış ROM üretimi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kontrol ve RAS hastalarına ait nötrofillerin TNF- α ile inkübasyonu sonucu ROM üretiminin RAS'lılarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Aktif dönemdeki RAS hastalarının, remisyon dönemindeki hastalar ve sağlıklı kontrol ile kıyaslandığında total antioksidan seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (87). İn vitro çalışmalar ile RAS hastalarında, periferik kandaki lökositlerin epitel hücreler üzerine sitotoksik yıkımı arttırdığı da gösterilmiştir (36,139). RAS ve Behçet hastalarında IFN- γ ve TNF- α gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinleri üreten $\gamma\delta$ T hücrelerinin anlamlı derecede arttığını bildirilmiştir (49). Sağlıklı oral mukozada $\gamma\delta$ T hücrelerinin bulunması pek yaygın olmasa da RAS'lı hastaların oral lezyonlarında $\gamma\delta$ T hücrelerinin bulunduğu gözlenmiştir (105).

Tükürük antioksidan sisteminde çeşitli enzim ve moleküller yer almaktadır. Bunlardan peroksidaz enzimi ve ürik asit molekülü en önemlileridir (26). Total antioksidan aktivitenin %70'den fazlasının ürik asit tarafından sağlandığı bildirilmiştir (123). Peroksidaz, SOD, ürik asit gibi antioksidan etkili enzim ve moleküllerin, submandibular ve sublingual tükürüğe göre parotis tükürüğünde daha fazla olduğu bildirilmiştir (108). Peroksidaz enzim sistemini içeren diş macunu gibi preparatların radyoterapi yada başka nedenlerle kserostomi gelişen hastalarda kullanımının gingival inflamasyonun azalttığı bildirilmiştir (80). İnflamatuvar süreç ve serbest radikal mekanizması arasındaki ilişki hastalıkların patogenezinin aydınlatılmasında önemli olabilir. RAS hastalığının patogenezinin belirlenmesine yönelik olarak tükürük oksidan/antioksidan sistemi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu metodoloji çeşitli inflamatuvar barsak hastalıklarında da daha önce kullanılmıştır. İnflamatuvar barsak hastalığında oksidatif strese artma ve mukozanın antioksidan savunma sisteminde azalma olduğu bildirilmiştir (39). Crohn hastalarının tükürüklerinde de MDA seviyesinin arttığı, total antioksidan aktivitenin ise azaldığı belirlenmiştir (69). Bunun yanında antioksidan olarak C vitamini kullanımı ile tükürükte MDA seviyesinin azaldığı da bildirilmiştir (63).

Ağız içi inflamatuvar hastalıklardan biri olan kronik periodontitisli hastaların lezyonlarında MDA kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. SOD aktivitesinde ise bir farklılık gözlenmemiştir. Dokuda MDA'nın artışı serbest radikal hasarının göstergesi olarak yorumlanmıştır (95). Periodontitisi olan hastaların tükürüklerinde total antioksidan aktivitenin ise sağlıklı kontrole göre daha

düşük olduğu bildirilmiştir (123). Aynı şekilde ilerlemiş periodontitisi olan hastalarda da MDA seviyesinin arttığı, total antioksidan seviyesinin ise azaldığı bildirilmiştir (96). Kronik periodontitisli hastaların gingival dokularında MDA seviyesinin arttığını ve proinflamatuvar sitokin olan IL-1 β ile MDA arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (145). Diyabet hastalarında oksidatif stresin arttığı ve sonuçta diyabet komplikasyonlarının ortaya çıktığı bildirilmiştir. Tip I diyabetli hastaların tükürüklerinde total antioksidan aktivitede artış olduğu ve MDA seviyelerinde ise anlamlı bir fark bulunamadığı gözlenmiştir. Total antioksidan aktivitenin yüksek olmasının, diyabetiklerde oksidatif stresin varlığını gösterdiği ve serbest radikallere karşı hücreleri koruyarak lipid peroksidasyonunu önlediği ileri sürülmüştür. MDA'nın düşük olması ise total antioksidan aktivitenin serbest radikal hasarını önlediği şeklinde yorumlanmıştır (2). Tip I diyabetli hastaların tükürüklerinde peroksidaz aktivitesinin kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (55). Başka bir çalışmada ise Tip I diyabetli hastaların tükürüklerinde diğer antioksidan enzim olan SOD aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (15).

Vücut sıvılarının total antioksidan durumu antioksidan seviyesi ve serbest radikal üretimi ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca çevre, cinsiyet, yaş, hormonlar, yaşam biçimi ve diyetel faktörlerin de olası etkileri vardır. RAS hastalarında total antioksidan seviyesindeki azalma ve MDA seviyesindeki artış, oksidan/antioksidan sistem arasındaki dengesizliği göstermektedir. RAS hastalarındaki inflamasyonda yer alan moleküler ve hücrel araçlar oksidan/antioksidan sistemlerde dengenin bozulmasına neden olabilir (125). RAS hastalarının serum ve tükürüklerinde MDA'nın anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir. Aynı hastaların serum ve tükürüklerinde antioksidan vitaminler olan A, C ve E vitaminlerinin miktarının ise kontrole göre düşük olduğu ve serum ile tükürükteki seviyelerinin paralellik gösterdiğini bildirmiştir (121). RAS hastalarının eritrositlerinde yapılan bir çalışmada kontrole göre katalaz ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (54). Başka bir çalışmada ise RAS hastalarının eritrosit ve serumlarında MDA'nın yüksek olduğu bildirilmiştir (28). RAS hastalarının plazmalarında ise SOD ve katalaz aktiviteleri azalmış, glutatyon peroksidaz aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Aynı hastaların tükürüklerinde SOD ve katalaz aktivitesi artmış, glutatyon peroksidaz aktivitesi ise azalmış olarak tespit

edilmiştir (76). RAS hastalarının nötrofilleri ile yapılan bir çalışmada ise MPO ve SOD aktivitesi kontrole göre yüksek bulunmuştur (1). Aynı çalışmada MDA seviyesinin de kontrolden yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu durum serbest radikallerin nötrofillerde lipid peroksidasyonu oluşturduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da hasta tükürüklerinde inflamasyonun göstergesi olan MPO aktivitesi ve doku hasarı göstergesi MDA seviyelerinde artış belirlenmiştir. Bununla birlikte artan serbest radikallerin etkisiz hale getirilebilmesi için total peroksidaz ve SOD enzim aktiviteleri artarken total antioksidan aktivitenin ise azaldığı belirlenmiştir. Tükürük akışının uyarılması ile antioksidan maddelerin miktarının da arttığı bildirilmiştir (123). Çalışmamızda da hasta ve kontrol grubunda total antioksidan aktivite ve tükürük akış hızı arasında pozitif yönlü sırasıyla zayıf ve orta güçte ilişki olduğu belirlenmiştir. Deneysel olarak gingivitis oluşturulan hastaların tükürüklerinde başlangıçta peroksidaz aktivitesinin arttığı, iyileşmenin ardından ise azaldığı bildirilmiştir. Peroksidaz aktivitesinin artışı ile erken dönem lezyonlarında meydana gelen doku değişikliklerinin korelasyon gösterdiği ileri sürülmüştür (132). Bu çalışmanın sonucu ile benzer şekilde çalışmamızda da hastalardan lezyonların başlangıç döneminde tükürük örnekleri alınmış ve total peroksidaz aktivitelerinin de kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

RAS hastalarında TNF- α 'nın periferik kanda ve lezyonlarda miktarının artması, bunun yanında TNF- α antagonisti olan ilaçların RAS tedavisinde etkili olması, TNF- α 'nın hastalığın patojenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Aynı zamanda TNF- α 'nın nötrofillerde ROM üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda da hastalarda serum TNF- α düzeyinin arttığı ve tükürüklerinde de oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Altınyazar HC, Gürel A, Koca R, Armutçu F, Ünalacak M. The status oxidants and antioxidants in the neutrophils of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Turk J Med Sci* 2006; 36: 87-91.
2. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafalou S, Zamani MJ, Larijani B, Abdollahi M. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res* 2005; 36: 376-381.
3. Axell T, Henricsson V. The occurrence of recurrent aphthous ulcers in adult Swedish population. *Acta Odontol Scand* 1985;43:121-125.
4. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
5. Bachtiar EW, Cornain S, Siregar B, Raharjo TW. Decreased CD4+/CD8+ ratio in major type of recurrent aphthous ulcers:comparing major to minor types of ulcers. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1998;16:75-79.
6. Baltacıoğlu E, Akalın FA, Alver A, Balaban F, Ünsal M, Karabulut E. Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in post-menopausal women with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33 :385-392.
7. Barker PJ, Roopenian DC. Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. *Microbes Infect* 2002;4:1157-1167.
8. Baştürk B, Evke E, Tunalı A, Karakuş S. Interleukin-10 and Interferon-gamma cytokine gene polymorphisms may be risk factors for chronic myelogenous leukemia. *Turk J Haematol* 2005;22:191-196.
9. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002;29:189-194.
10. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. IL-1B and IL-6 gene polymorphisms encode significant risk for the development of recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Genes Immun* 2002 ;3:302-305.

11. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. Polymorphisms in the IL-10 and IL-12 gene cluster and risk of developing recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2003 ;9:287-291.
12. Bazrafshani MR, Hajeer AH, Ollier WE, Thornhill MH. Recurrent aphthous stomatitis and gene polymorphisms the inflammatory markers TNF-alpha, TNF-beta and the vitamin D receptor: no association detected. *Oral Dis* 2002; 8: 303-7.
13. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Mander A, Bulh R. Long-term repeatability of induced sputum cells and inflammatory markers in stable, moderately severe COPD. *Chest* 2003; 123:778-783.
14. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Meier C, Taeumer T, Buhl R. A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis correlation with plasma interleukin-5. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:475-482.
15. Belce A, Uslu E, Kucur M, Umut M, Ipbüker A, Seymen HO. Evaluation of salivary sialic acid and Cu-Zn superoxide dismutase activity in Type 1 Diabetes Mellitus. *Tohoku J Exp Med* 2000;192:219-225.
16. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzimol* 1999;299:15-27.
17. Berglundh T, Donati M, Mahn-Zorii M, Hanson L-A, Padyukov. Association of the -1087 IL-10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol* 2003;30:249-254.
18. Boras VV, Lukac J, Bralio V, Picek P, Kordic D, Zilic A. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2006;35:241-243.
19. Borra RC, Andrade PM, Silva IDCG, Morgun A, Weckx LLM, Smirnova AS, Franco M. The Th1/Th2 immune type response of recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. *J Oral Pathol Med* 2004;33:140-146.

20. Buno IJ, Huff JC, Weston WL, Cook DT, Brice SL. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor α , interleukins 2,4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 827-831
21. Burçak G., Andıcan G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004;35(4):159-169.
22. Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: Current and potential clinical applications. *Am J Med* 2000;108: 487-495.
23. Cao CF, Smith QT. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Clin Periodontol* 1989;16:17-20.
24. Celec P, Hodosy J, Celecova V, Vodrazka J, Cervanka T, Halcak L, Bozek P, Kopani M, Kudela M. Salivary thiobarbituric acid reacting substances and malondialdehyde-their relationship to reported smoking and to periodontal status described by the papillary bleeding index. *Dis Markers* 2005; 21: 133-7.
25. Çelik Y, Dağlı Ü, Kılıç MY, Törüner M, Özen SC, Özkan M, Soykan I, Çetinkaya H, Ülker A, Özden A, Bozdayı AM. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41:559-565.
26. Chapple IL. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clin Mol Pathol* 1996;49:247-255.
27. Cicek Y, Canakci V, Ozgoz M, Ertas U, Canakci E. Prevalance and handedness correlates of recurrent aphthous stomatitis in the Turkish population. *J Public Health Dent* 2004;64:151-156.
28. Cimen MYB, Kaya TI, Eskandari G, Tursen U, Ikizoglu G, Atik U. Oxidant/antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 647-650.
29. Clarkson PM., Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000;72:637-646.
30. Cowman RA, Baron SS, Obenauf SD, Byrnes JJ. Evidence for thiocyanate-sensitive peroxidase activity in human saliva. *J Clin Microbiol* 1983;18:1177-1182.

31. Crawley E, Woo P, Isenberg DA. Single nucleotide polymorphic haplotypes of interleukin-10 5' flanking region are not associated with renal disease or serology in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:2017-2018.
32. Cribier B, Marquart-Elbaz C, Lipsker D, Alt M, Grosshans E. Chronic buccal ulceration induced by nicorandil. *Br J Dermatol* 1998; 138: 372-373.
33. Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol* 1997;33:105-109.
34. Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine R. Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Invest* 2003;7:103-107.
35. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005;33: 223-233.
36. Dolby AE. Recurrent aphthous ulceration. Effect of sera and peripheral blood lymphocytes upon oral epithelial tissue culture cells. *Immunology* 1969; 17:709-714.
37. Donatsky O. Epidemiologic study on recurrent aphthous ulcerations among 512 Danish dental students. *Community Dent Oral Epidemiol* 1973;1:37-40.
38. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200-227.
39. Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis-causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:853-874.
40. Duzgun N, Ayaslioglu E, Tutkak H, Aydintug OT. Cytokine inhibitors: soluble tumor necrosis factor receptor 1 and interleukin-1 receptor antagonist in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 2005; 25: 1-5.
41. El-Chemaly S, Salathe M, Baler S, Conner GE, Forteza R. Hydrogen peroxide – scavenging properties of normal human airway secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:425-430.
42. Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 2001; 56:1371-1377.

43. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997;46:120-128.
44. Fernandez-Botran R, Sun xichun Crespo FA. Soluble cytokine receptors in biological therapy. *Exp Opin Biol Ther* 2002;2:585-605.
45. Field EA, Rotter E, Speechley JA, Tyldesley WR. Clinical and haematological assessment of children with recurrent aphthous ulceration. *Br Dent J* 1987;163:19-22.
46. Floris R, Kim Y, Babcock GT, Wever R. Optical spectrum of myeloperoxidase origin of red shift. *Eur J Biochem* 1994;222:677-685.
47. Foey A, Green P, Foxwell B, Feldmann M, Brennan F. Cytokine-stimulated T cell induce macrophage IL-10 Production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4: 64-70.
48. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, Belaiche J, Geenen V. Tumor necrosis Factor α decreases, and Interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone : Potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Met* 1999;84:2834-2839.
49. Freysdottir J, Lau SH, Fortune F. $\gamma\delta$ T cells in Behçet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 451-457.
50. Gallina G, Cumbo V, Messina P, Caruso C. HLA-A, B, C, DR, MT, and MB antigens in recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 59(4): 364-70.
51. Grinspan D, Blanco GF, Aguero S. Treatment of aphthae with thalidomide. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:1060-1064.
52. Guimaraes AL, Correia-Silva J de F, de Sa AR, Victoria JM, Diniz MG, Costa F de O, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2007 Mar;52:268-72.)

53. Guimaraes AL, de Sa AR, Victoria JM, Correia-Silva JF, Pessoa PS, Diniz MG, Gomez RS. Association of interleukin-1 β polymorphism with recurrent aphthous stomatitis in Brazilian individuals. *Oral Dis* 2006;12:580-583.
54. Gunduz K, Ozturk G, Sozment EY. Erythrocyte superoxide dismutase , catalase activities and plasma nitrite and nitrate levels in patients with Behçet disease and recurrent aphthous stomatitis. *Exp Dermatol* 2004;29:176-179.
55. Guven Y, Satman I, Dinccag N, Alptekin S. Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type-1) diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1996;23:879-881.
56. Güven Y, Ünür M, Bektas K, Uslu E, Belce A, Demirez E, C Sule. Salivary malondialdehyde levels in patients with oral leukoplakia. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 329-332.
57. Haisraeli-Shalish M, Livneh A, Katz J, Doolman R, Sela BA. Recurrent aphthous stomatitis and thiamine deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:634-636.
58. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF α Gene polymorphisms on TNF α production and disease. *Hum Immunol* 2001;62:1191-1199.
59. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signalling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:413-421.
60. Healy CM, Thornhill MH. An association between recurrent oro-genital ulceration and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:46-48.
61. Healy CM, Thornhill MH. Induction of adhesion molecule expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol Med* 1999;28:5-11.
62. Higuera V, Raya A, Rodrigo JM, Serra MA, Roma J, Romero FJ. Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1994;16:131-133.
63. Hodosy J, Celec P. Daytime of sampling, tooth-brushing and ascorbic acid influence salivary thiobarbituric acid reacting substances- a potential clinical marker of gingival status. *Dis Markers* 2005; 203-207.

64. Honma T, Saito T, Fujioka Y. Possible role of apoptotic cells of the oral epithelium in the pathogenesis of aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:379-387.
65. Huang Y, Cao S, Nagamani M, Anderson KE, Grady JJ, Lu LJW. Decreased circulating levels of tumor necrosis factor- α in postmenopausal women during consumption of soy-containing isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3956-3962.
66. Hutcheon AW, Wray D, Dagg JH, Ferguson MM, Mason DK, Lucie NP. Clinical and haematological screening in recurrent aphthae. *Postgrad Med J* 1978 ; 54:779-783.
67. Ihalin R, Loimmaranta V, Tenovuo J. Origin, structure and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys* 2006; 15:261-268.
68. Jaber L, Weinberger A, Klein T, Yaniv I, Mukamel M. Close association of HLA-B52 and HLA-B44 antigens in Israeli Arab adolescents with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(2): 184-7.
69. Jahanshahi G, Motavasel V, Rezaie A, Hashtroudi A, Daryani N, Abdollahi M. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 2004; 49:11-12.
70. Jerlich A, Tschabuschnig S, Fabjan JS, Schaur RJ. Kinetic of chlorination of monochlorodimedone by myeloperoxidase. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:33-37.
71. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter Sr. Muscosal diseases number VI recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* 2006; 12: 1-21.
72. Kalk WWI, Vissink A, Spijkervet FKL, Bootsma H, Kallenberg CGM, Amerongen AVN. Sialometry and sialochemistry: Diagnostic tools for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1110-1116.
73. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005;120: 649-661.

74. Kanehira T, Shibata K, Kashiwasaki H, Inoue N, Morita M. Comparison of antioxidant enzymes in saliva of elderly smokers and non-smokers. *Gerontology* 2006;23:38-42.
75. Kannan S. Free radical theory of autoimmunity. *Theor Biol Med Model* 2006; 3: 22-37.
76. Karıncaoglu Y, Batcioglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidant in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:7-12.
77. Keane MP, Strieter RM. The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res* 2002;3 :5-13.
78. Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2003;32:77-83.
79. Kılıç SŞ, Demirbaş T. Tekrarlayan aftöz stomatitis. *Güncel Pediatri* 2005;4:107-111.
80. Kirstila V, Lenander-Lumikari M, Söderling E, Tenovu J. Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia. *Acta Odontol Scand* 1996;54:391-397.
81. Klein I, Nagler RM, Toffler R, van Der Vliet A, Reznick AZ. Effects of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: role of hydrogen cyanide. *Free Radic Biol Med* 2003;35:1448-1452.
82. Koracevic D, Koracevic G, Djordevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 2001;54:356-361.
83. Kurtel H., Deniz M. Serbest radikaller ve inflamasyon . *Aktüel Tıp Dergisi* 2000;5:36-41.
84. Larijani B, Afshari M, Astanehi-Asghari F, Mojtahedi A, Rezaie A, Hosseinnazhad A, Heshmat R, Mohammadirad A, Abdollahi M. Effect of short-term carvedilol therapy on salivary and plasma oxidative stress parameters and plasma glucose level in type II diabetes. *Therapy* 2006; 3: 119-123.
85. Lehner T, Lavery E, Smith R, Van Der Zee R, Mizushima, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus*

- sanguis, and the coresponding antibodies in Behcet's syndrom. *Infect Immun* 1991;59:1434-1441.
86. Leigh JE, Steele C, Wormley F, Fidel PL. Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with Candida-associated denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17: 311-314.
 87. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Banasik M, Kurnatowska A, Tchorzewski H. Predominance of type 1 cytokines and decreased number of CD4⁺ CD25⁺ high T regulatory cells in peripheral blood of patients with recurrent aphthous ulcerations. *Immunol Lett* 2005;99:57-62.
 88. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Cedzyński M, Świerżko A, Lauk-Puchala B, Tchórzewski H. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:475-81.
 89. Lima V, Brito GAC, Cunha FQ, Rebouças CG, Facão BAA, Augusto RF, Souza MLP, Leitão Bt, Ribeiro RA. Effects of the tumour necrosis factor- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:210-217.
 90. Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Romano GC, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxi A, Almasio PL. IL-10 and TNF- α polymorphisms and recovery from HCV infection. *Hum Immunol* 2003;64:674-680.
 91. Liskman S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. *Clin Oral Impl Res* 2007;18:27-33.
 92. Lopez P, Gomez J, Mozo L, Gutierrez C, Suarez A. Cytokine polymorphisms influence treatment outcomes in SLE patients treated with antimalarial drugs. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:1-9.
 93. Lukac J, Mravak-Stipetic M, Knezevic M, Vrcek J, Sistig S, Ledinsky M, Kusic Z. Phagocytic functions of salivary neutrophils in oral mucous membrane diseases. *Oral Pathol Med* 2003; 32:271-274.

94. Mandel ID. Sialochemistry in disease and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 4: 321-366.
95. Marton IJ, Balla G, Hegedus C, Redi P, Szilagy Z, Karmazsin L, Kiss C. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 254-257.
96. Mashayekhi F, Agha-Hosseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005; 4(6): 46-53.
97. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
98. Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, Kim HJ, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. Cytokines: The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF- α , IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28: 935-940.
99. Mizuki N, Ohno S, Sato T, Ishihara M, Miyata S, Nakamura S, Naruse T, Mizuki H, Tsuji K, Inoko H. Microsatellite polymorphism between the tumor necrosis factor and HLA-B genes in Behcet's disease. *Hum Immunol* 1995; 43: 129-135.
100. Mobri M, Reinach PS, Kanayama A, Shimizu M, Moskovitz J, Hisatsune T, Miyamoto Y. Suppression of the TNF α -induced increase in IL-1 α expression by hypochlorite in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;45: 3190-3195.
101. Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994;21:417-425.
102. Mumcu G, Cimilli H, Sur H, Hayran O, Atalay T. Prevalence and distribution of oral lesions: a cross-sectional study in Turkey. *Oral Dis* 2005; 11:81- 87.
103. Nagler RM. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002;32:268-277.
104. Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Malmstorm M, Kontinen YT. Immunolocalization of tumor necrosis factor- α expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions (RAU). *J Oral Med* 2000; 29: 19-25.

105. Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hietanen J, Patinen P, Malmstrom M, Savilahti E, Konttinen YT. Increased density of lymphocytes bearing gamma/delta T-cell receptors in recurrent aphthous ulceration (RAU). *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29: 375-80.
106. Natah SS, Konttinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Hayrinen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: a review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:221-234.
107. Nishioka T, Maki K, Kimura M, Takahama U. Determination of salivary peroxidase activity in human mixed whole saliva. *Arch Oral Biol* 2003;48:397-400.
108. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2005;353:133-139.
109. Nolan A, McIntosh WB, Allam BF, Lamey PJ. Recurrent aphthous ulceration: vitamin B1, B2 and B6 status and response to replacement therapy. *J Oral Pathol Med* 1991;20:389-391.
110. Olson JA, Feinberg I, Silverman S Jr, Abrams D, Greenspan JS. Serum vitamin B12, folate and iron levels in recurrent aphthous ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54:517-520.
111. Ozbakir F, Yazici H, Mat C, Yurdakul S, Yilmazer S. HLA antigens in recurrent oral ulceration: evidence against a common disease spectrum with Behcet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5(3): 263-265.
112. Papadakis KA, Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:303-313.
113. Parlak AH, Koybasi S, Yavuz T, Yesildal N, Anul H, Aydogan I, Cetinkaya R, Kavak A. Prevalance of oral lesions in 13- to 16-year-old students in Duzce, Turkey. *Oral Dis* 2006;12:553-558.
114. Pedersen A, Ryder LP. Gamma delta T cell fraction of peripheral blood is increased in recurrent aphthous ulceration. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72: 98-104.

115. Pham CG, Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Oxygen JNKs: Phosphatases overdose on ROS. *Dev Cell* 2005;8:452-454.
116. Porter SR, Hegarty A, Kaliakatsou F, Hodgson TA, Sculley C. Recurrent Aphthous stomatitis. *Clin Dermatol* 2000; 18:569-578.
117. Poulter LW, Lehner T. Immunohistology of oral lesions from patients with recurrent oral ulcers and Behcet's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1989;78:189-195.
118. Pruitt KM, Kamau DN, Miller K, Mansson Rhamtulla B, Rahemtulla F. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase and human myeloperoxidase. *Anal Biochem* 1990;191:278-286.
119. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2006;51:640-648.
120. Ruuls SR, Sedgwick D. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: Lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet* 1999;65:294-301.
121. Saral Y, Coskun KB, Oztürk P, Karatas F, Ayar A. Assessment of salivary and serum antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with recurrent aphthous ulceration. *Tohoku J Exp Med* 2005;206:305-312.
122. Savage NW, Seymour GJ, Kruger BJ. Expression of class I and II major histocompatibility complex antigens on epithelial cells in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol* 1986;15:191-195.
123. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002;61:137-143.
124. Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. *J Am Dent Assoc* 2003; 134(2): 200-207.
125. Sepici-Dincel A, Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Kaymak-Karatas G, Onder M, Simsek B. The association between total antioxidant status and oxidative stress Behçet's disease. *Rheumatol Int* 2006;26:1005-1009.

126. Shetty A, Forbes A. Pharmacogenomics of response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with Crohn's Disease. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:215-221.
127. Shohat-Zabarski R, Kalderon S, Klein T, Weinberger A. Close association of HLA-B51 in persons with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992 ; 74: 455-458.
128. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F. The prevalence of oral mucosal lesions in U.S. adults. *JADA* 2004;135:1279-1286.
129. Shulman JD. An exploration of point, annual, and lifetime prevalence in characterizing recurrent aphthous stomatitis in USA children and youths. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:558-566.
130. Sistig S, Cekic-Arambasin A, Rabatic S, Vucicavic- Boran V, Kleinheinz J, Piffko J. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2001; 30: 275-80.
131. Slimaman DM, Twingg HL. Cigarette smoking decreases bioactive interleukin-6 secretion by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1992; 263 471-8.
132. Smith AJ, Smith G, Basu MK, Walsh TF. Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 1984;11:373-378.
133. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto NM, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150: 76-85.
134. Smith QT, Yang CH. Salivary myeloperoxidase of young adult humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984;175:468-475.
135. Spleettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative Stress in Phagocytes-“ The enemy Within”. *Microsc Res Tech* 2002;57:441-455.
136. Stojanov S, Hoffmann F, Kery A, Renner ED, Hartl D, Lohse P, Huss K, Fraunberger P, Malley JD, Zellerer S, Albert MH, Belohradsky BH. Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 90-97.

137. Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Chiang CP. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes upregulated by the plasma level of interleukin-2 patients with recurrent aphthous ulcers. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 2000; 24:116-122.
138. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
139. Taylor LJ, Bagg J, Walker DM, Peters TJ. Increased production of tumour necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 1992;21:21-25.
140. Thomas EL, Fishman M. Oxidation of chloride and thiocyanate by isolated leukocytes. *J Biol Chem* 1986;261:9694-9702.
141. Thomas EL, Jefferson MM, Joyner RE, Cook GS, King CC. Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: Identification and quantitation in human mixed saliva. *J Dent Res* 1994; 73:544-555.
142. Tillis A. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis. *JADA* 2003;134:200-207.
143. Torras H, Lecha M, Mascaro JM. Thalidomide treatment of recurrent necrotic giant mucocutaneous aphthae and aphthosis. *Arch Dermatol* 1982;118:875.
144. Turner DM, Williams DM, Sankaran D. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1-8.
145. Tuter G, Kurtis B, Serdar M. Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2001;72(7): 883-888.
146. Tüzün B, Wolf R, Tüzün Y, Serdaroğlu S. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. *Int J Dermatol* 2000;39:358-360.
147. Ueta E, Umazume M, Yamamoto T, Osali T. Leukocyte dysfunction in oral mucous membrane diseases. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(3): 120-125.
148. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-341.

149. Vastardis S, Leigh JE, Wozniak K, Yukna R, Fidel PL. Influence of periodontal disease on Th1/Th2-type cytokines in saliva of HIV-positive individuals. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 88-91.
150. Vieira P, Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, DeVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:1172-1176.
151. Vučićević Boras V, Lukač J, Brailo V, Picek P, Kordić D, Alajbeg Žilić. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:241-3
152. Vural P, Akgul C, Canbaz M. Effects of hormone replacement therapy on plasma pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and some bone turnover markers in postmenopausal women. *Pharmacol Res* 2006;54:298-302.
153. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522-2526.
154. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:1912-1913.
155. Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumour necrosis factor- α in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm.* 1995;45(1):1-12.
156. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α protomer on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3195-3199.
157. Winterbourn CC, Garcia RC, Segal AW. Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase by stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride. *Biochem J* 1985;228:583-592.

158. Winterburn CC, Vissers MCM, Kettle AJ. Myeloperoxidase . Curr Opin Hematol 2000;7:53-58.
159. Wolf LH, Smith QT, Snyder WK, Bedrick JA, Liljemark WF, Aepli DA, Bandt CL. Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurement. J Clin Periodontol 1988;15:110-115.
160. Wozniak KL, Arribas A, Leigh JE, Fdel PL. Inhibitory effects of whole and parotid saliva on immunomodulators. Oral Microbiol Immunol 2002;17:100-107.
161. Wray D, Ferguson MM, Mason DK, Hutcheon AW, Dagg JH. Recurrent aphthae: treatment with vitamin B12, folic acid and iron. Br Med J 1975; 2:490-493.
162. Wray D, Graykowski E, Notkins AL. Role of mucosal injury in initiating recurrent aphthous stomatitis. Br Med J 1981; 283: 1569-1570.
163. Yakut T. HLA doku uygunluk kompleksi, Genetik lokalizasyonları ve fonksiyonları. Güncel Pediatri 2004;2:53-57.
164. Yousefzadeh G, Larijani B, Mohammdirah A, Heshmat R, Dehghan G, Rahimi R, Abdollahi M. Determination of oxidative stress status and concentration of TGF- β 1 in the blood and saliva of osteoporotic subjects. Ann NY Acad Sci 2006;1091:142- 150.
165. Zabel P, Ulrich-Shade F, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF- α formation by pentoxifylline. Immunobiology 1993; 187: 447-463.

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şule	Soyadı	Can Troşala
Doğ.Yeri	Edirne	Doğ.Tar.	22.03.1973
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	13589068224
Email	sulecan@istanbul.edu.tr	Tel	02124142020/30220

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya ABD	2000
Lisans	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	1995
Lise	Çamlıca Kız Lisesi	1990

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	53.115	56.063	59.010
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word ve Exel	iyi

