

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE MİF-173 G/C POLİMORFİZMİ İLE
DİŞETİ DOKUSUNDAKİ MİF EKSPRESYONUNUN
SAPTANMASI:CERRAHİSİZ PERİODONTAL TEDAVİYE EK OLARAK
KULLANILAN AZİTROMİSİNİN DOS MİF DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Periodontoloji Anabilim Dalı Dişhekimliği Programı

DOKTORA TEZİ

Diş Hekimi
Dt. Buket (HAN) SAYĞAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Haluk BAYLAS

İZMİR-2009

ÖNSÖZ

Periodontitis mikroorganizmalar ile konak savunması arasındaki dengenin mikroorganizmalar lehine değişmesi sonucunda ortaya çıkan enflamatuvar bir hastalıktır. Bakteriler hastalığın başlamasında gerekli koşülken, hastalığın ilerleme hızında ve şiddetinde dolaylı etki göstermektedirler. Periodontitis çok faktörlü bir hastalık olup, patogenezinde çevresel ve genetik faktörlerin rol aldığı kabul edilmektedir. Periodontitisin patogenezinin aydınlatılmasının, hastalığın tanı ve tedavisinde alternatif yaklaşımlar sağlayabileceği görüşünden hareketle, MİF-173 G/C polimorfizmi ile periodontitis arasında ilişkinin araştırılmasını planladık.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü' ne içtenlikle teşekkür ederim.

Doktora tezimin planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen doktora danışmanım Prof. Dr. Haluk BAYLAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Sayın Gül ATİLLA'ya, araştırmanın her aşamasında yanımda olan Prof. Dr. Gülnur EMİNGİL'e, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Sacide PEHLİVAN'a, Prof. Dr. Afig BERDELİ'ye, Doç. Dr. Güray SAYDAM'a, Araş.Gör. Layka ABBASİ ASBAGH'a, Araş.Gör. Can KILINÇASLAN'a, Biyolog Kadriye GÜLER'e, çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Yrd. Doç. Dr. sayın Timur Köse'ye ve istatistiksel değerlendirmelerde beni aydınlatan Prof. Dr. Sayın Saim KENDİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Periodontoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarına en içten dileklerle teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, Şaban HAN'a, Sadiye HAN'a, Demet Han Özok' a ve Gamze Göbekli' ye ve bana sabırla her zaman yardımcı olan, destek ve moral veren sevgili eşim Serkan SAYĞAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

İzmir,2009

Dt. Buket SAYĞAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ŞEKİL DİZİNİ	VII
TABLO DİZİNİ	VIII
GRAFİK DİZİNİ	XI
KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ	XII
BÖLÜM I	
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
1.1. Sağlıklı Periodonsiyum	3
1.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi	4
1.3. Konak cevabında Makrofaj Migrasyonunu İnhibe Eden Faktörün Yeri	9
1.3.1. MİF Gen ve Proteininin Yapısı	9
1.3.2. MİF Ekspresyonu	11
1.3.3. MİF'in Hormon Görevi	12
1.3.4. MİF'in Sitokin Görevi	12
1.3.4.1. MİF ve ERK1/ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)	13
1.3.4.2. MİF ve Toll-like reseptör4 (TLR-4)	14
1.3.4.3. MİF ve Tümör Baskılayıcı Gen Ürünü (p53)	15
1.3.4.4. MİF ve JUN-activation domain-binding protein-1 (JAB-1)	16
1.3.5. MİF ve Enflamasyon	16
1.3.6. MİF ve Kazanılmış Bağışıklık	18
1.3.7. MİF ve Kronik Enflamatuvar/Otoimmün Hastalıklardaki Etkisi	19
1.3.7.1. MİF ve Romatoid Artrit	20
1.3.7.2. MİF ve Aterosklerozis	20
1.3.7.3. MİF ve Enflamatuvar Akciğer Hastalıkları	21
1.4. Periodontal Hastalıklarda Genetik Polimorfizmlerin Rolü	22
1.4.1. Periodontitis ile Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi	23
1.4.2. MİF Geni Polimorfizmi ile AgP ve KP İlişkisi	25
1.5. Periodontitislerin Cerrahisiz Periodontal Tedavisi	28

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM	35
2.1. Hasta Seçimi	35
2.2. Periodontal Durumun Saptanması	37
2.3. Periferik Kan Örneklerinin Toplanması	37
2.4. Dokudaki MİF mRNA düzeylerinin Real-Time PCR yöntemi ile değerlendirilmesi amacıyla doku örneklerinin toplanması	37
2.5. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinde ELİSA Yöntemi ile MİF Protein Düzeylerinin Saptanması	38
2.6. Çalışmanın Özellikleri	38
2.7. Cerrahisiz Periodontal Tedavinin Uygulanması	39
2.8. MİF Genotipinin Saptanması	40
2.8.1. Gerekli Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	40
2.8.1.1. DNA Amplifikasyonu ve Kontrolü	41
2.8.1.2. Enzim Kesimi ve Değerlendirilmesi	43
2.8.2. DNA İzolasyonu	43
2.9. RFLP-PCR yöntemi ile MİF -173 G/C Genotiplenmesi	44
2.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
2.9.2. Amplifikasyon analizi	45
2.9.3. Enzim Kesimi	45
2.10. MİF cDNA Elde Edilmesi	46
2.10.1. Qiagen RNeasy Mini Kit Protokolü	46
2.10.2. cDNA elde edilmesi	47
2.11. Real Time-PCR ile MİF mRNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi	48
2.12. ELİSA Yöntemi ile DOS MİF Protein Düzeylerinin Saptanması	49
2.13. RFLP-PCR ve RT-PCR Analizlerinde Kullanılan Gereçler	51
2.13.1. Laboratuvar Aletleri	51
2.13.2. RFLP-PCR ve RT-PCR Yöntemlerin Kullanılan Kitler	54
2.14. ELİSA Analizleri için Kullanılan Gereçler	56
2.14.1. Laboratuvar Cihazları	56
2.14.2. ELİSA Yönteminde Kullanılan Kitler	57
2.15. İstatistiksel Yöntemler	57

BÖLÜM III

BULGULAR	59
3.1. Demografik Özellikler	59
3.2. Klinik Periodontal Bulgular	60
3.3. Moleküler Genetik Bulgular	60
3.3.1. MİF Gen -173 G/C Polimorfizmi	60
3.3.2. Şiddetli KP ve AgP Hastalarının Polimorfik Tipine Gören Klinik Periodontal Parametreler	62
3.3.3. Şiddetli KP ve AgP'ye yatkınlık ile MİF-173 Polimorfik Genotiplerinin İlişkisi	63
3.4. Şiddetli KP ve AgP Hastaları ile Kontrol Gruplarının DOS MİF Seviyeleri ve DOS MİF Seviyeleri ile Genotip İlişkisi	64
3.5. Şiddetli KP ve AgP Hastaları ile Kontrol Gruplarının Polimorfik Tipine Göre Dişeti Dokusu MİF mRNA Düzeyleri	68
3.6. Cerrahisiz Periodontal Tedaviye Yardımcı olarak Uygulanan Antimikrobiyal Tedavinin Sonuçlarına MİF Genotiplerinin Etkileri	71

BÖLÜM IV

TARTIŞMA	91
-----------------	----

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER	99
--------------------------	----

BÖLÜM VI

ÖZET	101
-------------	-----

ABSTRACT	102
-----------------	-----

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR	103
------------------	-----

ÖZGEÇMİŞ	120
-----------------	-----

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Periodontitisin Patogenezi	7
Şekil 2: TLR-4' ün aktive ettiği sinyal yolları	8
Şekil 3: İnsan MİF geni	10
Şekil 4: MİF'in CD74 reseptörü ve endositoz yoluyla hücre içi aktivasyonu	13
Şekil 5: ERK1/2 yoluyla fosfolipaz A2 fosforilizasyonu-aktivasyonu ve PGE ₂ üretimi	14
Şekil 6: MİF'in TLR-4 üzerine etkisi	15
Şekil 7: MİF'in glukokortikoidler üzerine etkisi	17
Şekil 8: MİF'in glikokortikoidler üzerine etkisi	18
Şekil 9: MİF'in T hücreleri üzerine olan etkisi	18
Şekil 10: MİF'in polimorfizm bölgeleri	25
Şekil 11: Antibiyotiğin görünümü	39
Şekil 12: Plasebonun görünümü	39
Şekil 13: Çalışma izlem şeması	40
Şekil 14: MİF genine ait PCR-RFLP sonuçları	46

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 1:	MİF'in rol aldığı hastalıklar	19
Tablo 2:	MİF polimorfizmi ile çeşitli enflamatuvar hastalıklar arasındaki ilişki	26
Tablo 3:	Azitromisin' in periodontitis üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar.	33
Tablo 4:	Amplifikasyon Karışım Oranları	44
Tablo 5:	PCR işlemleri için uygulanan program	45
Tablo 6:	Reverse transkripsiyon reaksiyon içeriği	47
Tablo 7:	Şiddetli KP ve Şiddetli AgP ile kontrol gruplarının demografik özellikleri	59
Tablo 8:	Şiddetli KP, AgP ve kontrol gruplarının klinik periodontal parametreleri	60
Tablo 9:	MİF -173G/C genotip dağılımı ve allel sıklığı	61
Tablo 10:	Cinsiyete göre MİF -173G/C genotip dağılımları	62
Tablo 11:	MİF -173C allel taşıyıcı (GC ve CC) ve GG genotip gruplarının klinik periodontal parametreleri	62
Tablo 12:	Şiddetli KP ile ilişkisi incelenen tüm değişkenlerin tek başlarına olan (crude) <i>odds ratio</i> değerleri	63
Tablo 13:	Şiddetli AgP ile ilişkisi incelenen tüm değişkenlerin tek başlarına olan (crude) <i>odds ratio</i> değerleri	64
Tablo 14:	DOS örnekleri alınan bireylerin demografik özellikleri	65
Tablo 15:	DOS örnekleri alınan bireylerin DOS düzeyleri ve klinik periodontal parametreleri	65
Tablo 16:	DOS örnekleri alınan bireylerin MİF total protein miktarları	66
Tablo 17:	DOS alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımı ve allel sıklığı	66

Tablo 18:	DOS alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımlarına göre başlangıç klinik periodontal parametreleri ve DOS hacimleri	67
Tablo 19:	DOS alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımlarına göre başlangıç DOS MİF protein miktarları	67
Tablo 20:	Dişeti dokusu alınan hastaların demografik özellikleri	68
Tablo 21:	Dişeti dokusu alınan hastaların genotip dağılımları ve allel sıklıkları	69
Tablo 22:	Dişeti dokusu alınan hastaların Rölatif MİF mRNA ekspresyon düzeyi ve klinik periodontal parametreleri	69
Tablo 23:	Dişeti dokusu alınan hastaların Rölatif MİF mRNA ve DOS MİF protein düzeyleri	70
Tablo 24:	Şiddetli AgP hastalarında Rölatif MİF mRNA ve DOS MİF protein sevipleri ile klinik periodontal parametreler arasındaki korelasyon	71
Tablo 25:	Şiddetli KP hastalarında MİF rölatif mRNA ve DOS MİF protein sevipleri ile klinik periodontal parametreler arasındaki korelasyon	71
Tablo 26:	Periodontal tedavi uygulanan hastaların demografik özellikleri	72
Tablo 27:	Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların klinik periodontal parametreler üzerine etkisi	75
Tablo 28:	Şiddetli AgP ve KP hastalarının ilaç ve plasebo gruplarının klinik periodontal parametrelerinin 1.,3. ve 6. ay değerlerinin başlangıca göre farklılıkları	76
Tablo 29:	MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip AgP ve KP hastalarının başlangıç, 1.ay, 3. ay ve 6. ay klinik periodontal parametreleri	80

Tablo 30:	MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotiplerinin klinik periodontal parametrelerinin dönem ortalamaları ile başlangıçları arasındaki farklar üzerine etkisi	82
Tablo 31:	Şiddetli AgP hastalarında cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların DOS MİF protein seviyeleri üzerine etkisi	85
Tablo 32:	Şiddetli KP hastalarında cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların DOS MİF protein seviyeleri üzerine etkisi	86
Tablo 33:	MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip AgP hastalarının başlangıç, tedavi sonrası, 2. hafta, 1.ay, 3. ay ve 6. ay DOS MİF protein seviyeleri	87
Tablo 34:	MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip KP hastalarının başlangıç, tedavi sonrası, 2. hafta, 1.ay, 3. ay ve 6. ay DOS MİF protein seviyeleri	88
Tablo 35:	Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçlar ve MİF-173 GG ile GG ve CC genotiplerinin DOS hacmi üzerine etkisi	89
Tablo 36 :	Şiddetli AgP ve KP hastalarının başlangıç ve takip dönemlerindeki DOS MİF Protein düzeylerinin karşılaştırılması	90

Grafik Dizini

Grafik 1: Sağlıklı kontrol grubuna göre şiddetli AgP ve KP gruplarının
Rölatif MİF mRNA ekspresyonu 69

KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ

A.a	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	KP	Kronik periodontitis
AP1	<i>activator protein-1</i>	LPS	Lipopolisakkarit
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>	LTA	<i>lymphotoxin-alpha</i>
ACTH	adrenokortikotropin	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
AgP	Agresif periodontitis	MHC-II	<i>major histocompatibility complex class II</i>
CARD15	<i>caspase recruitment domain 15</i>	MIP	<i>macrophage infectivity potentiator protein</i>
CD14	<i>Monocyte differentiation antigen</i>	MKP-1	MAPK fosfanaz-1
COX2	Siklooksigenaz-2	MMP	matrismetaloproteinaz
cPLA2	Sitosolik fosfolipazA2	NF-κB	nuclear factor-κB
DDD	Düşük doz doksisisiklin	NO	Nitrik oksit
DDT	<i>p-dopachrome tautomerase</i>	p53	Tümör Baskılayıcı Gen Ürünü
DHA	Dev hücreli artrit	PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
ECAM	<i>endothelial cell adhesion molecule</i>	PGE2	Prostaglandin E2
ECM	Ekstrasellüler matriks	PKA	protein kinaz A
eNOS	<i>endothelial nitric-oxide synthase</i>	RA	Romatoid artrit
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	RAGE	<i>receptor for advanced glycation end-products</i>
FcG	Fc gamma reseptör	RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
fMLP	<i>N-formyl peptide receptor</i>	RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Gr(-)	Gram (-)	RPL	<i>Ribosomal protein L</i>
Gr(+)	Gram (+)	SPEA	streptococcal pirojenik ekzotoksin A
HLA	Human Lökosit Antijen	TGFB	trasforme edici büyüme faktörü- β
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>	TLR4	Toll-like reseptör-4
IFNG	Interferon gamma	TNF	Tümör nekroz faktör
IL-1	İnterlökin-1	TSST-1	toksik şok sendrom toksin-1
IL-10	İnterlökin-10		
IL-12	İnterlökin-12		
IL-17	İnterlökin-17		
IL-6	İnterlökin-6		
IL-8	İnterlökin-8		

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Periodontitis; mikrobiyal dental plak ürünleri ile konak savunma mekanizmaları arasındaki dengenin konak aleyhine bozulması sonucu başlayan ve ilerleyen kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Yoğun enflamatuvar hücre birikimi, bağ dokusu yıkımı, periodontal cep oluşumu ve alveoler kemik rezorpsiyonu ile karakterizedir (113).

Enflamatuvar özelliğe sahip periodontitiste; bakteriler, hastalığın başlamasında en önemli role sahip iken, periodontal dokuların yıkımında dolaylı rol almaktadırlar. Antijenler ve çeşitli virulans faktörlerine sahip olan bakteriler konak savunmasını harekete geçirerek enflamatuvar ve immun yanıtın oluşmasını sağlarlar. Bu durumda konak savunması kinin ve kompleman sistem aktivasyonunu ve çeşitli sitokinlerin salgılanmasını neden olur (113). Enflamatuvar ve immun sistem içerisinde fizyolojik durumlarda koruma ve savunma amacı ile üretilen bu enflamatuvar medyatörlerin aşırı üretimi bağ dokusunda ve alveol kemiğinde yıkıma neden olmaktadır (113). Enflamatuvar ve immun cevabın erken safhalarında görev alan makrofaj migrasyonunu inhibe eden faktör (MIF) adı verilen proenflamatuvar sitokinin de çeşitli enflamatuvar medyatörlerin uyarılmasındaki etkin rolünden dolayı periodontitisin patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (104).

Mikrobiyal dental plak içerisinde yer alan bakteriler periodontal hastalıkların başlamasında gerekli ancak yetersiz koşuldur. Mikrobiyal dental plağın varlığında periodontitisin bir formunu diğer formundan ayıran, şiddetini, yaygınlığını ve dağılımını etkileyen risk faktörlerinin varlığı kabul görmektedir. Bunlar genetik, çevresel veya kazanılmış risk faktörleri olarak değerlendirilebilir (75). Periodontitisin patogenezinde etkili olduğu düşünülen enzim ve sitokinlerin polimorfizmleri ile periodontitis arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Çünkü periodontal hastalıkların tipi, şiddeti ve dağılımına bağlı değişikliklerin genetik yatkınlığa bağlı olduğu ve saptanabildiği görüşü gün geçtikçe daha fazla benimsenmektedir (154). Bu araştırmalar dikkate alındığında, periodontitis için yüksek risk taşıyan kişilerin hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir (154).

Enflamatuvar ve immun süreçte görev alan MİF'in -173 G/C gen polimorfizmi ile diğer bir enflamatuvar hastalık olan romatoid artrit arasındaki ilişkiyi gösteren birçok çalışma mevcuttur (17,45,46,154,165). Romatoid artritin dışında ülseratis kolitis (107), akut pankreatitis (92), Psoriasis (47) gibi daha birçok enflamatuvar hastalık grubu ile MİF polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Literatürde şu ana kadar periodontitis ile MİF polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı ; MİF -173 G/C polimorfizmlerin şiddetli agresif ve kronik periodontitis ile olan muhtemel ilişkisini incelenmesi, dişeti dokusunda MİF'e ait mRNA ekspresyonunun ve dişeti oluğu sıvısında protein miktarının düzeylerinin saptanması ile genotip-fenotip arasındaki ilişkinin belirlenmesi, cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanılan azitromisin grubu antibiyotik uygulamasına verilen yanıtın genotipe göre değişip değişmediğine, ayrıca genotip farklılığının ve uygulanan tedavinin dişeti oluğu sıvısı (DOS) MİF seviyeleri üzerine olan etkisinin belirlenmesidir.

GENEL BİLGİLER

1.1. Sağlıklı Periodonsiyum

Periodonsiyum; kök sementi, periodontal ligament, dişi çevreleyen alveol kemiği ve komşu dişetinden oluşan dokular bütünüdür. Periodonsiyumun temel görevi dişi alveol kemik içerisinde tutmaktır. Bunun yanında çiğneme kuvvetlerinin çene kemiğine iletilmesini sağlar ve her türlü dış etkene karşı koruyucu bariyer görevi görür.

Periodonsiyumu oluşturan dokulardan biri olan dişeti epiteli; ağız epiteli, sulkuler epitel ve bağlantı epiteli olmak üzere üç bölüme ayrılır. Dişeti epitelinin daha derin bölgesinde ise bağ dokusu yer almaktadır.

Dişeti epiteli, periodontal dokuları ağız ortamından ayırmasıyla önemli bir görev üstlenmektedir. Epitel dokusunun bariyer görevi görmesinin yanında, hızlı turn-over'ı ve epitel hücrelerinin deskuamasyonu ile bakteri kolonizasyonunu engellenmektedir. Ayrıca epitel dokusu, içerisindeki fagositlerin ve diğer savunma hücrelerinin uyarılmasını sağlayarak bakterilerin derin dokulara penetrasyonunu önlemiş olur (152). Bu durumda epitel hem koruyucu hem de uyarıcı özelliğe sahiptir. Epitele ait tüm bu özellikler, dokuyu meydana getiren keratinositler tarafından sağlanmaktadır. Bakteri kolonizasyonu keratinositlerin deskuamasyonu ile engellenmektedir. Buna ek olarak keratinositler bakteri ve ürünlerinin uyarılarına, çeşitli proenflamatuvar medyatörler ve sitokinleri uyararak cevap verirler (77,149). Bu durumda bakteriler, çeşitli enflamatuvar medyatörleri salgılayacak olan keratinositlerin aktivasyonuna neden olurlar. Bu uyarının subepitelyal küçük damarlara iletilmesi ile erken dönem enflamatuvar reaksiyonun başlayabileceği düşünülmektedir (52).

Bağlantı epiteli, dişeti sulkusunun apikalinde yer alan oldukça yüksek yenilenme kapasitesine sahip bir dokudur. Bir filtre olarak da kabul edilebilecek bu doku, altındaki bağ dokusundan gelen hücreler, bunların ortama bıraktığı maddeler ve dişeti oluşu sıvısı ile birlikte mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturur.

Epitelin altında bulunan bağ dokusu periodonsiyumun kalbi olarak da kabul edilebilir. Çünkü başta dişeti epiteli olmak üzere çevre dokuların beslenmesinde ve

bütünlüğünün korunmasında temel öge olarak kabul edilmektedir. Bağ dokusu hem damar hem de sinir desteği bakımından oldukça zengin bir yapıya sahiptir.

Bağ dokusunun hücresel içeriğinin büyük bir bölümünü fibroblastlar meydana getirmektedir. Bu hücreler bağ dokusunun oluşumunda, devamlılığında ve tamirinde görev almaktadırlar. Bunun yanında fibroblastlar hücreler arasındaki boşlukları dolduran ekstraselüler matrisi (ECM) sentezler. ECM hücreler arasındaki su, elektrolit, besin ve metabolit iletimini sağlar. Bu matris kollagen ve elastin fibrillerden, ve fibriler olmayan proteoglikanlardan (versikan, dekorin, biglikan, perlekan, sindekan, CD-44), glikoproteinlerden (integrin β ailesi ve hücreler arası adezyon molekülleri), lipid, mineral, su ve büyüme faktörlerinden oluşmaktadır (11). Bağ dokusunun görevlerinden biri kök yüzeyini ve alveol kemiğini ağız ortamından izole etmektir. Buna ek olarak dişin alveol yuvası içinde tutulmasını ve dişin çevresindeki epitelin tüm ihtiyaçlarının karşılanmasını sağlamaktır. Destekleyici görevlerinin yanında bağ dokusunun bir de koruyucu özelliği bulunmaktadır. Uyarılar sonucunda başlayan konak cevabının merkezi olarak görev yapar. Ancak bazı durumlarda oluşturulan konak cevabı koruyucu olmaktan çok yıkıcı özellik göstermektedir. Tam sağlıklı dokuda oluşan yıkım doku tamiri ile dengelenmektedir. Ancak periodontitis gibi hastalıklarda bu dengenin sağlanamaması ve tamirden daha çok yıkım meydana gelmesi nedeniyle dokuların bütünlüğünün bozulduğu ve fonksiyonlarını yitirdikleri kabul edilmektedir (12).

1.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi

Periodontal hastalıklar, dişeti oluşu içerisinde yerleşmiş olan mikrobiyal dental plağın neden olduğu enfeksiyöz, ortaya çıkan cevap ile enflamatuvar özellikler gösteren hastalıklardır. Sağlıklı bireylerde varolan mikrobiyal dental plak ile konak savunması arasındaki dengenin konak savunması aleyhine değişmesi sonucunda periodontitis gelişmektedir. Periodontitis, diş çevreleyen bağ dokusu ve alveol kemiği yıkımı sonucunda cep oluşumu ile karakterize bir hastalık olup, aktif yıkım ve duraklama dönemleri içeren bölgeye özgü bir hastalıktır (54,122). Hastalığın ilerleme hızı ve şiddeti bireyden bireye farklılık göstermektedir (148).

Periodontitisin daha sıklıkla karşımıza çıkan formu olan kronik periodontitis, yavaş seyreder. Her yaşta görülebilmesi ile birlikte daha çok erişkinlerde karşımıza çıkar. Görülen yıkım miktarı doğrudan varolan plak, diştaşı ve iyatrojenik faktörler

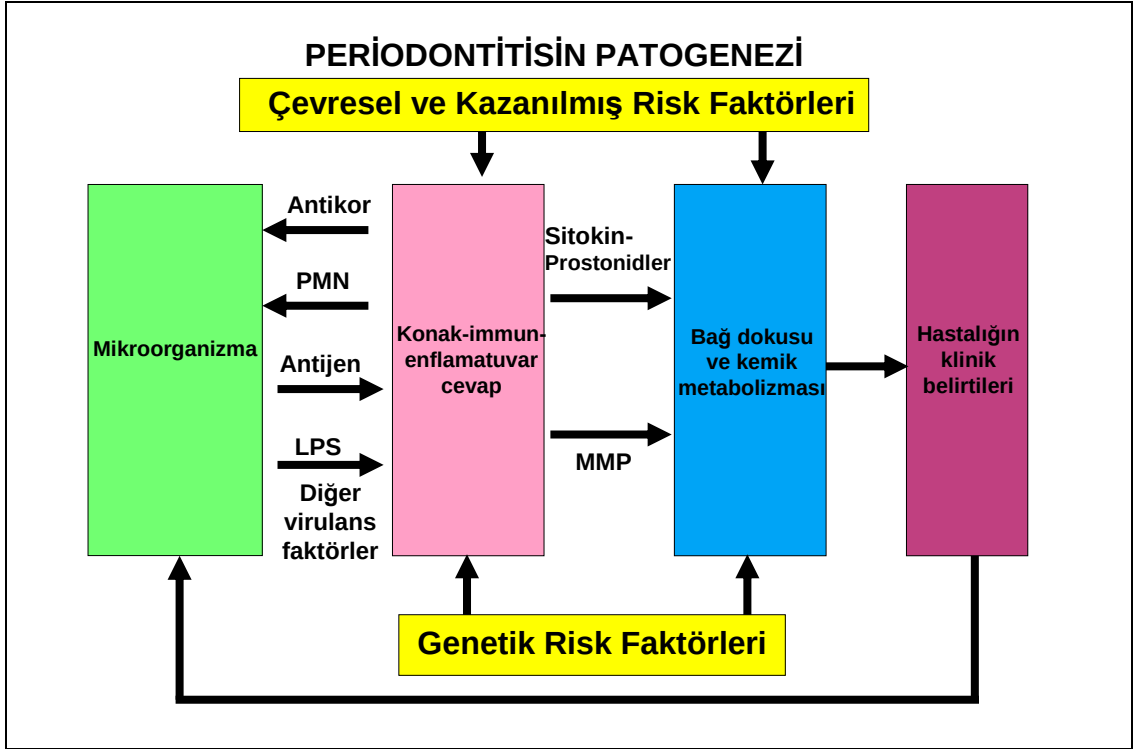
ile doğru orantılıdır. Özellikle *Porphyromonas Gingivalis* (P.g)), *Tannerella forsythia* (T.f), *Treponema denticola* (T.d) gibi Gram (-) (Gr (-)) bakterilerin subgingival alandaki birikimlerinin, kronik periodontitisteki ataşman ve alveol kemik kaybından sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Kronik periodontitiste, diyabet gibi sistemik hastalıkların varlığı, sigara kullanımı ve stres gibi çevresel faktörlerin etkisi ve konak savunmasının cevabını etkileyebilecek genetik faktörlerin bulunması hastalığın; ortaya çıkma riskini, şiddetini ve ilerleme hızını arttırabilmektedir (36).

Periodontitisin bir diğer türü olan agresif periodontitis genellikle 30 yaşından daha genç, sistemik olarak sağlıklı bireyleri etkileyen ileri doku yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Kronik periodontitisten; ortaya çıkma yaşı, ilerleme hızı, subgingival mikrofloranın içeriği, immun cevaptaki değişiklikler ve ailesel yatkınlık gibi özellikler ile ayrılmaktadır (69). Lokalize ve yaygın agresif periodontitis olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Kronik periodontitise benzer şekilde yıkım episodik olarak gerçekleşmektedir. Ancak bu episodlar hafta veya ay olarak değişebilmektedir. Varolan plak miktarı ve iyatrojenik faktörler ile meydana gelen yıkım arasında doğru bir orantının olmadığı belirlenmiştir (79). Agresif periodontitisli bireylerden elde edilen plak örneklerinde sıklıkla *P. gingivalis*, *Agregatibacter Actinomycetemcomitans* (A.a.), *T. forsythia* bakterileri saptanmaktadır (155). Belirlenen plak miktarından bağımsız olarak ileri derecede ataşman kaybı ve alveol kemik yıkımı görülen bu hastalıkta dişeti çekilmesi nadiren görülmekte, bununla birlikte sondalanan cep derinlikleri yüksek değerler ile karşımıza çıkmaktadır. Agresif periodontitiste iki farklı klinik tablo ile karşılaşılabilir. Kemik yıkımının ve ataşman kaybının aktif olduğu dönemlerde dişetinde kanama, ödem ve süpürasyon gözlenirken, duraklama dönemlerinde dişeti pembe, kanamasız olup klinik olarak sağlıklı dişeti ile benzer özellikler gösterebilmektedir.

Bu hastalığın ortaya çıkmasına etken birtakım risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi mikrobiyal dental plaktır. Agresif periodontitiste yıkım ile plak miktarı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte, plak içeriğindeki spesifik bakterilerin hastalığın ortaya çıkmasında önemli roller üstlendiği kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda agresif periodontitisli bireylerde özellikle A.a, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* ve *C. rectus*, ve *T. denticola* bakterilerinin seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir (155). Bir diğer risk faktörü immunolojik faktörlerdir. Bazı immun defektlerin agresif periodontitisin patogenezinde rol aldığı kabul

edilmektedir. Örneğin yapılan çalışmalarda immün cevabı düzenleyen insan lökosit antijeninin “*Human Leukocyte Antigen*” (HLA) agresif periodontitis için belirleyici bir belirteç olduğu saptanmıştır (25,108). Yapılan bir çalışma, agresif periodontitisde polimorf nüveli lökositler, monositler veya her iki grubun kemotaksi veya fagositoz özelliklerini etkileyecek fonksiyonel defektlerin etkin olabileceğini göstermiştir (84). Bunun yanında agresif periodontitisli bireylerdeki monositlerin bakterilere ait lipopolisakkaritlere (LPS) karşı aşırı cevabı fazla prostoglandin E₂ (PGE₂) üretimine neden olmaktadır (145). PGE₂’nin aşırı üretimi bağ dokusunda ve alveol kemiğinde yıkıma yol açabilmektedir. Bunların dışında monositlere ait Fc Gamma (Fcγ) reseptörlerinin yetersiz cevabı periodontitisin patogenezinde rol alabilmektedir (163). Yapılmış olan çalışmalarda her bireyin agresif periodontitise duyarlı olmadığı belirlenmiştir (155). Çalışmalar genetik faktörlerin etkin olduğu agresif periodontitiste ailesel bir model işaret etmektedir (28,93). Agresif periodontitisli bireylerde görülen immunolojik defektlerin genetik alt yapısının olduğu ortaya konmuştur (155). Hastalık için bir diğer risk grubu ise çevresel faktörlerdir. Agresif periodontitisli bireylerde sigara içme miktarı ve süresi yıkımı direkt etkileyen çok önemli bir etkidir (155). Sigara içen generalize agresif periodontitisli bireyler ile içmeyenler karşılaştırıldığında, içen bireylerde daha fazla ataşman ve kemik kaybı olduğu gözlenmiştir (65).

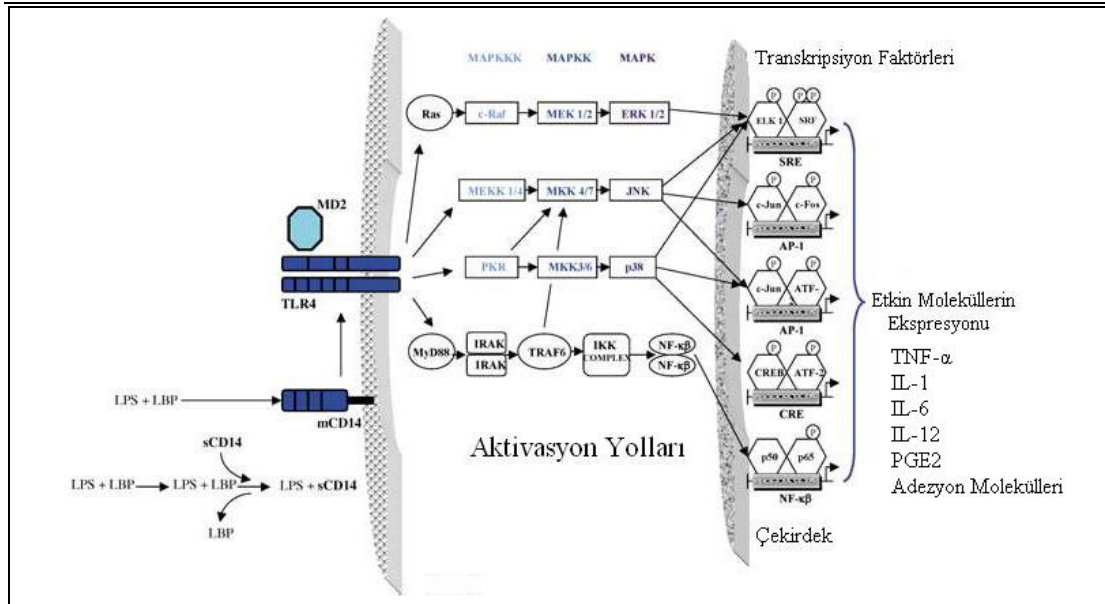
20 yıl öncesine kadar periodontal hastalıkların nedeninin diş yüzeyinde biriken dental plak olduğu ve plak içerisindeki bakteriler ve ürünlerinin ekstraselüler matris ile alveol kemik yıkımına neden olduğu kabul edilmekteydi. Yapılan çalışmalar ile bu yıkımdan sadece bakterilerin sorumlu olmadığı, bu bakterilere karşı oluşan konak savunmasının da hastalığın oluşumu, ilerleyişi ve şiddetinde etkin bir role sahip olduğu görüşü kabul görmüştür. Periodontal hastalığın oluşması bakteriler ile konak savunması arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bakteriler lehine değişmesi hastalığa neden olmaktadır. Bunun yanında bu dengeyi etkileyen çevresel ve kazanılmış risk faktörleri bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1: Periodontitisin Patogenezi (Page ve Kornman, 1997, 113)

Bakteriler sulkus içerisinde hem kendi varlıkları hem de ürettikleri maddelerle, konak savunmasını harekete geçirirler. İlk önce subepitelyal bölgedeki damarlarda vazodilatasyon ve permeabilite artışı gözlenir. Ardından endotel hücreleri tarafından açığa çıkarılan *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) ve *endothelial cell adhesion molecule* (ECAM) gibi adezyon molekülleri sayesinde lökositler damar cidarına doğru yaklaşır. Buradan da sirkülasyon dışına çıkarak önce bağ dokusuna ardından da bağlantı epiteline doğru ilerlerler. Aynı zamanda keratonisitlerden ve epitel hücrelerinden salınan diğer bir adezyon molekülü olan *intercellular adhesion molecule* (ICAM) nötrofiller için kemotaktik özellik gösterir. Ayrıca salınan IL-8 nötrofillere özel bir kemokindir. Aktive olan nötrofiller interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör (TNF- α) gibi proenflamatuvar sitokinleri üretirler. Enflamasyonun gelişmesi esnasında çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesi amacıyla kompleman, kinin ve fibrinolitik sistem gibi birçok mekanizma aktive olur. Açığa çıkan çok sayıda medyatör sayesinde makrofajlar bölgeye gelirler ve nötrofillerin yerini alırlar. Aktive olan makrofajlardan IL-1 α/β , interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , trasforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), IL-6, interlökin-10 (IL-10), interlökin-12 (IL-12), interlökin-15 (IL-15), *macrophage infectivity potentiator*

protein (MIP), *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), matris metaloproteinaz (MMP), PGE₂ salınır. Makrofajlar tarafından salınan bu maddeler, çok farklı mekanizmalar ile ortamın özelliklerini değiştirir. Örneğin kemokinler ile daha fazla makrofajın bölgeye gelmesi sağlanır. PGE₂ ve MMP'ler doku yıkımından sorumludurlar. Ayrıca makrofajlar T ve B lenfositleri uyatarak immun cevabın karakterini belirlerler. İmmun yanıtın oluşmasında ve ilerlemesinde tek bir yol izlenmez. Uyarı yolları ile aynı anda birçok sistem harekete geçer. Bu mekanizmalar doku homeostazını sağlamak amacıyla kimi zaman sinerjistik kimi zaman ise antagonistik etki gösterirler. Bu etki mekanizmaları daha çok hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlanan antijenlerin aktivasyonu ile karşımıza çıkar. Örneğin *toll-like receptor* (TLR) reseptörü antijen ile bağlandığında hücre içinde immun sistemi aktive ederek, doku yıkımına neden olacak birçok sitokinin ve medyatörün gen transkripsiyonunu ve dolaylı yoldan ekspresyonunu sağlar (Şekil 2).



Şekil 2: TLR-4' ün aktive ettiği sinyal yolları (Dixon ve ark.,2004, 43)

Birçok medyatörün rol aldığı patogeneizde T ve B hücrelerinin yoğunluğunun fazla olması immun yanıtın ilerlediğini gösteren bir belirtidir. Enflamatuvar infiltrat bağ dokusu içine doğru ilerler. Aktive olan fibroblastlar MMP ve bunların inhibitörlerini üretir. Bu hücrelerin varlığında bağ dokusu içindeki eksudasyon artar ve nitrik oksit (NO), *reactive oxygen species* (ROS), IL-1, IFN-γ, TNF- α, T ve B

hücreleri tarafından uyarılır. Bu moleküllerden ve uyardığı yollardan *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL), IL-1, IL-6, IL-12, interlökin-17 (IL-17), TNF- α ve PGE₂ alveol kemik yıkımından sorumludur. MMP'ler ise bağ dokusu ve alveol kemiği yıkımından sorumlu moleküllerdir. Bu durumda bağlantı epiteli hücrelerinin arasında mesafe artar ve diş yüzeyinden ayrılması sonucunda periodontal cep oluşmaya başlar. Bağ dokusu ve alveol kemik yıkımı ile ataşman kaybı gerçekleşir. Sonuç olarak periodontitis gelişir.

1.3. Konak cevabında Makrofaj Migrasyonunu İnhibe Eden Faktörün Yeri

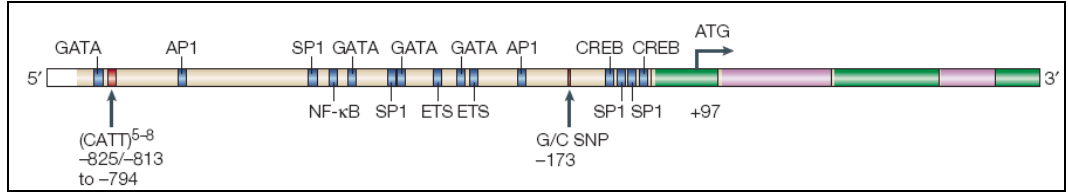
Makrofaj migrasyonunu inhibe eden faktör (MİF) ilk olarak 1966 yılında gecikmiş tip hipersensitivite üzerine yapılan çalışmalar esnasında saptanan bir sitokin olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sitokinin, uyarılmış olan T lenfositlere ait bir ürün olduğu ve makrofajların kapiller damarlardan rasgele çıkışlarını engellediği kabul edilmiştir (24,42). 20 yıllık süre içerisinde MİF'in sadece makrofajların migrasyonunda değil aynı zamanda bu hücrelerin yapışma, yayılma, fagositoz ve tümorisidal etkileri gibi birçok fonksiyonu üzerinde de düzenleyici etkisi olduğu saptanmıştır (9,38,106). 1989 yılına gelene kadar MİF üzerinde çok fazla araştırma yapılmamıştır. Bu yıldan sonra MİF'in komplementer DNA'sının (cDNA) klonlanması ile birlikte MİF'in konak savunmasındaki rolü tekrar dikkatleri üzerine çekmiştir (161). Daha sonrasında fare ve insan rekombinant MİF proteinin ve nötralize edici MİF antikollarının geliştirilmesi ile bu sitokine ait biyolojik ve biyokimyasal olayların araştırılması hız kazanmıştır. Yapılan bu araştırmalarla önceleri T lenfositlere ait olarak kabul edilen söz konusu sitokinin, makrofajlar ve monositler gibi konak savunmasına ait hücrelerden, farklı tipteki dokulardan ve en önemlisi LPS ile uyarılma sonucunda hipofiz bezinin ön lobundan bir hormon gibi salındığı saptanmıştır (22). Bu özelliği ile endokrin ve immun sistemler arasındaki bağlantıyı oluşturduğu düşünülerek nöroendokrin sitokin olarak adlandırılmıştır.

1.3.1. MİF Gen ve Proteininin Yapısı:

İnsan genetik haritasında 22. kromozomda (22q11.2) sadece bir tane MİF geni bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu genin farelerin 10. kromozomunda bulunan MİF geni ile %70-86 arasındaki değerlerde homolog yapı gösterdiği

belirlenmiştir (21,26,50,76,117,161,164). Farelerde saptanmış 9 pseudo MİF geni bulunurken, insanda MİF'e ait pseudo gen bulunmamaktadır.

Esumi ve ark. (50) 1998 yılında yaptıkları çalışmada, p-dopachrome tautomerase (DDT) ile MİF geninin ~ %30 homolog yapıya sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun nedeni ise her iki molekülün ait oldukları genlerin aynı kökene sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 3. de MİF geninin yapısı görülmektedir.



Şekil 3: İnsan MİF geni, 107, 172, 66 baz çifti uzunlukta olan üç kısa ekzondan (yeşil bölgeler), 188 VE 94 bç uzunluğunda iki introndan (pembe bölgeler) oluşmaktadır. 5' regülatör bölgesi farklı moleküllerin transkripsiyonları için çeşitli DNA bağlanma sekansları içermektedir. Örneğin aktivatör protein-1, (AP-1), nuclear factor-κB (NF-κB), ETS, GATA, SP1, cAMP (Calandra ve Roger, 2003, 34).

MİF' e ait sadece bir messenger RNA (mRNA) saptanmıştır. Bu yapının uzunluğu insan, sıçan ve farelerde ~ 0,8 kb olarak belirlenmiştir. Bu da 12.5 kDa molekül ağırlığında 114-aminoasit glikolize olmayan proteini kodlamaktadır. Bu özellik bakımında tüm memeliler (insan, fare, sıçan ve sığır) ~ 90 homolog yapıya sahiptir.

Kristalografik çalışmalara göre MİF homotrimer bir yapıya sahiptir. Bu üç boyutlu yapısı, üç mikrobiyal enzim ile benzer özellikler göstermektedir. Bunlar oxalocrotonate tautomerase, 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase ve chorismate mutase enzimleridir (150,151). Bu benzerliğe dayanılarak değerlendirildiğinde, MİF'in tautomerase ve oksidoreductase (Şekil 3) gibi katalitik aktivitelerinin olduğu öne sürülmektedir. Ancak bir enzim olarak MİF'in biyolojik fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak DDT ile olan genetik benzerliği ele alındığında enzim özelliği bir anlam ifade edebilir. Bunun için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.3.2. MİF Ekspresyonu:

MİF, asıl kaynağı olarak gösterilen T lenfositlerin dışında; diğer savunma hücreleri olan monositlerden, makrofajlardan, kan dentrik hücrelerinden, B lenfositlerden, nötrofillerden, eozinofillerden, mast hücrelerinden ve bazofillerden de salınmaktadır (14,31,91). MİF mRNA ve proteininin birçok doku ve organda ekspresyonu bildirilmiştir. MİF; endotelial hücrelerden, fibroblastalardan, beyinden (korteks nöronları, beyincik, hipotalamus, hipokampus, pons, glial hücreleri, ependima), karaciğerden (Kupffer hücreleri, hepatositler, merkezi venüllerin endotelial hücreleri), böbrekden (proksimal tübüllerin mezanşimal ve epitel hücreleri, toplayıcı kanallar, glomerulus, Bowman kapsülü), akciğerden (alveoler makrofajlar ve bronşların epitel hücreleri), dalakdan (beyaz ve kırmızı pulpa), deriden (keratonisitler, yağ bezleri, kıl kökleri) ve dişetinden eksprese olmaktadır (31, 104). Bunun yanında hipofiz bezinden (kortikotropik ve tiotropik hücreler), böbrek üstü bezlerinden (glomerulosa ve fasciculata bölgelerinde) ve pankreas hücrelerinden de eksprese olduğu bilinmektedir (159).

MİF, Gr (-), gram-pozitif bakteriler (Gr (+)), LPS, ekzotoksin, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1), streptococcal pirojenik ekzotoksin A (SPEA), mikobakteriler, malarya pigmenti, TNF- α ve IFN- γ gibi proenflamatuvar sitokinlerin uyarımı sonucunda salınmaktadır (31,35,94). MİF hipofiz bezinin anterior bölgesindeki hücrelerde olduğu gibi, makrofajların sitoplazmalarında da hazır bir şekilde depolanmaktadır. Böylece herhangi bir uyarım sonucunda diğer sitokinlerden farklı olarak, protein sentezi gerektirmeden salınabilmektedir (31). IL-1 veya TNF- α gibi diğer proenflamatuvar sitokinlerin salınabilmesi için *de novo* mRNA oluşturulması ve ardından protein sentezi gerekmektedir. Bununla birlikte MİF'in uyarılması için gereken LPS konsantrasyonu, TNF- α 'nın uyarılması için gereken miktardan 10-100 kat daha düşüktür (31). Hem düşük konsantrasyonlar ile uyarılması hem de hızlı salınabilmesi ile MİF'in enflamatuvar cevapta öncü rol oynadığı düşünülmektedir.

MİF, gerek gen haritasında bulunduğu bölge ve gerekse salınabildiği organlara bağlı olarak değişik görevler üstlenmektedir. MİF bir sitokin, bir enzim veya bir hormon gibi hareket edebilmektedir (16,29,33,34,91). Bunların yanı sıra MİF' in en önemli özelliklerinden bir tanesi ise glukokortikoidlerin proenflamatuvar sitokinler üzerindeki inhibitör etkisini tersine çevirmesidir (16,29,30,33,34,91,131). Bu

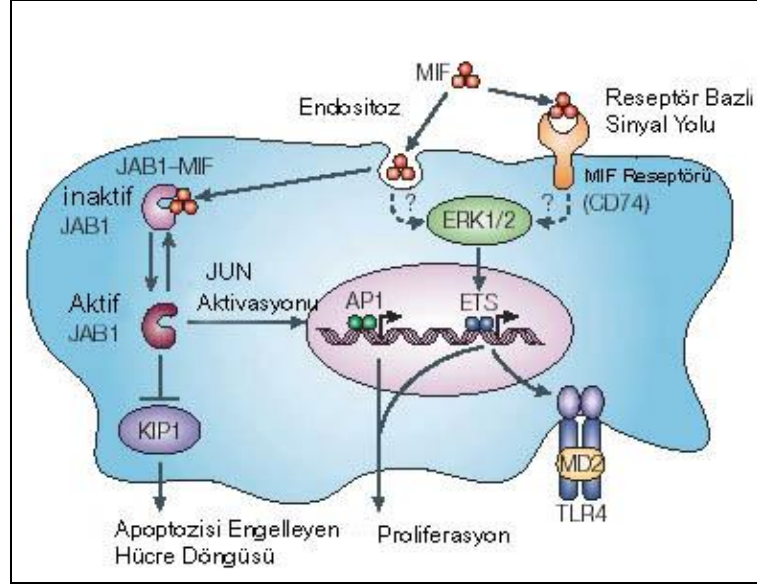
özellikleri ile MİF'in sitokin süper ailelerinden hiçbirine ait olmadığı görüşü kabul edilmektedir.

1.3.3. MİF'in Hormon Görevi:

MİF'in hipofiz bezinin kortikotropik hücrelerinden salındığı belirlenmiştir (38). Bu sistemik salınım ile fizyolojik stres ve enfeksiyon durumunda konak savunmasını düzenleyebilme özelliğine sahip olmaktadır. LPS ile uyarıldıktan sonra hipofiz bezi MİF protein miktarının azaldığı, sirkülasyondaki miktarının ise arttığı belirlenmiştir (22). Hazır haldeki MİF, hipofiz bezi içerisinde özel veziküller içerisinde bulunmaktadır. Aynı zamanda MİF'e, adrenokortikotropin (ACTH) hormon ve tirotropik hormon içeren veziküller içerisinde de rastlanmaktadır. Bu yakın lokalizasyondan dolayı hipotalamik yolun konak stres cevabı oluşturmada ACTH ile birlikte MİF de rol almaktadır. Hipofiz bezinin protein içeriğinin %0,05' ini MİF oluşturmaktadır. Bu oran hipofiz bezine ait ACTH (%0,2) ve prolactin (%0,08) hormonları ile karşılaştırıldığında ilginç bir tablo karşımıza çıkmaktadır (22).

1.3.4. MİF'in Sitokin Görevi:

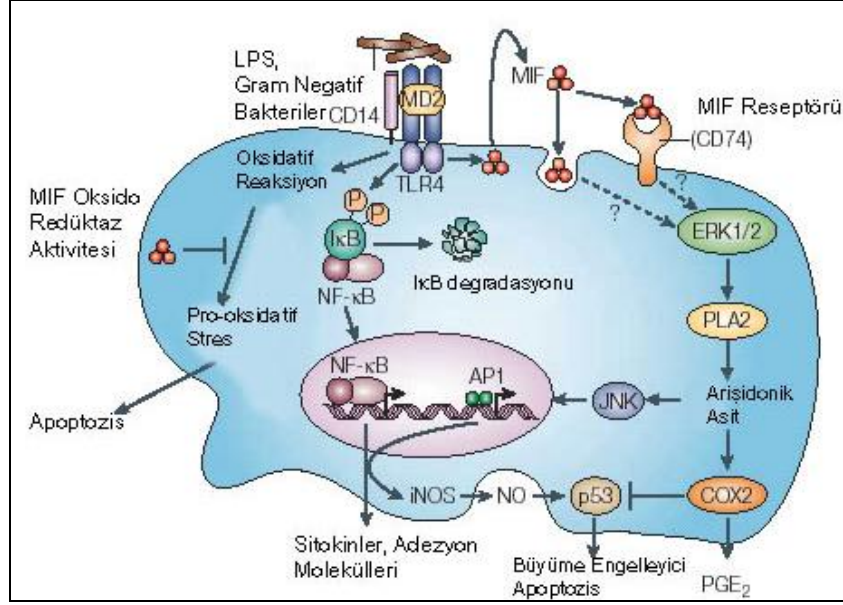
Sitokinler hedef hücreler üzerinde bulunan reseptörlere bağlanarak, uyarı yollarının aktivasyonlarını, gen transkripsiyonunu ve etkin moleküllerin ekspresyonunu sağlarlar. İlk yapılan çalışmalarda MİF için özel bir reseptör saptanamamış, ancak olası mekanizmalar ortaya atılmıştır. Leng ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada, MİF' in *major histocompatibility complex* sınıf II (MHC-II) hücre yüzeyi reseptörlerinden CD74 reseptörünün extrasellüler komponentine bağlandığını belirlemişlerdir (85). Buna alternatif olarak kabul edilen bir diğer yol ise MİF'in küçük parçacıklar halinde hücre içerisine endositoz ile alındığı şeklindedir (91) (Şekil 4).



Şekil 4 : MİF'in CD74 reseptörü ve endositoz yoluyla hücre içi aktivasyonu (Calandra ve Roger, 2003, 34).

1.3.4.1. MİF ve ERK1/ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)

Sitokinler çoğunlukla mitojenik büyüme faktörleri üzerinde etki göstererek hücre proliferasyonunu sağlarlar. Yapılmış olan çalışmalar, MİF'in T hücreleri ve endotelial hücrelerin proliferasyonu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (10,37). Mitchell ve ark. (101) 1999 yılında yaptıkları çalışmada, MİF'in *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) süper ailesinin bir üyesi olan *extracellular signal-regulated kinase-1* (ERK1/2) yolunun fosforilasyonu ve aktivasyonu ile inaktif fibroblastların uyarılması ve proliferasyonlarını sağladığını göstermişlerdir. Bu fonksiyon protein kinaz A (PKA) ile ilişkili olup *cytoplasmic phospholipase A2* (cPLA2) enzim aktivasyonunu arttırmaktadır. Söz konusu enzim faaliyeti proenflamatuvar yanıtın aktiflenmesine, dolayısıyla arışidonik asit ve bunun etkisi ile de prostaglandin ve lökotrienlerin üretimine neden olmaktadır (Şekil 5).

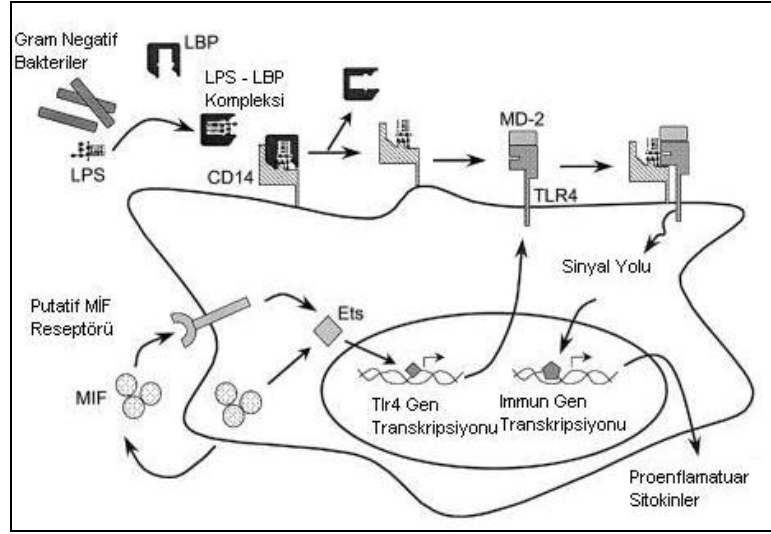


Şekil 5: ERK1/2 yoluyla fosfolipaz A2 fosforilasyonu-aktivasyonu ve PGE₂ üretimi (Calandra ve Roger, 2003, 34).

1.3.4.2. MİF ve Toll-like reseptör-4 (TLR-4)

TLR-4; LPS ve Gr(-) bakterilerin tanınmasını sağlayan reseptör kompleksine sahip, sinyal taşıyıcı hücre yüzey molekülüdür (33,34) (Şekil 6). TLR-4 ile MİF arasındaki ilişkinin saptanması amacı ile yapılan bir çalışmada; farelere anti-MİF rejimi uygulanarak, farelerin makrofajları MİF defektli hale getirilmiş ve daha sonra bu farelere LPS enjekte edilerek, makrofajların LPS ve Gr (-) bakterilere karşı olan cevapları değerlendirilmiştir (129). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, MİF defektli makrofajların LPS ve Gr (-) bakterilere karşı daha az duyarlı oldukları saptanmıştır. Azalmış olan cevabın bir göstergesi de, Gr (-) bakteriler ve LPS uyarımında yüksek oranlarda eksprese olan TNF- α 'nın üretimi ve *Nuklear Factor-Kappa B* (NF- κ B) aktivitesindeki azalmasıdır. Makrofajların LPS ve Gr (-) bakterilere karşı verdiği cevap ile sitokin üretimindeki azalmanın, TLR-4 ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çünkü makrofajların, Gr (+) bakterilere karşı olan yanıtlarında ve TLR-2 ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (129). MİF, Ets süper ailesinin bir üyesi olan PU.1 üzerine etki ederek TLR-4'ün gen transkripsiyonunu, ardından da mRNA ve protein ekspresyonunu arttırarak, bu molekülün endotoksin içeren yapıları tanınmasını sağlamaktadır (Şekil 6). MİF, TLR-

4 ekspresyonunu kontrol ederek, immün cevaptaki düzenleyici görevini gerçekleştirmektedir.



Şekil 6: MİF’in TLR-4 üzerine etkisi (Roger ve ark., 2003, 129).

1.3.4.3. MİF ve Tümör Baskılayıcı Gen Ürünü (p53)

Doğal bağışıklık sisteminde, immün cevabın kendi içerisinde düzenleyici özel mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan bir tanesi LPS ile uyarılmış olan makrofajların apoptozisi veya programlı ölümleridir. Apoptozis aktive olmuş makrofajların yarı ömürlerini sınırlandırırken, enflamatuvar ürünlerinin ekspresyonunun engellenmesini amaçlamaktadır. Apoptozis için NO, p53 ve bunlara bağlı sitolitik yolun aktivasyonu gerekmektedir (82,101). NO hücre içinde p53 akümüasyonunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar ile MİF’in p53 için negatif regülatör olarak fonksiyon gördüğü belirlenmiştir (Şekil 3). MİF defektli farelerde NO seviyesinin dolayısıyla p53’ün hücre içi birikiminin ve buna bağlı apoptozisin arttığı belirlenmiştir. MİF varlığında ise NO bağlı p53 apoptozisinin baskılandığı gözlenmiştir (101). MİF’in p53’ü inhibe etmesi için ERK1/ERK2, PLA2, *cyclooxygenase2* (COX₂) ve PGE₂ aktivasyonu gerekmektedir (Şekil 3). Ayrıca p53 ile proenflamtuvar sitokin ve adezyon moleküllerinin regülasyonunu sağlayan NF-κB, hücre büyümesinde antagonist etkiye sahiptirler ve koaktivatör molekül için yarış halindedirler. MİF’in p53’ü inhibe etmesi dolaylı yoldan NF-κB’nin aktivasyonunu ve translokasyonunu sağlamaktadır (101). MİF’in p53’ü inhibe etmesi

sonucunda makrofajların apoptozisi engellenmiş olur. Böylece makrofajların büyümesi, ömürlerinin uzaması ve etkinliklerinin süresinin artması sağlanır.

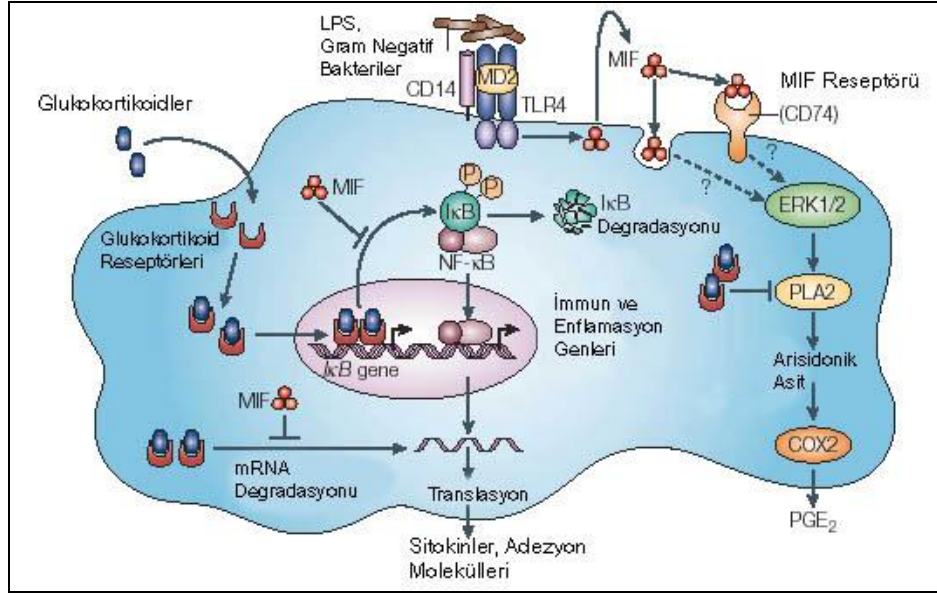
1.3.4.3. MİF ve *JUN-activation domain-binding protein-1* (JAB-1)

JAB-1 enflamatuvar süreçte; *activator protein-1* (AP1) koaktivatörü olan JUN fosforilasyonunu sağlayan JNK'yi aktive eder. AP1; hücre büyümesi, farklılaşması ve ölümü üzerine etkin olan bir proteindir. JAB-1'in diğer bir görevi ise hücre döngüsü inhibitörü *cyclin-dependent kinase inhibitor 1* (KİP-1) ve p53' ün etkisini arttırmaktır. Kleemann ve ark. 2000, Lue ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan çalışmalarda, endositoz yolu ile alınan MİF'in, JAB-1'in JNK ve AP1 üzerine olan etkisini inhibe ettiği gösterilmiştir (74,90). Böylece MİF dolaylı yoldan hücre döngüsünün devamını sağlayarak, apoptozisi engeller ve hücre proliferasyonuna olanak sağlar (Şekil 4).

1.3.5. MİF ve Enflamasyon

MİF'in direkt veya indirekt olarak, içerisinde sitokinlerin de bulunduğu çeşitli enflamatuvar moleküllerin üretiminden veya ekspresyonunundan sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmalara göre; MİF enflamasyon sürecinde TNF- α (31, 32), IFN- γ (1,10), IL-1 β (10), IL-2 (10), IL-6 (31,137), IL-8 (18), NO (21), COX₂ (102), PGE₂ (102), MMP ve inhibitörlerinin (99,109,111) ekspresyonunu veya sentezini arttırmaktadır.

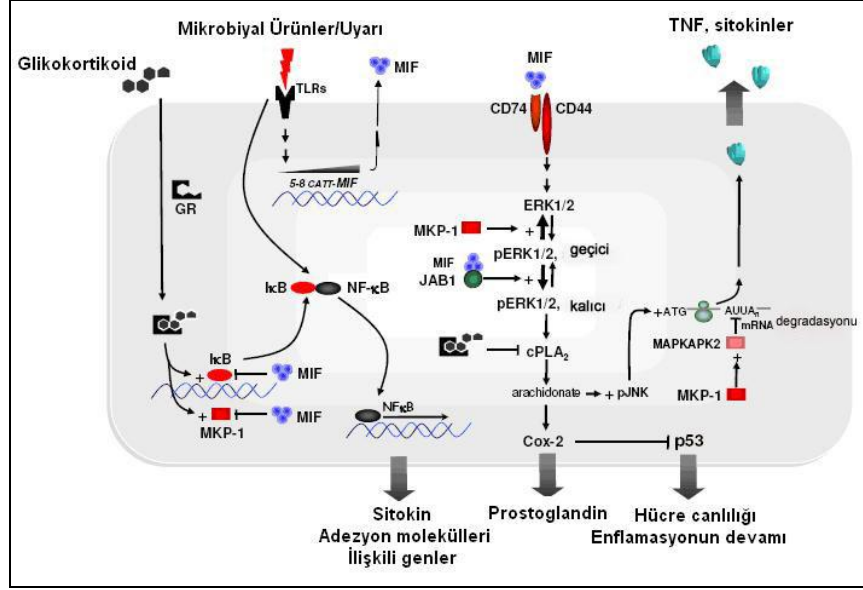
MİF'in en çok ilgi çeken özelliği ise diğer proenflamatuvar sitokinlerden farklı olarak glukokortikoid hormonlar tarafından baskınlanmaması, tam tersine sekresyonunun artmasıdır (30). Enflamasyon, enfeksiyon ve stres anında MİF'in sirkülasyondaki konsantrasyonunun glikokortikoidlere benzer şekilde arttığı saptanmıştır (30). MİF'in glikokortikoidlerin immunsupresif etkilerini baskıladığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7: MIF’in glukokortikoidler üzerine etkisi (Calandra ve Roger, 2003, 34).

Glikokortikoidler; proenflamatuvar sitokinler, prostoglandinler ve reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri gibi çeşitli enflamatuvar medyatörlerin üretimini azaltarak konak cevabı üzerine düzenleyici ve antienflamatuvar etki gösterirler. Bunun yanında enflamatuvar yanıtın derecesini sınırlandırmak amacıyla adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltmak yoluyla, lökositlerin migrasyonunu engeller ve apoptozlarını provoke ederler. Glikokortikoidlerin hastalıkların ilerleyişi üzerine olan etkisi değişkendir, etkileri kısa süreli ve organizmayı koruyucu yöndedir (53). Bu moleküllerin farklı aktivasyon yolları bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, MAPK süper ailesine ait proteinlerin baskılanması üzerinedir. MAPK fosfanaz-1 (MKP-1) enzimini aktive ederek MAPK ailesine ait tüm proteinleri baskılama gücündedir. Sonucunda cPLA₂, PGE₂ ve lökotrienlerin üretimi durur. İkinci aktivasyon yolu hücre içerisinde inhibitörü ile birlikte kompleks (NF-κB/IκBα) halinde bulunan NF-κB üzerinedir. Uyarı geldiği zaman IκB parçalanır ve NF-κB aktif hale gelir. Glikokortikoidler ise IκB ekspresyonunu artırarak NF-κB’nin sürekli inaktif kalmasını sağlar. NF-κB çok sayıdaki sitokin, hücre adezyon molekülü, kompleman sistem ve bu moleküllerin reseptörlerinin gen transkripsiyonlarından sorumludur. Bu molekülün inaktif kalması sonucunda mononükleer hücrelerin TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-8 sentezinin, fibroblastlar tarafından cPLA₂, arşidonik asit metabolitlerinin salınmasının ve T hücrelerinin proliferasyonunun baskılandığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda MIF’in glikokortikoidlerin baskılayıcı bu etkisini geri döndürdüğü gösterilmiştir (10,30,102) (Şekil 8). MIF’in glukokortikoidlerin fizyolojik antagonisti

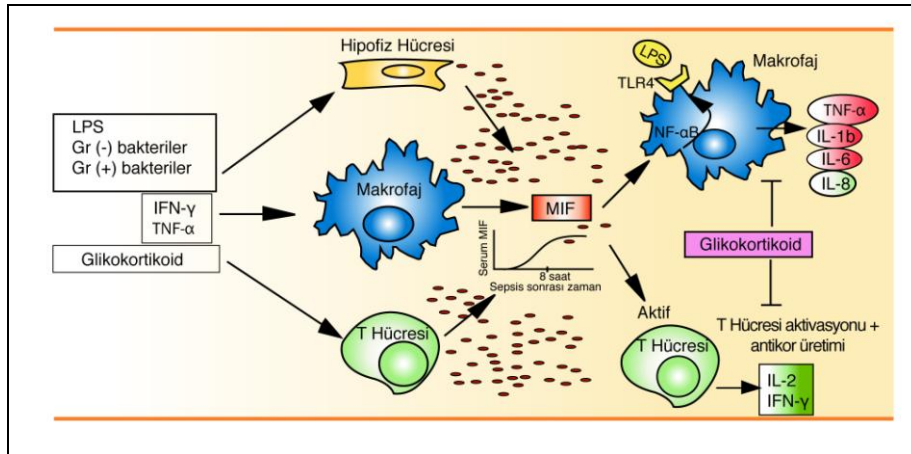
olduğu düşüncesi yaygın bir kanıdır. MİF ile glikokortikoidler arasındaki denge immün cevabın karakterini belirlemektedir (41,53,83,102,131).



Şekil 8: MİF'in glikokortikoidler üzerine etkisi (Flaster ve ark., 2007, 53)

1.3.6. MİF ve Kazanılmış Bağışıklık

T hücrelerinin spesifik antijenler, mitojenler veya anti-CD3 antikorlar ile uyarılması sonucu MİF mRNA üretiminin ve protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (24,42). Yapılan çalışmalarda anti-MİF antikorlarının in vivo olarak T hücre proliferasyonunu ve B hücrelerinin antikor üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir (24). Bu sonuçlar MİF'in T ve B hücrelerini uyardığını göstermektedir. Bu uyarım sonucunda T hücre proliferasyonu ile birlikte IL-2 ve IFN γ üretimi artmakta, glikokortikoidlerin T hücresi üzerindeki inhibe edici etkisi ortadan kalkmaktadır (10,24) (Şekil 9).



Şekil 9: MİF'in T hücreleri üzerine olan etkisi (Flaster ve ark., 2007, 53)

1.3.7. MİF ve Kronik Enflamatuvar/Otoimmün Hastalıklardaki Etkisi

Sağlıklı bireylerde, bağışıklık ve enflamatuvar süreçte düzenleyici ve proenflamatuvar etkilere sahip olan MİF molekülü, özellikle kronik enflamatuvar hastalıklarda, konsantrasyonundaki artış ile immün ve enflamatuvar yanıtın şiddetinin artmasına ve etki ettiği mekanizmalardan dolayı ileri doku yıkımlara neden olabilmektedir. Tablo 1’de MİF’in rolünün belirlendiği önemli hastalıklar yer almaktadır.

Tablo 1: MİF’in rol aldığı hastalıklar

Etkilenen sistem	Hastalık	İnsan	Deneysel Çalışmalar	
İmmün Sistem	- Sepsis - Septik şok - Allogreft reddi	+	+	Geçikmiş tip hipersensitivite
Solunum Sistemi	- Solunum distres sendromu - Astım - Tüberküloz - Wegener Granülomatoza	+	+	
Boşaltım Sistemi	- Gromerulonefrit	+	+	
Kemik ve Eklemler	- Romatoid artrit - Erken yerleşen idiopatik artrit - Polikondrit	+	+	
Sindirim Sistemi	- Colit - Chron hastalığı	+	+	Gastirit
Deri	- Atopik Dermatit - Psoriasis - Sistemik sklerozis	+		
Endokrin Sistem	- Tip-II Diyabet - Pankreatit	+	+	Pankreatit
Sinir Sistemi	- Multipl Skleroz - Behçet Hastalığı	+	+	Ensefalomyelit
Görme sistemi	- Üveit - İridosilit	+	+	
Kalp ve Damar Sistemi	- Aterosklerozis	+	+	
Duyuma Sistemi	- Otit	+		

1.3.7.1. MİF ve Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA) % 1 oranında yetişkinlerde görülen kronik enflamatuvar yıkıcı bir hastalıktır. RA'da MİF'in etkin bir rol aldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda; adjuvant artritli farelere anti-MİF tedavisi uygulandığında hastalık şiddetinin azaldığı gözlenmiştir (81). Yapılan diğer bir çalışmada MİF defektli farelerde artritisin şiddetinin azaldığı, bunun da sinoviyal p53 miktarının artarak sinoviyal apoptozisin meydana gelmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (82). MİF defektli farelerde eklemdeki enflamasyonun ve yıkımın azaldığı gözlenmiştir. Bu inhibisyon MMP-13 ve MMP-2 mRNA düzeylerinin azalması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca MİF'in rat osteoblastlarında MMP-9 ve MMP-13 aktivasyonunu sağladığı saptanmıştır (112).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise sağlıklı veya osteoartritli bireylerle romatoid artritli bireyler karşılaştırıldığında, eklem sıvısı ile serumdaki MİF konsantrasyonu ve sinoviyal fibroblastların sayısının RA'da arttığı gözlenmiştir (83,111). RA'da fibroblast benzeri sinovyal hücrelerin miktarı ile beraber cPLA₂, COX₂, PGE₂ (135) ve IL-1, IL-6, IL-8 (110) gen ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. MMP'ler tarafından bağ dokusunun yıkımı RA için tipik bir patolojidir. Yapılan çalışmalarda MİF'in MMP-1 ve MMP-3'ü aktive ettiği belirlenmiştir (111). İn vivo olarak ise RA hastalarının eklemlerinde, MİF'in p53 inhibisyonu sonucunda apoptozları engellenen sinovyal hücrelerin birikmesi ile hiperplaziler meydana geldiği saptanmıştır (82). RA'da eklem bölgesinde ileri yıkıma neden bu moleküllerin varlığı MİF ekspresyonunun bölgedeki artışı ile doğru orantı göstermektedir. Lökositlerin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve yaşam sürelerinin uzun olmasını sağlaması, aynı zamanda proenflamatuvar sitokin ve medyatörlerin üretimine neden olması gibi nedenlerle MİF'in RA'da eklem ve kemik yıkımından sorumlu molekül olabileceği düşünülmektedir.

1.3.7.2. MİF ve Aterosklerozis

Aterosklerozis'in nedeninin endotelial aktivasyon ve hasarlanmaya neden olan hiperkolestrolemi olduğu düşünülmekteydi. Ancak günümüzde aterosklerozis'in başlamasına ve ilerlemesine enflamasyonun neden olduğu kabul edilmektedir (86).

Aterosklerozis'deki enflamatuvar süreçte makrofajlar, makrofajlardan oluşan köpük hücreler ve bunlardan daha az sayıda olmak üzere T hücreleri görev almaktadır. *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), IL-8, TNF- α , *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), IL-12 ve köpük hücreler yapısal bozukluğun başlamasından sorumludurlar (86,141). İlk olarak 2002 yılında aterom plakları ile MİF arasındaki ilişki belirlenmiştir (27). Bu çalışmada aterosklerozis'i olan bireylerin karotis arterlerinde bulunan plaklarının MİF ekspresyonunun kontrol grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır (27). MİF proksimal aorttaki lezyonların dışında; kalp kapakçıklarındaki, karotis arterindeki ve abdominal aort anevrizmasındaki lezyonlarla da ilişkili bulunmuştur. Bu durumlarda serum MİF konsantrasyonu hastalık şiddeti ile korelasyon göstermektedir (116). MİF'in plak lezyonundaki MMP-1, MMP-9 ve MMP-12 artışı ve bunların inhibitörlerinin azalmasından sorumlu olduğu saptanmıştır. Bunların yanında artmış MİF miktarı ile orantılı olarak artan ICAM, vasküler endoteliyal hücreler üzerine aşırı monosit yapışmasına neden olur. Bu bulgular MİF'in aterosklerozis'te plağa bağlı lezyonların oluşumunda önemli role sahip olduğunu düşündürmektedir (27,116).

1.3.7.3. MİF ve Enflamatuvar Akciğer Hastalıkları

Donnelly ve ark. (48) 1997 yılında yaptıkları çalışmada, akut solunum distress sendromlu hastaların alveoler hava boşluklarında yüksek oranlarda MİF miktarına rastlamışlardır. MİF'in proenflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-8 ekspresyonunu arttırdığını belirlenmişlerdir. Bir diğer çalışmada astım hastaları ile kontrol grubundan alınan bronkoalveoler sıvı, MİF miktarı açısından karşılaştırıldığında, astım hastalarında artmış MİF konsantrasyonu belirlenmiştir (130). Bütün bunlar değerlendirildiğinde, solunum yollarının enflamatuvar hastalıklarında da MİF'in etkin rolü olabileceği ileri sürülmektedir.

1.4. Periodontal Hastalıklarda Genetik Polimorfizmlerin Rolü

Periodontal hastalıklarda bakterilere karşı oluşan konak cevabı bireyler arasında farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar, dolaylı olarak hastalığa karşı duyarlılık ve hastalığın şiddeti üzerine etkilidir. Ayrıca periodontal hastalıklarda meydana gelen yıkımdan büyük oranda konağa ait moleküllerin sorumlu olması ve hastalık anında yüksek oranlarda saptanması, genetik bir farklılığın bu aşırı ekspresyondan sorumlu olup olmadığı düşüncesini gündeme getirmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu farklılıkların genetik varyasyonlardan kaynaklanabileceği görüşü oldukça fazla ilgi görmektedir (88).

Bir toplumda bulunan bireylerin sahip olduğu genlerin oluşturduğu bütüne gen havuzu veya genom denir. Bir genin bulunduğu kromozom üzerinde yer aldığı bölgeye allel adı verilir. Allel çeşitliliği, toplumların genetik çeşitliliği olarak sayılmaktadır. Bu çeşitlilik için kullanılan 2 ifade vardır; polimorfizm ve heterozigotluk. Bireylerin heterozigotluğu, genlerin yüzdesi veya oranı ile tanımlanır. Her gen yerleşimi, bir allelin birbirinin aynı iki kopyasını veya 2 allelin birer kopyasını taşımaktadır. Bir toplumda birden fazla genotipin varlığı polimorfizm olarak tanımlanır. Bir toplumda iki ya da daha fazla alternatif genotipin varlığı polimorfizm olarak tanımlanır. Bir lokus dikkate alındığında, en yaygın allelin (Wild-type veya yabani tip) toplumdaki oranı % 95'in (diğer kriter % 99) altında ise bu lokus polimorfik olarak değerlendirilir.

Gen polimorfizm ardışıklığı bireysel farklılık gösterir. Toplumun en az % 1'ini etkiler. İnsan gen polimorfizmleri aşağıdaki alanların birinde veya birkaçında oluşabilir (154).

1. Promoter (5'-kanat bölgesi)
2. Ekzon (gen kodlama bölgesi)
3. İntron (ekzonlar arası bölge)
4. Kodlanmayan bölge (3'- kanat bölgesi).

En sık görülen polimorfizmler genomik DNA üzerindeki tek baz çiftinin değişmesi ile oluşan tek nükleotid polimorfizmleridir (154). Bu polimorfizmler bulundukları bölgeye bağlı olarak genin fonksiyonlarını etkileyebilirler. Örneğin promoter bölgede meydana gelen bir polimorfizm ilgili mRNA ekspresyonunda

artışa neden olabilir. Bir başka polimorfizm türü ise 2 veya 3 nükleotid tekrarlarıdır (71). Gen polimorfizminin bir diğer türü ise, nükleotid eklenmeleri veya silinmelerini “*insertion/deletion*” içerir (123).

Genlerdeki polimorfizmler, eklenme ve silinme içeren değişiklikler gösteriyorsa bu ciddi hücresel fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Bu durum sistemik fonksiyonları etkileyerek, ölüme neden olabilir. Az veya orta seviyede değişimler olursa, hastalık ancak uygun koşullar varlığında ortaya çıkar. Örneğin diyabet ve hipertansiyon gibi hastalıklar genetik olarak nitelendirilseler de, hastalığın ortaya çıkması için uygun şartlar gerekir. Kronik enflamatuvar özelliğe sahip olan koroner kalp hastalığı, romatoid artrit, aterosklerozis gibi hastalıklar ile çok sayıda farklı gen ve çevresel faktörün kompleks ilişkisi ile hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çok faktörlü bir hastalık olan periodontitisin genetik tanısı değerlendirilirken, çevresel faktörler mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Yapılan çalışmalarda var olan her gingivitisin periodontitise dönüşmediği, dönüştüğünde ise hastalığın şiddetinin kişiden kişiye farklı olduğu gözlenmiştir (88). Bireyler arasındaki bu farkın konağın bakterilere karşı verdiği cevaptaki farklılıklardan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Yıkımın büyük bir oranından sorumlu olan konak cevabında etkin olan genlerdeki değişikliklerin, periodontal hastalığa karşı duyarlılık ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

1.4.1. Periodontitis ile Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi

Biyolojik aktivitesi, moleküler yapısı ve klinik etkinliğinden dolayı IL-1 ailesine (IL-1 α/β) ait polimorfizmler birçok çalışma ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda ırksal ve çevresel faktörlere bağlı olmak üzere farklı sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle beyaz ırktaki bireylerde IL-1 polimorfizmi ile periodontitis ilişkisi için anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, IL-1’in kronik periodontitisin ilerlemesinde risk faktörü olabileceği konusunda uzlaşılmaktadır (154). Ancak IL-1 polimorfizmi ile agresif periodontitis arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (154).

İmmun yanıtta önemli bir yere sahip TNF- α polimorfizminin değerlendirildiği çalışmalarda; TNF- α geninin allel sıklıkları farklı etnik gruplarda çeşitlilik göstermektedir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre periodontitis ile TNF- α arasındaki ilişkiyi destekleyen çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır (167).

IL-2 polimorfizminin değerlendirildiğinde, hastalık şiddeti ile IL-2 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur (139,167).

IL-4 için yapılan çalışmalarda, kronik ve agresif periodontitiste hastalığa duyarlılık ve hastalık şiddeti açısından IL-4 polimorfizm ile arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (62,72).

IL-6 polimorfizmi ile periodontitis arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, diğer sitokinlere benzer şekilde etnik farklılıklara bağlı çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Diğer taraftan, IL-6 gen polimorfizminin serum IL-6 seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir (167).

3 farklı bölgede polimorfizmi belirlenen IL-10 ile periodontitis arasında pozitif ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (63, 140).

İmmunglobülin G moleküllerinin Fc bölgesi için lökositlerden salınan reseptörleri (FcγR), periodontitisin patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda bu reseptöre ait polimorfizmlerin hem AgP hem de KP ile ilişki saptanmasına rağmen, bir risk faktörü olup olmadığı hala belirsizliğini korumaktadır (89).

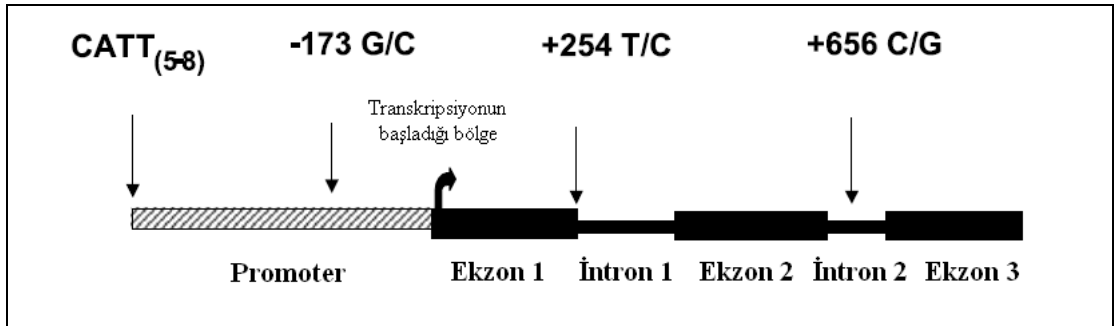
Monocyte differentiation antigen (CD14), caspase recruitment domain 15 (CARD15), TLR-2 ve TLR-4 polimorfizmleri ile periodontitis ilişkisine ait net bilgiler halen mevcut değildir (167).

Araştırılan diğer bir polimorfizm ise MMP polimorfizmleridir. Bu moleküller için de etnik gruplar arası farklılıklar gözlenmektedir .

Bunların dışında katepsin C, HLA, *N-formyl peptide receptor (fMLP)*, *angiotensin converting enzyme (ACE)*, *lymphotoxin-alpha (LTA)*, *endothelial nitric-oxide synthase (eNOS)*, *chemokine receptor 5 (CCR5)*, *TGF-β*, *tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)*, *receptor for advanced glycation end-products (RAGE)*, *plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)*, *N-acetyltransferase-2 (NAT-2)* gibi moleküllerin polimorfizmleri sınırlı sayıda araştırmada değerlendirilmiş olup, periodontitis ile ilişkisinin bulunabileceği varsayılan aday genler üzerinde çalışmalar devam etmektedir (167).

1.4.2. MİF Geni Polimorfizmi ile AgP ve KP İlişkisi

Enflamatuvar veya endokrin sisteme ait çeşitli hastalıklarda serum, plazma ve dokulardaki MİF konsantrasyonlarının yüksek olarak saptanması, aynı zamanda çok sayıda in vitro ve daha az sayıda yapılan in vivo çalışmalarda anti-MİF tedavisi sonucunda hastalık şiddetinin azalması, MİF'in bu hastalıkların patogenezinde önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Mikrobiyal invazyondan sonra oluşan enflamatuvar ve immun yanıtın kontrolünde görev alan MİF'e ait genetik bir varyasyonun, bu hastalıklara karşı olan duyarlılığın ve hastalık şiddetinin artmasına neden olabileceği varsayılmaktadır. Bu varyasyon sonucunda eğer MİF fonksiyon kaybına uğrarsa enflamatuvar ve immun yanıtın kapasitesinde azalma meydana gelmekte, tam tersine fonksiyon artımına neden olursa şiddetli enflamatuvar ve immun yanıt ortaya çıkmaktadır. Baugh ve ark. (15) 2002 yılında yaptıkları çalışmada, MİF'e ait 4 farklı polimorfizm bölgesi saptanmışlardır (Şekil 10). Bugüne kadar MİF gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalık grupları arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalar Tablo 2'de verilmiştir.



Şekil 10: MİF'in polimorfizm bölgeleri (Donn ve ark., 2004, 45)

Tablo 2: MİF polimorfizmi ile çeşitli enflamatuvar hastalıklar arasındaki ilişki (t.e: test edilmemiş)

Araştırmacılar	Polimorfizm	Hastalık Türü	Hastalık ile ilişkisi	Hastalığın şiddeti ile ilişkisi
Donn ve ark. 2001 (46)	-173 G/C	JIA	+	t.e
Baugh ve ark. 2002 (15)	-794 5-CATT	RA	+	t.e
Amoli ve ark. 2002 (2)	-173 G/C	Sarkoidozis	+	t.e
Donn ve ark 2002 (44)	-173 G/C	JIA	+	+
Benedetti ve ark 2003 (17)	-173 G/C	JIA	+	+
Barton ve ark. 2003 (14)	-173 G/C,-794 5- CATT	EA	+	-
Hizawa ve ark. 2004 (70)	-173 G/C,-794 5- CATT	Atopi	+	t.e
Miterski ve ark. 2004(103)	-173 G/C,-794 5- CATT	JRA	-	t.e
Nohara ve ark. 2004 (107)	-173 G/C	ÜK	+	t.e
Donn ve ark. 2004 (45)	-173 G/C,-794 5- CATT	JIA	+	+
Flex ve ark. 2004 (56)	-173 G/C	Alzheimer	-	t.e
Donn ve ark. 2004 (47)	-173 G/C,-794 5- CATT	Psoriasis	+	t.e
Flex ve ark. 2004 (55)	-173 G/C	Stroke	-	t.e
Amoli ve ark. 2005 (3)	-173 G/C	DHA	-	t.e
Berdeli ve ark. 2005 (19)	-173 G/C	NS	+	+
Plant ve ark. 2005 (118)	-794 5- CATT	Kistik Fibrozis	+	t.e
Radstake ve ark. 2005 (121)	-173 G/C,-794 5- CATT	RA	-	+
Berdeli ve ark. 2006 (20)	-173 G/C	JRA	-	+
Sakaue ve ark. 2006 (133)	-173 G/C,-794 5- CATT	Obesite	+/-	t.e
Arıkan ve ark. 2006 (5)	-173 G/C	Biliary atresia	+	t.e
Sanchez ve ark. 2006 (134)	-173 G/C	LE	+	t.e
Awandare ve ark 2006 (8)	-173 G/C	Malaria	+	t.e
Wu ve ark. 2006 (166)	-173 G/C	Skleroderma	+	t.e
Shan ve ark. 2007 (143)	-173 G/C	KKH	+	t.e
Amoli ve ark. 2006 (4)	-173 G/C	Vaskülit	-	t.e
Plant ve ark. 2007 (119)	-794 5- CATT	Sarkoidozis	-	-
Dambacher ve ark. 2007 (39)	-173 G/C	Chron has.	+	+
Makhija ve ark. 2007 (92)	-173 G/C	Pankreatit	+	t.e
Gomez ve ark. 2007 (59)	173 G/C	Tüberküloz	+	t.e
Meyer ve ark. 2007 (100)	-173 G/C,-794 5- CATT	Prostat C	+	t.e
Rigante ve ark. 2007 (127)	-173 G/C	Ateş	+	+
Arisawa ve ark. 2007 (6)	-173 G/C	Gastrit	+	t.e
Martinez ve ark. 2007 (95)	-173 G/C	RA	+	t.e
Fei ve ark. 2008 (51)	-173 G/C	EBD (ÜK)	+	t.e
Kaznowska ve ark 2008 (73)	-173 G/C	PH	-	t.e
Vivarelli ve ark. 2008 (158)	-173 G/C	JIA	+	+

MİF ile çeşitli enflamatuvar hastalıklar arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalar 2000’li yılların başında Donn ve ark ile başlamaktadır. Donn ve ark. (46) (2001) yaptıkları çalışmada MİF -173G/C polimorfizmi ile JIA arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Baugh ve ark. (15) yaptıkları çalışmada, CATT5 sıklığının hafif seyreden RA ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada CATT7-MİF-173*C haplotip olarak değerlendirildiğinde, enflamatuvar poliartrit’e karşı duyarlılığın arttığı saptanmıştır (14). Aynı haplotip JIA için değerlendirildiğinde hastalık ile arasında belirgin bir ilişki kaydedilmiştir (45). Amoli ve ark. (2), sarkoidozis ile -173*C polimorfizmi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirlemişlerdir. -173*C polimorfizminin araştırıldığı başka bir çalışmada, JIA ile arasında duyarlılık bakımından anlamlı bir ilişki saptanırken, aynı hasta grubunda -173*C alleleline sahip olan hastaların serum ve eklem sıvısında MİF miktarının daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. -173*C alleleline sahip olan hastalarda, uygulanan steroid tedavisinin etkinliğinin (asemptomatik olan süreç) daha kısa olduğu saptanmıştır (17). Donn ve ark. (47) yaptıkları çalışmada, CATT7-MİF-173*C haplotipi ile JIA arasındaki pozitif ilişkiyi ortaya koymuşlardır. CATT7-MİF-173*C ile RA’ya karşı olan duyarlılık ve hastalık şiddeti değerlendirildiğinde, -173*C allelinin duyarlılık ilişkili olmadığı ancak hastalık şiddeti bakımından sorumlu olduğu belirlenmiştir (121). Berdeli ve ark. (20) yaptıkları çalışmada da, JRA ile -173*C polimorfizmi arasındaki anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. RA üzerine son yıllarda yapılan benzer bir çalışmada, -173*C polimorfizmi ile RA arasındaki ilişki bir kez daha gösterilmiştir (95). 2008 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada ise, JIA ile -173*C polimorfizmi arasında hem duyarlılık hem hastalık şiddeti ve aynı zamanda tedavi verilen cevap arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanırken, CATT7 ile anlamlı bir ilişki belirlenememiştir (158). Juvenil romatoid artrit, juvenil idiopatik artrit ve RA hastalarında yapılan çalışmaların ve sekans analizlerinin sonuçlarına göre -173*C allelinin promoter aktivitesinin -173*G allelinden daha fazla olduğu, bu bölgede meydana gelebilecek bir polimorfizmin fonksiyonel değişikliklere yol açabileceği, dolayısıyla hastalık şiddeti ve duyarlılığı açısından belirleyici olabileceği sonucuna varılmıştır (44).

Kronik enflamatuvar özelliğe sahip diğer hastalık gruplarından sarkoidozis ile -173*C polimorfizmi arasında duyarlılık açısından anlamlı bir ilişki bulunurken (2), ülseratif kolitis ile -173*C polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir (107). Atopi ve astım ile -794-5-CATT-MİF-173*C haplotipinin

değerlendirildiği çalışmada atopi ile ilgili anlamlı bir ilişki saptanırken, astım için benzer bir ilişki belirlenememiştir (70). Bunların dışında psoriasis, nefrotik sendrom, kistik fibroz, obezite, biliary atrezi, lupus eritematozus, sıtma, skleroderma, koroner kalp hastalığı, Chron hastalığı, pankreatitis, tüberküloz, tekrarlayan ateş, ve gastrit gibi kronik enflamatuvar hastalıklar ile -173*C ve -794-5-CATT-MIF-173*C haplotip polimorfizmleri arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır (5,6,8,19,39,47,59,92,118,127,133,134,143,166). Ancak Alzheimer, inme, dev hücreli artrit (DHA), vaskülitis, sarkoidozis (-794-5-CATT), pulmoner hamartom gibi hastalıklarla -173*C ve -173 G/C,-794-5-CATT polimorfizmleri arasında anlamlı ilişkiler bulunamamıştır (4,55,56,73,119).

Periodontal hastalıkların patogenezinin aydınlatılması ile hastalığın tanı ve tedavisinde alternatif yaklaşımların geliştirilebileceği düşünülmektedir. Genetik varyasyonlara bağlı olarak, hastalığın ortaya çıkmadan teşhisi veya kişiye özel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Halen günümüzde periodontitisin tedavisinde cerrahi ve cerrahisiz periodontal tedavi olmak üzere 2 farklı tedavi seçeneği bulunmaktadır. Cerrahisiz periodontal tedavi tüm tedavi seçeneklerinin ilk basamağıdır.

1.5. Periodontitislerin Cerrahisiz Periodontal Tedavisi

Periodontal hastalıkların nedenleri arasında dental plağın yanı sıra konağa ve çevreye bağlı faktörlerin rol aldığı bilinmektedir. Dental plak tek etken olmamasına karşın, periodontal tedavide supra ve subgingival bakteri birikimlerinin diş yüzeyi temizliği (DYT) ve kök yüzeyi düzleştirilmesi (KYD) işlemleri ile bölgede organize olmalarının önüne geçilmesi tedavinin ilk basamağıdır. Hastanın yapacağı günlük plak kontrolü ile hekimin yapacağı DYT ve KYD işlemlerini içeren cerrahisiz periodontal tedavi, periodontal enfeksiyonun giderilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu tedavide amaç; biofilm tabakasını bozmak, periodontopatojen bakterileri uzaklaştırmak ve sağlıklı bölgelerdekine benzer bir mikroflora oluşturmaktır. Cerrahisiz periodontal tedavinin klinik ve mikrobiyolojik etkinliğinin değerlendirildiği çalışmaların sonuçlarına göre; bu tedavinin bazı durumlarda subgingival bölgedeki tüm periodontopatojenlerin uzaklaştırılmasında yetersiz kaldığı belirlenmiştir (156). Bunun nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

- Özellikle ulaşımın zor olduğu furkasyon bölgeleri, çok derin cepler ve kök konkavitelerinin varlığı,

- Günümüzde kabul edilen spesifik teoriye göre, tedavide amaç, barındırdığı bakterileri antimikrobiyal tedaviye ve konak savunmasına karşı koruyan biofilm tabakasının parçalanması ve açığa çıkan periodontopatojenlerin uzaklaştırılmasıdır. Cerrahisiz periodontal tedavi ile biofilm tabakası parçalanır. Kronik periodontitis hastalarında açığa çıkan bakteriler konak savunması tarafından bölgeden başarı ile uzaklaştırılır. Ancak aynı durum agresif periodontitis hastaları için geçerli değildir. Konak savunmasındaki defektler nedeni ile AgP'in var olduğu bireyde, tedavi sonrasında bakterilerin konak savunması tarafından kolaylıkla eliminasyonu mümkün olamamaktadır.

- Bakteriler cerrahisiz periodontal tedavinin ardından sement yüzeyindeki rezorbsiyon alanları, dentin tübülleri gibi sert dokular içerisine penetre olurlar. Bunun yanında dil dorsumu, tonsiller ve ağız mukozası gibi periodontal olmayan yumuşak dokular içerisine invaze olarak bu alanları rezervuar olarak kullanılabilirler. Yapılan çalışmalarda *P.gingivalis* ve *A.a.*'nin epitel ve endotel hücrelerine penetre olabildikleri in vitro olarak gösterilmiştir (98,132). Ayrıca *A.a.*'nin makrofajlar içerisine fagositoz yolu ile girerek bu hücrelerin apoptozuna neden olduğu ortaya konmuştur (105). Bu bakterilerin ağız içi ve cebin yumuşak duvarına penetrasyonları, bakterilerin cerrahisiz periodontal tedaviden kaçabilmelerini sağlar. Bu da tedavinin başarısız olmasına veya çok erken dönemde mikroorganizmaların repopüle olabilmelerinden dolayı tedavi etkinliğinin kısa sürmesine neden olur.

- Bir diğer neden ise tedavi sonrasında cep içerisindeki periodontopatojenlerin tam eradikasyonunun sağlanamamasıdır. Haffajee ve ark. (66,67) yaptıkları çalışmalarda, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *A.a.*, *P. intermedia*, gibi bakterilerin miktarlarının cerrahisiz periodontal tedaviden sonra anlamlı şekilde azaldığını ancak mikroflora içerisinde hala yer aldıklarını belirlemişlerdir. Dougudomdocha ve ark. (49) yaptıkları çalışmada ise, *P.gingivalis*'in KP'deki derin cepler ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Periodontal tedavi sonrası *P.gingivalis*, *A.a.*, ve *P. intermedia*'nin azaldığı ve klinik olarak bu bölgelerde iyileşmelerin gerçekleştiği belirlenmiştir (49). Bir diğer çalışmada *P.gingivalis*, *A.a.*, ve *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T.denticola* değerlendirilmiş, tedavi sonrasında bu mikroorganizmaların sayısında azalma gözlenirken, Haffajee ve ark. nın yaptıkları çalışmalara benzer olarak, mikroflora içeriğinde değişiklik meydana gelmemiştir (40). Yapılan

alışmalar, KP’de var olan derin ceplerde saptanan *P.gingivalis*’in tam eradikasyonunun sağlanamadığını ortaya koymuştur.

Renvert ve ark. (124) yaptıkları çalışmada, *P.gingivalis*’in bölgeden uzaklaştırılabildiği ancak *A.a.*’nın yüksek miktarlarda bölgede kalabildiği belirlenmiştir. Bu ve benzeri alışmalar, AgP’de *A.a.*’nın sadece cerrahisiz periodontal tedavi ile tam olarak uzaklaştırılmasının çok güç olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun nedeni *A.a.*’nın dokulara penetre olabılme özelliğidir. Bu penetrasyonun engellenmesi amacı ile tedaviden sonra cerrahi tedavi uygulanmış, ancak *A.a.*’nın cerrahi sonrasında çok kısa süre için baskılandığı, bir kaç ay içerisinde ağız içindeki bölgelerden tekrar repopüle olduğu saptanmıştır (125).

Cerrahisiz periodontal tedavi ile *P.gingivalis*’in subgingival miktarının azaldığı gözlenmiştir (124). Renvert ve ark. (125) göre, *P.gingivalis* azalma oranı % 70 , Wilkstrom ve ark. (162) göre %68, Takamatsu ve ark. (153) göre ise %66 olarak saptanmıştır.

T. forsythensis değerlendirildiğinde; bir çalışmada tedavi sonrasında %43’ den %27’ ye düştüğü (67), diğer bir çalışmada %77.9’ dan %35.6’ ya (153) ve Darby ve ark. na göre ise %57.6’ dan %36.6’ ya gerilediği belirlenmiştir (40).

Yukarıda sözü edilen nedenlerden dolayı tam başarıya ulaşamayan cerrahisiz periodontal tedaviye ek olarak antimikrobiyal tedavinin uygulanması ile periodontal tedavinin amacına ulaşacağı öteden beri düşünülmektedir. Bu amaçla cerrahisiz periodontal tedaviye ek olarak uygulanan antimikrobiyal tedavi seçeneklerinden bir tanesi de sistemik antibiyotik kullanımıdır. Sistemik antibiyotik kullanımının avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- Cep içine ve periodontal dokulara serum aracılığıyla kolaylıkla ulaşılır.
- Cerrahisiz periodontal tedavi veya birlikte uygulanan lokal antibiyotik kullanımı sonucu etkilenmeyen bölgelerdeki bakterilere ulaşım sağlanmış olur.
- Periodontal olmayan ve daha sonraki enfeksiyonlar için rezervuar görevi gören dokularda (dil, tonsiller, ağız mukozası ve tükürük) bulunan bakteriler baskılanır.
- Aynı zamanda birçok bölgeyi aynı anda etkileme imkanı elde edilmiş olur.

Sistemik antibiyotik kullanımının yararları; kullanıldığı hastalık grubuna, hangi ajanın verildiğine, kullanım süresine ve dozuna bağlı olarak değişmektedir. Bu amaçla yapılan çok sayıdaki çalışmada farklı periodontal hastalık gruplarında çeşitli antibiyotiklerin etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmalara göre;

1. **Penisilin:** Cerrahisiz periodontal tedaviye karşı klinik olarak üstünlüğü saptanmamıştır. Ayrıca bu ilaca karşı bakteri direnci gelişmektedir (128).

2. **Amoksisilin:** β -laktam grubu içinde yer alır. Geniş bir spektruma sahiptir. Doku penetrasyonu yüksek olmasına rağmen, DOS seviyesi düşüktür. Bakteriler tarafından üretilen β -laktamaz enzimi etkisi ortadan kaldırılabildiği için ilacın kombinasyon ile kullanımı önerilir (128).

3. **Metronidazol:** *P.gingivalis*, *P.intermedia* gibi Gr (-) bakterilere karşı etkilidir. Ancak dar bir spektruma sahiptir. Doku ve DOS konsantrasyonu hedef bakterilerin inhibisyonu için yeterlidir (87).

4. **Tetrasiklin:** Doksisiklin ve minosiklin bu grup içerisinde yer alır. *A.a.*'a karşı etkilidir. DOS'da yüksek konsantrasyona ulaşır. Ancak sadece *A.a.*'lar üzerine etkilidir. Periodontitis gibi çoklu enfeksiyonlarda yetersiz kalmaktadır. Ayrıca uzun süreli kullanım gerektirir (136).

5. **Klindamisin:** Gr (+) koklara ve Gr (-) çubuklara karşı etkilidir. *A.a.* üzerine olan etkisi sınırlıdır. Gastrointestinal sistem rahatsızlıklarına neden olduğundan kullanımında dikkatli olunmalıdır (160).

6. **Siprofloksasin:** *A.a.* başta olmak üzere birçok periodontopatojen üzerine etkilidir. Doku ve DOS konsantrasyonları yüksektir (146).

Periodontal hastalıkların çoklu enfeksiyonlar olmasından dolayı, antibiyotiklerin sinerjistik etkilerinden yararlanmak amacıyla ilaç kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak alınan ilaç miktarının artması kullanımı zorlaştırmakta ve yan etki riskini arttırmaktadır.

Periodontal hastalıklarda cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanılan bir diğer ilaç ise Makrolid türevi olan azitromisin grubu antibiyotiklerdir. Yarı sentetik ve aside dayanıklı olan azitromisin;

1. Gr (-) bakterilere karşı etkilidir (Porphromonas türleri, Provetella türleri, A.a., spiroketler) (114,115,126),
2. Mide asidine karşı dayanıklı olduğundan dolayı oral absorpsiyonu oldukça yüksektir. Doku konsantrasyonu serum seviyesinden 10-100 kat daha fazladır (23,57,60).
3. Fibroblast ve fagositik hücreler içerisine penetre olmaktadır. Böylece enfeksiyon bölgesine kolaylıkla taşınır. Yapılan çalışmalarda enfeksiyon bölgesinde sağlıklı bölgeye göre daha yüksek konsantrasyonda saptanması bu şekilde açıklanabilir (58)
4. Salımı oldukça yavaştır. Bunun bir nedeni yarılanma ömrünün uzun olmasıdır. Bir diğer nedeni ise fibroblast ve fagositik hücrelere penetre olabilmesidir. Salınması bu hücrelerin lizisini takip eder. Yapılan bir çalışmada 500 mg' lık tek doz verildikten 7 gün sonra hala tonsillerde saptanabildiği gözlenmiştir (23,57). 3 günlük normal dozunun 7-10 gün arasında dokuda saptanabildiği bildirilmiştir. Fibroblastlar ve fagositik hücreler azitromisin için rezervuar görevi görürler.
5. 3 günlük dozu ve minimum yan etkisi ile hastalara kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Literatürde periodontitisin tedavisinde cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak azitromisinin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Tablo 3' de azitromisinin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar görülmektedir. Haas ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışma, AgP tedavisinde azitromisinin etkinliğinin değerlendirildiği tek çalışmadır. Diğer çalışmaların tümü azitromisinin kronik periodontitis üzerine olan etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalardır. Haas ve ark. (64) yaptıkları çalışmada, başlangıç ile 12. ay değerleri karşılaştırıldığında test grubunda plasebo grubuna göre sondalanan cep derinliğinde daha fazla azalma olduğu görülmüştür (2.88 mm-1.85 mm, $p=0.025$). Benzer şekilde klinik ataşman kazancının ≥ 1 mm olduğu bölge sayısı, test grubunda daha yüksek bulunmuştur (%81.34-%63.63 $p=0.037$). Kronik periodontitisli hastalarda yapılan çalışmalardaki sonuçlar; başlangıç SCD ≥ 6 mm olduğu bölgelerde ek olarak azitromisin

kullanımının, yalnız cerrahisiz periodontal tedaviye göre daha başarılı olduğunu göstermektedir. Haffajee ve ark. (68) nın 2007 yılında yaptıkları çalışmada, sadece cerrahisiz periodontal tedavi ile cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak azitromisin, metronidazol ve düşük doz doksisisiklin (DDD) kullanımının etkinliği karşılaştırılmıştır. Tüm hastalarda başlangıca göre SCD ve KAK değerlerinde anlamlı olumlu gelişmeler saptanmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında metronidazol ve azitromisin gruplarında DDD ve yalnız cerrahisiz periodontal tedaviye oranla SCD daha fazla azalma ve KAK daha fazla kazanç olduğu gözlenmiştir. Özellikle metronidazol ve azitromisin grubunda diğer gruplara göre $SCD \geq 6$ mm olduğu bölgelerde anlamlı gelişmeler kaydedilmiştir. Gomi ve ark. (61) tarafından 2007 yılında yapılan bir diğer çalışmada da, azitromisinin etkinliği değerlendirilmiştir. Test ve kontrol grubunda SCD ve KAK için başlangıca göre anlamlı değişiklikler meydana gelirken, test grubunda kontrol grubuna göre SCD’de istatistiksel olarak anlamlı düşüşler saptanmıştır. Mascarenhas ve ark. (96) tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada ise, her iki grupta başlangıca göre anlamlı gelişmeler gözlenmiştir. Test grubunda SCD 4-6 mm ve ≥ 6 mm olduğu bölgelerde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar belirlenmiştir. 2002 yılında Smith ve ark. (147) tarafından yapılan çalışmada da, diğer çalışmaları destekler şekilde $SCD \geq 6$ mm olduğu bölgelerde test grubunda kontrol grubuna göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3: Azitromisin’ in periodontitis üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar.

Araştırmacı	Hastalık Grubu	Hasta Sayısı	Plasebo	Kontrol	SCD* etkisi	KAK* etkisi
Haas ve ark. (64)	AgP	12/12	+	-	+	+
Gomi ve ark. (61)	KP	17/17	-	+	+	+
Haffajee ve ark. (68)	KP	25/24	-	+	+	+
Mascarenhas ve ark. (96)	KP	15/16	-	+	+	+
Smith ve ark. (147)	KP	22/22	+	-	+	+

*Azitromisin grubunun karşılaştırıldığı kontrol veya plasebo grubuna göre üstünlüğü.

Yaptığımız literatür taramasında, MİF ile çeşitli periodontal hastalıklar arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanamamıştır. Günümüze değin yapılan bir çalışmada, herhangi bir hastalık grubu belirtilmeden alınan dişeti dokusu örneklerinde MİF’in ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir (104).

Kronik enflamatuvar bir hastalık olan RA ile periodontitisin benzer patogenezlere sahip olduğu bilinmektedir. RA'nın patogenezinde etkin bir role sahip olan MİF'in ekspresyonunun bu hastalıkta yüksek olması ve bu ekspresyonun MİF'in polimorfizmi ile ilişkili bulunması, MİF'in periodontitisin patogenezinde de etkin bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. MİF'in enflamatuvar ve immün yanıtta etkin rolünden dolayı, MİF gen polimorfizminin periodontitise yatkınlık ve hastalık şiddeti ile ilişkili olabileceği, ayrıca uygulanan tedaviye verilen yanıtta rol oynayabileceği hipotezi kurulabilir. Ancak, literatürde MİF polimorfizmi ile periodontitis arasındaki ilişkiyi değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca MİF'in dişeti oluğu sıvısı (DOS) protein düzeyini değerlendiren herhangi bir çalışma da mevcut değildir. Doku içindeki ekspresyonu ile birlikte DOS'daki konsantrasyonunun yüksek saptanması durumunda, bu yüksek değerlerin MİF'in gen ekspresyonu ile ilişkili olabileceği varsayımı araştırmamızın ortaya konmaya çalışılan ikinci hipotezidir. Bu noktadan hareketle araştırmamızın amaçlarını aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

1. Şiddetli KP ve AgP ile MİF promoter polimorfizmi arasındaki olası ilişkiyi belirlemek için KP ve AgP hastalarında MİF -173 G/C promoter polimorfizmini incelemek,
2. MİF -173 G/C genotip dağılımının fenotipe nasıl yansıdığını belirlemek,
3. MİF'in doku ve DOS ekspresyon miktarları ile MİF gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemek,
4. Genetik yatkınlığın periodontal tedavi başarısını etkileyebileceği düşüncesinden yola çıkarak, bu hastalarda cerrahisiz periodontal tedavi ve buna ek olarak azitromisin kullanımı sonrasında tedaviye verilen klinik ve biyokimyasal yanıtlar ile incelenen polimorfizm arasındaki ilişkileri değerlendirmek.

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Hasta Seçimi

Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniğine Ekim 2004-Ekim 2007 yılları arasında başvuran 122 şiddetli AgP hastası ile 97 şiddetli KP hastası çalışmaya dahil edildi. Sistemik ve periodontal olarak sağlıklı 124 birey ise kontrol grubunu oluşturdu. Şiddetli AgP ve KP grubundaki bireyler beyaz ırka mensup, Ege bölgesinde yaşayan ve düşük-orta gelir grubunda bulunan bireylerden oluştu. 2004 Helsinki deklarasyonu etik kuralları rehberliğinde gerçekleştirilen çalışma için Ege Üniversitesi Etik Kurulundan onay alındı (04-6/28 – M-389, B.30.2.EGE.0.01.00.00/70M/1278). Tüm bireyler çalışmaya başlamadan önce hazırlanmış olan Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu okuyarak yazılı onaylarını verdiler.

Şiddetli AgP ve KP ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin medikal ve dental anamnezleri alındı. Çalışmamıza dahil edilen tüm bireylerin sistemik olarak sağlıklı olmaları ön koşulu arandı. Bireylerin seçiminde sistemik sağlığa bağlı dışlanma kriterleri aşağıda belirtildiği gibidir;

1. Diyabet gibi endokrin sistem rahatsızlıkları olanlar,
 2. Myokard enfarktüsü veya By-Pass ameliyatı geçirenler, angina gibi kardiyovasküler sistem hastalıkları olanlar,
 3. Yapılacak tedavilerden önce antibiyotik profilaksisi gereken hastalar,
 4. İmmun sistem hastalıkları olanlar ve immunsupresif ilaç kullananlar,
 5. Kronik antienflamatuvar ilaç kullananlar,
 6. Hamilelik veya laktasyon döneminde olan bayanlar,
 7. Günde >10 sigara içenler,
 8. 6 ay öncesine kadar antibiyotik kullanmış olanlar,
 9. 6 ay öncesine kadar periodontal tedavi görmüş olanlar,
 10. Kullanılacak antibiyotiğe karşı bilinen allerji hikayesi olanlar
- çalışma dışında bırakıldı.

Çalışmamıza hiç sigara içmeyenler ile son 5 yıldan bu yana günde 10 adet sigaradan daha az içen bireyler dahil edildi. Medikal ve dental anamnezi uygun olan hastaların periodontal durumlarının belirlenmesi amacıyla klinik ve radyografik değerlendirilmeleri yapıldı. Şiddetli AgP ve KP grubunu oluşturacak hastalarda dahil edilme kriterleri aşağıdadır (169).

Şiddetli KP:

1. 35 yaşın üstünde olması,
2. Ağızda ≥ 15 diş bulunması,
3. En az iki ayrı kadranda ve en az dört bölgede ≥ 5 mm klinik ataşman kaybının bulunması,
4. Tüm ağız aproksimal bölgelerde sondalamada kanamanın % 50' den fazla olması,
5. Radyografide ilgili dişlerde alveol kemik kayıplarının olması,
6. Ağız içindeki plak ve lokal faktörlerin hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olması.

Şiddetli AgP:

1. 35 yaş altında olması
2. Ağızda ≥ 15 diş bulunması
3. KAK ≥ 4 mm olan en az 8 dişin bulunması
4. Radyografide ilgili dişlerin çevresinde vertikal kemik kayıplarının bulunması,
5. Ağız içindeki plak ve lokal faktörlerin hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olmaması.

Sağlıklı Kontrol Grubu:

1. Geçirilmiş periodontal hastalık hikayesinin olmaması,
2. ≥ 20 diş bulunması,
3. Sondalanan cep derinliğinin (SCD) ≤ 3 mm ve klinik ataşman kaybının ≤ 2 mm olması,
4. tüm ağız için kanamalı bölge sayısının $\leq \%20$ olması,
5. radyografik incelemede tüm dişlerin % 95' inde mine-sement sınırı ile alveol kemik kreti arasındaki mesafenin ≤ 3 mm olması.

2.2 Periodontal Durumun Saptanması

Araştırmaya alınan bireylerin 3. molar dişleri hariç tüm dişlerinden klinik periodontal parametreler tek araştırmacı tarafından değerlendirildi. Williams periodontal sondası kullanılarak ölçümler yapıldı.

Sondalanan Cep Derinliği (SCD); dişeti kenarı ile periodontal cebin tabanı arasındaki mesafe olarak değerlendirildi.

Klinik Ataşman Kaybı (KAK); mine-sement sınırı ile periodontal cebin tabanı arasındaki mesafe olarak ölçüm yapıldı.

Kanama; sondalanan bölgelerde kanamanın var/yok olması şeklinde saptandı. Ayrıca örnekleme yapılan bölgelerde papil kanama indeksi (PKİ) ile değerlendirme yapıldı (138).

Plak İndeksi; Tüm ağız bazik-fuksin ile boyanarak plak var/yok olarak belirlendi. Tüm ağız için % olarak saptandı. Ayrıca örnekleme bölgeleri için Quiley&Hein (1962) plak indeksi kullanılarak değerlendirme yapıldı (120).

2.3 Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

MİF polimorfizminin değerlendirilmesi için gerekli moleküler analizlerin yapılması amacıyla tüm bireylerden 2 ml periferik kan örnekleri % 15 K₃ EDTA içeren vacuette (Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, Austria) tüplere alınarak, analizlerine kadar -40 °C’ de saklandı

2.4. Dokudaki MİF mRNA Düzeylerinin Real Time-PCR ile Değerlendirilmesi Amacıyla Doku Örneklerinin Toplanması

24 KP’li, 23 AgP’ li hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubundaki bireyden, komşu iki dişin birbirlerine bakan yüzeylerinde SCD $\geq$ 6 mm olduğu ve PKİ 4 olan bölgelerden MİF mRNA düzeylerinin belirlenmesi amacı ile dişeti dokusu örnekleri alındı. Seçilen bölgenin dişeti oluşu sıvısı örnekleri alındıktan sonra lokal anestezi altında bistüri ile aproksimal dişetinin epitel ve ~ 3 mm derinliğinde bağ dokusunu içine alacak büyüklükteki doku örnekleri alındı. Elde edilen dokular steril tüplerde bulunan 750µl RNA later içerisine konarak, analizlerine kadar -80 °C’ de saklandı.

2.5 Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinde ELİSA Yöntemi ile MİF Enzim Düzeylerinin Saptanması

28 KP'li, 32 AgP' li hasta ve 44 sağlıklı kontrol grubundaki her bireyin tek köklü dişinin SCD ≥ 6 mm olduğu aproksimal bölgesinden DOS örnekleri elde edildi. Aktif periodontal tedaviden hemen sonra, 2. hafta, 1. ay, 3. ay ve 6. aylarda örneklemeler tekrarlandı. Bunun yanında doku örnekleme yapılacak olan bölgelerden de DOS örnekleri alındı.

DOS örnekleme yapılacak olan diş yüzeyindeki supragingival plak dikkatlice kaldırıldıktan sonra, bölge pamuk rulolar ile tükürükten izole edilip, hava spreyi ile kurutuldu. Ardından DOS örneğinin elde edilmesinde kullanılan Periopaper (Proflow, Inc., 1500, Amytyville, NY, USA) sulkus içerisine atravmatik olarak yerleştirilerek 30 sn boyunca beklendi. Kanla kontamine olan örnekler değerlendirme dışı bırakıldı. Elde edilen DOS miktarı önceden kalibre edilmiş Periotron 8000 (Proflow, Inc., 1500, Amytyville, NY, USA) elektronik dişeti oluğu sıvısı ölçüm cihazı ile belirlendi. Eppendorf tüpler içerisine konan stripler analizlerine kadar -40°C ' de saklandı.

2.6 Çalışmanın Özellikleri

Araştırmamız randomize, çift kör, plasebo kontrollü ve paralel dizayn olarak planlandı.

Randomizasyon: Ölçüm ve tedavileri gerçekleştiren araştırmacıdan farklı bir araştırmacı tarafından KP grubu 1'den 28'e, AgP grubu 1'den 32'ye kadar numaralandırıldı. Kullanılacak olan antibiyotik veya plasebo ilaç bu araştırmacı tarafından rastgele olarak sıralandı. Cerrahisiz periodontal tedavisi tamamlanan hastalara ilaçlar bu araştırmacı tarafından numara sırası ile verildi.

Plasebo Kontrol İlaç: Çalışmada makrolid grubu içerisinde yer alan azitromisin (Zitromax, 500 mg) türü antibiyotik cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanıldı. Plasebo grubunda ise hastalara mısır nişastası, ilaç grubuna benzer film tabletler içerisinde verildi. Verilecek olan antibiyotik ile plasebo grubu ilaçların aynı görüntüde olması için şeffaf film tabletler kullanıldı. Film tablet içine yerleştirilen antibiyotiğin etrafı mısır nişastası ile doldurularak, ilaç görünmez hale getirildi (Şekil 11). Plasebo grubunda ise film tablete sadece mısır nişastası dolduruldu (Şekil 12).

İlaçlar, üzerinde ilaç ile ilgili bilgilerin bulunduğu etiketli şişeler içerisinde hastalara verildi. Hastalardan ilacın bitiminde boş şişeleri geri getirmeleri istendi.



Şekil 11: Antibiyotiğin görünümü



Şekil 12: Plasebonun görünümü

Çift Kör Özelliği: Hastaya hangi ilacı kullandığı konusunda bilgi verilmedi. Benzer olarak randomizasyonu ve ölçümleri gerçekleştiren araştırmacılar da hangi ilacı hangi hastanın kullandığı bilgisine sahibi değildi. Araştırma aynı anda her iki gruba da cerrahisiz periodontal tedavi uygulanıp ilaç/plasebo verilerek paralel dizaynda gerçekleştirildi.

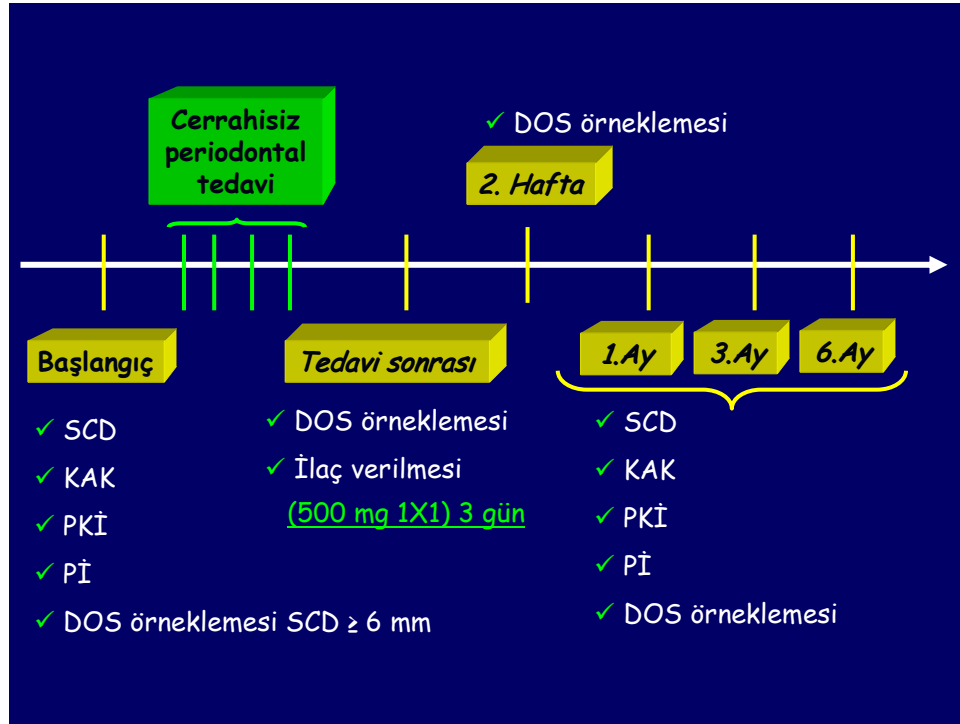
2.7. Cerrahisiz Periodontal Tedavinin Uygulanması

Araştırmaya katılan 32 şiddetli AgP ve 28 şiddetli KP hastasından DOS örnekleme, periferik kan ve dişeti doku örneklerinin alınmasından sonra, belirlenen cerrahisiz periodontal tedavi protokolüne göre hastaların tedavileri tamamlandı. Aktif tedaviden sonra hastalar destekleyici periodontal tedavi programına alındı.

Çalışmamıza dahil edilen hastalara tedaviye geldikleri ilk seansta periodontal hastalıkların nedenleri, ilerleyişi ve tedavisi konusunda bilgi verildi. Plak boyayıcı ajanlar kullanılarak, ağız içindeki plak görünür hale getirildi ve hastalara ayna yardımı ile ağıziçi gösterilerek günlük plak kontrolünün önemi anlatıldı. Maket üzerinde modifiye Bass tekniği ile diş fırçalama ve gereksinimlere bağlı olarak dişipi ve/veya arayüz fırçası önerildi. Fırçalama ve arayüz araçlarının kullanımı takip eden seanslarda kontrol edildi.

İlk seansta hastalara, supragingival diştaşı ve iyatrojenik iritanların uzaklaştırılması amacıyla ultrasonik cihazlar ile diş yüzeyi temizliği yapıldı. Ağız 4 kadrana ayrılarak haftalık seanslarla, Gracey küretler kullanılarak lokal anestezi altında subgingival diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi işlemleri 4 haftada tamamlandı. Tedavinin tamamlanmasından 1 hafta sonra DOS örnekleri

toplandı ve bu seansta hastalara antibiyotik (Zitromax 500 mg) veya plasebo 3 gün, günde tek doz kullanılacak şekilde verildi. Takip eden 2. haftada DOS örnekleme si tekrarlandı. 1. ay, 3.ay ve 6. ay takiplerinde DOS örnekleme si ile birlikte klinik periodontal parametrelerin ölçümleri tekrarlandı (Şekil 13). Kontrol seanslarında ağız hijyeni durumu değerlendirilerek, günlük ağız bakımı eğitimi tekrarlandı. Ultrasonik cihazlarla subgingival alana ulaşmadan supragingival diş yüzeyi temizliği ve polisaj işlemleri uygulandı.



Şekil 13: Çalışma izlem şeması. SCD: Sondalanan cep derinliği, KAK: Klinik ataşman seviyesi, PKİ: Papil kanama indeksi, Pİ: Plak indeksi: DOS: Dişeti oluşu sıvısı.

2.8. MİF Genotipinin Saptanması

2.8.1. Gerekli Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

- Invitek DNA izolasyon kiti (Katalog No: CA050036)
- Su banyosu (Nüve BM 302)
- Santrifüj (Sigma 1-15)
- Vorteks (Heidolph Reaks Top)
- Mikro pipetler (1-100 µl ve 1-1000 µl)

- Steril beyaz ve sarı pipet ucu (Brand)
- 1.5 ml'lik ependorf (Axygen)

2.8.1.1. DNA Amplifikasyonu ve Kontrolü

- Termal cyclers (GeneAmp PCR System 9700)
- Mikro pipetler (1-10 µl ve 10-100 µl, Scorex, Rainin)
- Steril beyaz ve sarı pipet ucu (Brand)
- 0.5 ml'lik ependorf (Axygen)
- 0.2 ml'lik ependorf PCR tüpleri (Axygen)
- Otoklav (Hirayama)
- Ependorf taşıyıcıları
- Buz kalıbı
- Deiyonize su
- Mineral yağ (sigma, M-5904)
- DNA Taq polimeraz, Tampon $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ve MgCl_2 (25mM, 1.0 ml) (MBI-Fermentase #EP0402)
- dNTP karışımı (MBI- Fermentase #R0181)
 - 20 mM dATP
 - 20 mM dGTP
 - 20 mM dCTP
 - 20 mM dTTP
- MIF geni primer dizileri:

Forward: 5'-ACTAAGAAAGACCCGAGGC - 3'

Reverse: 5'-GGGGCACGTTGGTGTTTAC – 3'

* Primerler stok olarak 100 pmol / µl olacak şekilde sulandırılmış ve 25 µl'lik amplifikasyonda 5 pmol/µl konsantrasyonunda hazırlanarak kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi için gerekli alet ve kimyasallar:

- Yatay elektroforez ve ekipmanları
- Güç kaynağı (Hybaid PS250)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Erlen mayer (250 ml)
- Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml)
- Pipetler (5 ml, 10 ml)

10X Tris Borat Tamponu (TBE) elektroforez tamponu için gerekli kimyasallar:

1. Tris baz 108 gr. (Merck, K211570687- 744)
2. Borik asit 55 gr. (Carlo erba, 302177)
3. Na-EDTA 8,3 gr. (Sigma, E-5134)

Yükleme Tamponu:

- Gliserol (AppliChem) 55 ml
- 1XTAE tampon 45 ml
- Orange G 0.1 gr
- Agaroz (Sigma A- 9539)
- Etidyum Bromür* (10mg/ml) (Sigma):

Etidyum bromür	→	1 gr
Ultrapür (deiyonize) su	→	100 ml
- DNA markır
100 bp DNA Ladder; 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp (Fermentas SM0388)

2.8.1.2. Enzim Kesimi ve Değerlendirilmesi

- Mikro pipetler (1-10 µl ve 10-100 µl, Scorex, Rainin)
- Steril beyaz ve sarı pipet ucu (Eppendorf)
- 0.5 ml'lik eppendorf (Axygen)
- Su banyosu (Nüve BM 302)
- Parafin (Parafilm)
- Alu1 restriksiyon endonükleaz enzimi ve Tamponu (MBI- Fermentas # ER 0011)
 - Konsantrasyon => 10 ünite/µl
 - Tampon 0⁺
 - 33 mM Tris-asetat (pH 7.9)
 - 10 mM Magnezyum asetat
 - 66 mM Potasyum asetat
 - 0.1 mg/ml BSA

2.8.2.DNA İzolasyonu

Agresif ve kronik periodontitis ile sağlıklı kontrol grubuna ait kan örneklerinden Invitek DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA'lar izole edildi. DNA izolasyonu aşamaları kısaca şu şekildedir:

- a) 1.5 ml'lik eppendorfa EDTA'lı kandan 200 µl alındı.
- b) Üzerine 200 µl lysis (parçalama) tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklenerek vorteksle homojenizasyon yapıldıktan sonra 56 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
- c) 400 µl binding (bağlama) tamponu eklenerek pipetaj yapıldı ve içerisine filtre yerleştirilmiş olan 2 ml'lik eppendorfa aktarıldı.
- d) 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
- e) Filtreler yeni bir eppendorfa alınarak yıkama işlemine geçildi. İlk olarak yıkama solüsyonu 1'den 500 µl eklenerek 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından dipte biriken sıvı dökülerek yıkama solüsyonu 2'den 800 µl eklendi ve yine aynı şekilde santrifüj edildi.

f) Yıkamanın sonunda dipte biriken sıvı dökülerek filtreler boş ependorfta maksimum hızda 4 dk. santrifüj edildi.

g) En son aşamada ise filtreler yeni ependorflara alınarak 200 µl elution (ayırıştırma) tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyondan sonra 10.000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilerek DNA tüpte toplandı.

2.9. RFLP-PCR yöntemi ile MİF -173 G/C Genotiplenmesi

2.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); DNA’nın incelenmek istenen bölgesinin yapay olarak hazırlanmış oligonükleotit primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntem, çift zincirin birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerlerin denatüre edilerek ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması (annealing) ve hedef bölgeye karşılık gelen zincirin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi (extension) şeklinde 3 temel aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar bir döngü olarak kabul edilir ve ortalama 25-35 döngü uygulanır. Çalışmada kullanılan primerlerin konsantrasyonu 5 pmol/µl, Taq polimeraz 1,5 U / 25 µl’dir.

Tablo 4: Amplifikasyon Karışım Oranları

Amplifikasyon Karışımı	Bir Örnek İçin
Deiyonize Su	9.75 µl
GeneAmp Tampon	2.5 µl
MgCl ₂	1.75 µl
dNTP	1.2 µl
Primer R	1 µl
Primer F	1 µl
AmpliTaq polimerase	0.3 µl
Genomik DNA	7.5 µl

- Tek bir örnek için hazırlanan karışım toplam 25 µl olacak şekildedir.

Tablo 5: PCR işlemleri için uygulanan program

PCR Koşulları	Isı/Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç	95 °C / 5 dk.	1
Tur	95 °C / 45 sn.	35
	60 °C / 45 sn.	
	72 °C / 45 sn.	
Son ısı	72 °C / 5 dk.	1
Saklama ısısı	4 °C	∞

2.9.2. Amplifikasyon analizi

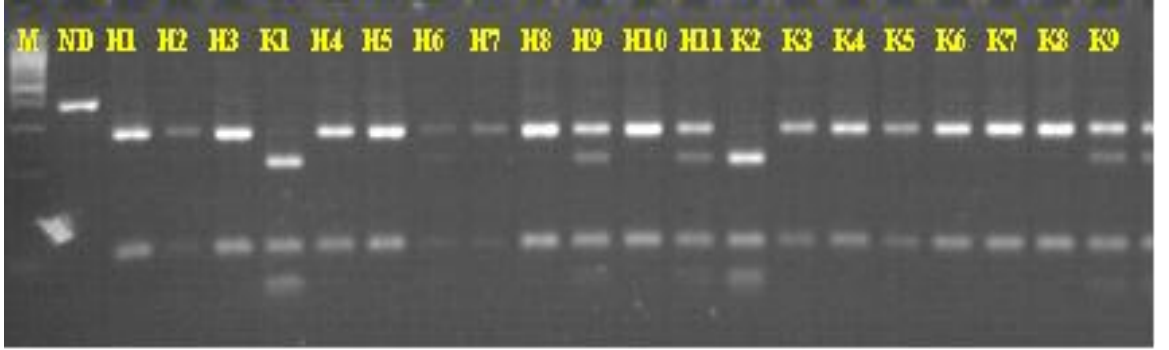
PCR amplifikasyonun kontrolü %2.0'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Bunun için önce yatay elektroforez tabağının iki kenarını kapatmak için yapılmış olan kalın lastik bariyerler takıldı. 250 ml'lik erlen içerisinde 2.0 gr agaroz ve 100 ml 0.5xTBE konulup erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Folyo üzerinde birkaç küçük delik açıldıktan sonra bu karışım, arada çalkalayarak homojen olana kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Sonra 14 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldı ve daha önce hazırlanan tabağa döküldü. Jel donduktan sonra bariyerler çıkartılıp içinde 0.5xTBE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilerek tarak çıkarıldı. Bir parça parafilm üzerinde 6µl orange G (yükleme tamponu) ile 9 µl PCR ürünü karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 2 cm yürütüldükten sonra U.V altında görüntülendi.

2.9.3. Enzim Kesimi

Amplifikasyon boyutu beklediğimiz bölgede çıkan PCR ürünleri, restriksiyon enzimi (*Alu I*) kullanılarak kesildi. Kesim karışımı;

PCR ürünü → 10.5-12 µl
Buffer → 3.5 µl
Alu I → 1.5 µl

Karışım 0.5 ml'lik ependorf tüpe konup ağzı parafinle kapatıldı. Kısa bir santrifüjden sonra 37°C de bir gece (O/N) inkübasyona bırakıldı. Bu enzim -173 bölgesinde G alleli olması durumunda (homozigot G) bir noktadan kesim yaparak, toplam 366 bp olan DNA parçasını 268 bp ve 98 bp olmak üzere iki parçaya ayırdığı, Heterozigot GC genotipi olması durumunda, 268, 205, 98 ve 63 bp uzunluğunda 4 parçaya ayırdığı ve son olarak homozigot C allelinin olması durumunda da 205, 98 ve 63 bp uzunluğunda olmak üzere 3 parçaya ayırdığı gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14: MIF genine ait PCR-RFLP sonuçları M: markır (Fermantas #SM0388), ND: Kesilmemiş PCR ürünü, GG genotipi: H1-3, H4, H5, H7, H8, H10, K3-8, GC genotipi: H6, H9, H11, K9, CC genotipi: K1, K2.

2.10. MİF cDNA Elde Edilmesi

2.10.1. Qiagen RNeasy Mini Kit Protokolü

- 80 °C saklanan ve 750µl RNA later'da stabilize edilen yaklaşık 30 mg civarındaki diş eti örnekleri analizleri için oda sıcaklığına getirildi. Kit protokolüne uygun olarak her örneğe 600 µl RLT buffer eklendi. Ardından örneklerin Homojenizatör* ile mekanik olarak parçalanması sağlandı. Örnekler “3” en yüksek (14,000 RPM) devirde santrifüjlenerek süpernatantların dibe çökmesi sağlandı. Elde edilen süpernatantlar DNase ve RNase dan arındırılmış yeni steril 1,5 ml lik eppendorflara alındı ve üzerilerine 600 µl % 70 lik alkol eklenerek pipet ile karıştırıldı. Daha sonra 2 ml lik kolonlara aktarıldı. 10,000 RPM de 15’’ santrifüj edildi. Örneklerle 700 µl RW1 solüsyonu ilave edildi. 10,000 RPM de 15’’ tekrar santrifüj edildi. Örneklerle 500 µl RPE solüsyonu ilave edildikten sonra 10,000 RPM

de 15'' daha santrifüj edildi. 500 µl RPE solüsyonu ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra tekrar 10,000 RPM de 15'' santrifüj edildi. Ardından temiz tüplere aktarılan örnek kolonları alkolü uzaklaştırmak amacıyla boş olarak 14,000 RPM de 1' santrifüjlendi. 1,5 ml lik steril eppendorflara alınan örnek kolonları 50 µl RNase free water eklenerek oda ısısında 1' bekletildikten sonra 10,000 RPM de 1' santrifüj edilerek RNA eldesi yapıldı. RNA örneklerinin her birinden 1 µl alınarak Nanodrop spektrofotometrede (The Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer DE, USA) okutularak örneklerdeki RNA miktarı ng/µl olarak elde edildi. Bu değerlere göre her örnekten alınacak olan RNA miktarı belirlendi.

2.10.2. cDNA elde edilmesi

Elde edilen RNA' ların cDNA formuna çevrilmesinde Reverse-Transcription Reaction Kit (Qiagen) kullanılmıştır. Tablo 6'da belirtilen reverse transcription master mix eppendorflara koyulduktan sonra üzerilerine template RNA eklendi. Birbirleri içerisinde karışabilmeleri için vortekslendi. Ardından thermal cyclers içinde 42 °C 'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra quantiscript reverse transcriptase inaktivasyonu için 95 °C' de 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemten sonra cDNA elde edilmiş oldu.

Tablo 6: Reverse transkripsiyon reaksiyon içeriği.

İçerik	Miktar
Reverse-Transcription Master Mix	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 ul
Quantiscript RT Buffer	4 ul
RT Primer Mix	1 ul
Template RNA	
Genomik DNA	14 ul
Toplam	20 ul

2.11. Real Time-PCR ile MİF mRNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi

MİF geninin mRNA ekspresyon analizlerinin yapılması için MİF genine özgü ve bunun yanısıra referans gen olarak kullanılan PRL'ye özgü floresan işaretli primer-problar (PrimerDesign, Southampton, İngiltere) sentezletildi.

MİF-5'F-CCCGCACAGGGTCTACATCAACTAT-3' – MİF dizisi

MİF-5'FAM-TACGACATGAACGCGGCCAATGTGG-TAMRA-3' – MİF Probu

MİF-5'R-GCTCTTAGGCGAAGGTGGAGTTGTT-3'

Housekeeping gen olarak RPL kullanıldı.

RPL-5'-F-TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3'

RPL-5'FAM-AGCCACATCGCTCAGACACCATGGG-TAMRA-3'

PCR reaksiyonları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde hazırlandı:

Primer/ prob miks:	1 µl
2x Mastermiks :	10 µl
cDNA :	10 µl
H ₂ O :	4 µl

Toplam: 25 µl

Reaksiyonlar ABI Prism 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, CA, USA

aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95 °C' de	10dk	}	50 döngü
95°C' de	15 sn		
60°C' de	60 sn		

Amplifikasyon verilerinin okunması işlemi “Green” kanalda yapıldı. Green kanal, Sybr Green veya FAM gibi boyalara ait dalga boyunu tespit eden kanaldır. Bu çalışmada FAM işaretli probalar kullanıldığından dolayı veri toplama işlemi Green kanalda yapıldı. Sonuçlar rölatif kantitasyon analizi ile değerlendirilip her bir örneğe ait MİF ve RPL ekspresyon değerleri elde edildi. Şiddetli AgP ve KP gruplarına ait MİF mRNA değerleri sağlıklı kontrol grubunun değerlerine göre normalize edildi. Bu değer $\Delta\Delta C_T$ değeri olarak belirlendi. Veriler $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoduna göre elde edildi.

2.12. ELİSA Yöntemi ile DOS MİF Enzim Düzeylerinin Saptanması

Dişeti oluğu sıvısındaki MİF miktarı The Quantikine Human MİF Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA) kiti kullanılarak belirlendi. Bu kit yaklaşık 3,5 saatlik bir sürede tamamlanan ve solid-faz ELISA tekniğine dayalı bir yöntemi içermektedir. Kit içerisinde önceden MİF'e spesifik monoklonal antikorların kaplandığı mikrolakalar bulunmaktadır. Deney öncesinde stripler 100 µl fizyolojik tuz solüsyonunda (PBS) 45 dakika çalkalayıcı üzerinde çözünmeye bırakıldı. Daha sonra bu solüsyondan 10 µl örnek alınarak 90 µl kit içerisinde bulunan Calibrator Diluent ile karıştırıldı. Her örnek 1/10 oranında dilue edilerek hazırlandı. Kit içerisinde bulunan ve kantitatif tayin yapmaya imkan tanıyan liyofilize toz MİF standart distile su ile çözüldükten sonra dilue edildi ve değişik miktarlardaki MİF standartları hazır hale getirildi. Standart şişesi çözüldükten sonra -20 C° de saklandı. Bu esnada kit içinde bulunan diğer solusyonlar da buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. MİF antikorları ile kaplı olan mikrolaka paketinden çıkartılıp her bir kuyucuğa 100 µl Assay Diluent buffer eklendi. Bunun üzerine de daha önceden dilue edilerek hazırlanmış örnekler ve kit içinde bulunan MİF standartları her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi. Mikrolakaların üzeri kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında mikrolaka çalkalayıcısında (500±50 rpm) inkubasyona bırakıldı. Bu arada kit prosedürüne uygun olarak Wash buffer (yıkama solüsyonu) hazır hale getirildi. 2 saat sonunda mikrolakalar temiz havlu peçeteler üzerine ters çevrilerek içindeki bütün solüsyon aspire edildi. Her bir kuyucuk 400 µl wash buffer ile doldurulup mikrolakalar çalkalanarak yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi 4 kere tekrarlanıp en son yıkamadan sonra kuyucukların içerisinde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara kit içerisinde hazır bulunan MİF Conjugate solusyonundan 200 µl koyuldu. Mikrolakaların üzeri kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda mikrolakalar daha önceki gibi 4 kez yıkanarak temizlendi. Yıkama sonrası kuyucuklara 200 µl Substrate solüsyonundan eklendi. Substrate solüsyonu kit içerisinde bulunan Color Reagent A ve B adlı iki ayrı solüsyonun eşit miktarlarda karıştırılması sonucunda hazırlandı. Bu iki solüsyonun karıştırılması, reaksiyon ışığa duyarlı olduğundan, karanlık bir ortamda gerçekleştirildi. Substrate solüsyonu eklenen mikrolakalar alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Ardından 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanmadan

bekletildi. Yarım saatin sonunda tüm kuyucuklardaki reaksiyonu aynı anda durdurabilmek amacıyla her bir kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonun eklenmesiyle kuyucuklarda meydana gelmiş olan mavi renk sarıya dönüştü. Eğer renk değişimi gözlenmezse mikrolakalar hafifçe çalkalanmak suretiyle renk değişiminin oluşumu gözlemlendi. Daha sonra mikrolakalar mikrolaka okuyucuya yerleştirildi. Her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), 450 nm dalga boyunda ve 540 nm referans aralığında, yarım saat içerisinde okutuldu. Kitin içerisinde hazır olarak bulunan MİF standartlarından oluşturulan standart eğri temel alınarak her bir kuyucuktaki MİF miktarı (ng/mL) kantitatif olarak cihaz tarafından hesaplandı.

2.13.RFLP-PCR ve RT-PCR Analizlerinde Kullanılan Gereçler

2.13.1. Laboratuvar Aletleri

PCR Cihazı (Thermal Cycler)

GeneAmp PCR System 9700, PE, Applied Biosystems, Foster City,CA, USA



Elektroforez Aleti

Güç Kaynağı: EC 105 Apparatus Corporation, OWL Separation System, inc, Portsmouth, NH, USA

Elektroforez Tankı: OWL Separation System, inc, Portsmouth, NH, USA



Vorteks

Heidolph Reax Lop, Germany



Santrifüj Makinası

Micro 22R Hettich/Zentrifugen, D78532, Tuttlingen, Germany



UV Görüntüleme Cihazı

GeneSnap from SynGene beacon House, Nuffield Rd, Cambridge, UK



RT-PCR Cihazı

ABI Prism 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, CA, USA



Homojenizasyon Cihazı

IKA Works do Brasil Ltd Taquara,RJ 22713-000



2.13.2. RFLP-PCR ve RT-PCR Yöntemlerin Kullanılan Kitler

İnvitek DNA İzolasyon Kiti (Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign GmbH, Berlin, Deutschland)



RNA İzolasyon Kiti

RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH Hilden, Germany



Real-Time PCR Kitleri

Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH Hilden, Germany



Quantitect Probe PCR Kit, Qiagen GmbH Hilden, Germany



2.14. ELİSA Analizleri için Kullanılan Gereçler

2.14.1. Laboratuvar Cihazları

Mikroplaka Okuyucu

Molecular Device, Versamax Tunable Microplate Reader, (Chicago), USA



Mikroplaka Çalkalayıcı

Heidolph Instruments, Titramax 100 (544-11200), Schwabach, Germany



2.14.2.ELİSA Yönteminde Kullanılan Kitler

MIF Human ELİSA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA



2.15. İstatistiksel Yöntemler

Genotip dağılımları Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumu ki-kare (χ^2) testi ile değerlendirildi. Şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol gruplarının nümerik olan demografik ve klinik özellikleri bağımsız iki grup student-t testi (2-tailed) ile karşılaştırıldı. İki grup arasındaki katagorik verilerin analizinde ki-kare (χ^2) testi veya Fisher'in tam olasılık testi kullanıldı. MİF-173G/C için incelenen lokalizasyonlarda polimorfik allel taşıyıcı olan ve olmayan grupların klinik periodontal parametreleri bağımsız iki grup t-testi ile karşılaştırıldı. MİF -173G/C polimorfik allel taşıyıcı genotipin şiddetli AgP ve KP için risk olup olmadığı lojistik regresyon analizi ile incelendi. Lojistik regresyon analizinde yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve sondalamada kanama düzeltici faktörler olarak alındı. Cerrahisiz periodontal tedavi uygulandıktan sonraki 1.,3.,6. aylardaki periodontal tedavi etkinliğinin karşılaştırmak için tekrarlanan ölçümler için varyans (repeated measure ANOVA) analizi uygulandı. Genotip gruplarının 1.,3.,6., ay klinik periodontal parametreleri kovaryans (ANCOVA) analizi ile karşılaştırıldı. AgP ve KP hastalarının 1., 3. ve 6. ay dönem değerlerinin ortalamaları ile başlangıç değerlerinin ortalamaları arasındaki farkların önemliliği “eşleştirilmiş t testi” ile değerlendirildi. Aynı dönemlerin gruplar arası değişim ortalamalarının farklarının önemliliği t testi ile analiz edildi. Genotip gruplarının tedaviye verdikleri cevapların değerlendirilmesinde, grupların medyanlarının belirlenmesinden sonra, anlamlılık Fisher tam olasılık testi ile belirlendi. Şiddetli AgP ve KP gruplarında DOS MİF protein seviyelerinin başlangıç ve takip dönemlerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanıldı. DOS MİF hacimleri başlangıç tedavi sonrası, 2. hafta, 1.,3.,6. aylardaki periodontal tedavi etkinliğinin karşılaştırmak için tekrarlanan

ölçümler için varyans (repeated measure ANOVA) analizi uygulandı. Şiddetli AgP, KP ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki sondalanan cep derinliği, klinik ataşman kaybı, sondalamada kanama ve plak parametreleri Mann-Whitney-U ve Kruskal Wallis testleri ile karşılaştırıldı. MİF mRNA doku ekspresyonu ve DOS MİF protein seviyeleri ile yaş ve klinik periodontal parametreler arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi.

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1. Demografik Özellikler

Çalışmamıza 97 şiddetli KP, 122 şiddetli AgP ve 124 periodontal sağlıklı kişi olmak üzere toplam 343 birey (170 erkek, 173 kadın) dahil edildi. Şiddetli KP, şiddetli AgP ve kontrol grubunun demografik özellikleri Tablo'7 de verildi. Üç çalışma grubunun yaş ortalamalarının istatistiksel anlamda farklı olduğu saptandı ($p<0.05$). Cinsiyet dağılımları bakımından AgP ve kontrol grupları birbirine benzer iken, KP grubu diğer gruplardan anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$). Çalışmaya dahil edilen AgP hastalarından 39'u, KP hastalarından 40'ı ve kontrol grubundan 13'ü günde 10 taneden az sigara içen, diğer bireyler ise yaşamlarında hiç sigara içmemiş kişilerdi. Gruplar sigara kullanımı açısından değerlendirildiklerinde, üç çalışma grubunun sigara içme bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 7: Şiddetli KP ve Şiddetli AgP ile kontrol gruplarının demografik özellikleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=97)	Şiddetli AgP (n=123)	Sağlıklı Kontrol (n=124)	p
Yaş (yıl)	48.02±6.1 [§]	29.43±5.3	38.38±9.5*	<0.05
Yaş aralıkları	35-63	16-35	17-70	
Erkek/Kadın	62/35*	55/67	53/71	0.004
Sigara (0/1)	57/40 [§]	83/39	71/8*	<0.05

0 : Sigara içmeyen bireyler

1 : Günde 1-9 tane sigara içen bireyler

* : Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

§ : AgP grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

3.2. Klinik Periodontal Bulgular

Şiddetli AgP ve KP grupları ile kontrol grubunun SCD, KAK, sondalamada kanama ve plak yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu saptandı. AgP ile KP grupları kendi aralarında klinik periodontal parametreler açısından değerlendirildiğinde, iki grup arasında sadece KAK için anlamlı fark belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8: Şiddetli KP, AgP ve kontrol gruplarının klinik periodontal parametreleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=97)	Şiddetli AgP (n=123)	Sağlıklı Kontrol (n=124)	P
SCD (mm)	4.1±0.7	4.1 ± 0.8	2.2±0.4*	P<0.05
KAK (mm)	5.5±1.1 [§]	4.7 ± 1.2	1.2±0.2*	P<0.05
Sondalamada kanama (%)	78±19	74 ± 18	4±3*	P<0.05
Plak (%)	88±11	83 ± 18	5±4*	P<0.05

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

§ : AgP grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

3.3. Moleküler Genetik Bulgular

3.3.1. MİF Gen -173 G/C Polimorfizmi

MİF -173G/C genotip dağılımları, tüm çalışma gruplarında Hardy-Weinberg eşitliğinin beklenen değerleri ile uyumlu bulundu (KP, $\chi^2=2.64$, $p=0.104$; AgP, $\chi^2=0.08$, $p=0.773$; kontrol, $\chi^2=0.89$, $p=0.343$).

Şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol gruplarının MİF -173G/C genotip dağılımları ve allel sıklıkları Tablo 9'da verildi. Çalışma grupları arasında CC, GC ve GG genotiplerinin dağılımları bakımından anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.36$). MİF -173 CC genotip dağılımı şiddetli KP grubunda % 6.2, şiddetli AgP grubunda % 2.5, kontrol grubunda ise % 2.4 olarak belirlendi. GC ve GG genotip dağılımları ise

şiddetli KP grubunda sırayla % 25.8 ve % 68, şiddetli AgP grubunda % 28.7 ve % 68.9, kontrol grubunda ise % 33.9 ve % 63.7' dir.

MİF-173C allel taşıyıcı genotip (GC ve CC) dağılımı şiddetli KP grubunda % 32, şiddetli AgP grubunda % 31.2 ve kontrol grubunda % 36.3 olarak bulundu. C allel taşıyıcılığı bakımından gruplar arasında istatistiksel fark saptanmadı (p= 0.46).

Gruplar MİF -173 C allel sıklığının şiddetli KP ve AgP grubunda sırasıyla % 19.1 ve % 16.8, kontrol grubunda ise % 19.4 olduğu belirlendi. G allel sıklığının ise şiddetli KP, AgP ve kontrol grubunda sırasıyla % 80.9, % 83.2 ve % 80.6 olduğu bulundu. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı (p=0.73).

Tablo 9: MİF -173G/C genotip dağılımı ve allel sıklığı (Kişi sayısı(%))

MİF -173G/C		Şiddetli KP (n=97) (%)	Şiddetli AgP (n=123) (%)	Sağlıklı Kontrol (n=124) (%)	p
Genotip	CC	6 (6,2)	3 (2.5)	3 (2.4)	0.36 $\chi^2=0.274$
	GC	25 (25.8)	35 (28.7)	42 (33.9)	
	GG	66 (68)	84 (68.9)	79 (63.7)	
	C Allel taşıyıcı	31 (32)	38 (31.2)	45 (36.3)	0.46 $\chi^2=0.298$
Allel	C	37 (19.1)	41 (16.8)	48 (19.4)	0.73
	G	157 (80.9)	203 (83.2)	200 (80.6)	$\chi^2=0.302$

Şiddetli KP, AgP ve kontrol gruplarının cinsiyete göre MİF-173G/C genotip dağılımları Tablo 10'dadır. Şiddetli KP ve AgP gruplarında kadın ve erkekler arasında MİF -173G/C genotip dağılımlarının farklı olmadığı bulunmadı (Şiddetli KP p=0.46, Şiddetli AgP p=0.36). Kontrol grubunda ise MİF -173G/C genotip dağılımlarının cinsiyete göre farklılık gösterdiği belirlendi (p=0.02).

Tablo 10: Cinsiyete göre MİF -173G/C genotip dağılımları (Kişi sayısı(%))

MİF -173G/C	Genotip n (%)	Kadın n (%)	Erkek n(%)	p
Şiddetli KP (n=97)	CC	0(0)	6(9.7)	0.16
	GC	10(28.6)	15(24.2)	
	GG	25(71.4)	41(66.1)	
Şiddetli AgP (n=123)	CC	3 (4.5)	0 (0)	0.12
	GC	22 (32.8)	13 (23.6)	
	GG	42(62.7)	42(76.4)	
Kontrol Grubu (n=124)	CC	1(1.4)	2(3.8)*	0.02
	GC	31(43.7)	11(20.8)	
	GG	39(54.9)	40(75.5)	

*: Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark

3.3.2 Şiddetli KP ve AgP Hastalarının Polimorfik Tipine Göre Klinik Periodontal Parametreleri

Şiddetli KP ve AgP hastalarının MİF -173 C allel taşıyıcı (CC ve GC) ve GG genotip gruplarının başlangıç klinik periodontal parametreleri Tablo 11’de verildi. Gerek AgP ve gerekse de KP hastalarında C taşıyıcı ve GG genotip grupları arasında başlangıç klinik periodontal parametreleri bakımından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (p>0.05)

Tablo 11: MİF -173C allel taşıyıcı (GC ve CC) ve GG genotip gruplarının klinik periodontal parametreleri (Ort±ss)

MİF -173G/C	Şiddetli AgP		p	Şiddetli KP		p
	GG (n=84)	GC ve CC (n=38)		GG (n=66)	GG ve CC (n=31)	
SCD (mm)	4±0.8	4.12±0.9	0.54	4.2±0.8	4.1±0.7	0.45
SCD 4-6 mm (%)	39.7±12.8	41.6±11.1	0.31	46.6±11.4	51±15.6	0.96
SCD ≥7 mm (%)	21.4±15.6	17.63±16.2	0.38	7.1±8.4	9.8±6.2	0.46
KAK (mm)	4.5±1.2	4.8 ±1.3	0.46	5.7±1.2	5.3±1	0.20
KAK 4-6 mm (%)	38.4±12	39.75±14.2	0.30	52.4±10.5	49±13.1	0.88
KAK ≥7 mm (%)	21.4±15.6	27.63±23	0.36	7.1±8.4	35.6±13.5	0.67
Sondalamada kanama (%)	74±19.6	74.3±16	0.84	79±20	77±18.2	0.51
Plak (%)	81.4±19	86.2±17	0.19	89±12	89.1±11.2	0.80

3.3.3. Şiddetli KP ve AgP'ye yatkınlık ile MİF-173 Polimorfik Genotiplerinin İlişkisi

Şiddetli KP ve AgP ile MİF-173C allel taşıyıcı genotiplerinin (GC veCC) ilişkisi iki regresyon analiz modeli ile değerlendirildi (Tablo 12-13) (Model 1). KP ve AgP için risk faktörü olabilecek parametrelere göre düzeltme yapılmadan gerçekleştirilen birinci regresyon analizi modelinin sonuçlarına göre MİF-173C allel taşıyıcı genotipinin (GC ve CC) KP (OR=0.825, GA=0.470-1.447, p=0.501) ve AgP (OR=0.794, GA=0.467-1.349, p=0.394) için risk oluşturmadağı belirlendi (Tablo 12 ve 13).

KP ve AgP için risk faktörü olduğu bilinen yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve sondalamada kanama düzeltici faktörler olarak ikinci bir lojistik regresyon analizine uygulandı (Model 2). Uygulanan regresyon analizi modeline göre şiddetli KP ile MİF-173C allel taşıyıcı genotipler (GC veCC) arasındaki olası ilişki araştırıldı. Bu analizin sonucunda; cinsiyetin KP ile ilişkili olmadığı bulundu (p>0.05). MİF-173C allel taşıyıcı genotiplerinin (GC ve CC) AgP için risk oluşturmadağı saptandı (OR=1,356, GA=0,342-5,372, p=0,665).

Tablo 12: Şiddetli KP ile ilişkisi olduğu düşünülen genotipin tek başına olan (*crude*) odds ratio ve risk faktörlerine göre düzeltme yapılan lojistik regresyon analizleri

	OR	% 95 Güven aralığı	p
<u>Model 1</u>			
MİF -173G/C			
CC ve GC	0,825	0,470-1,447	0,501
<u>Model 2</u>			
MİF -173G/C			
CC ve GC	0,745	0,184-3,020	0,681

OR: Odds ratio

Tablo 13: Şiddetli AgP ile ilişkisi olduğu düşünülen genotipin tek başına olan (*crude*) *odds ratio* ve risk faktörlerine göre düzeltme yapılan lojistik regresyon analizleri

	OR	% 95 Güven aralığı	p
<u>Model 1</u>			
MİF -173G/C			
CC ve GC	0,794	0,467-1,349	0,394
<u>Model 2</u>			
MİF -173G/C			
CC ve GC	1,356	0,342-5,372	0,665

OR: Odds ratio

3.4. Şiddetli KP ve AgP Hastaları ile Kontrol Gruplarının DOS MİF Seviyeleri ve DOS MİF Seviyeleri ile Genotip İlişkisi

28 şiddetli KP, 32 şiddetli AgP ve 44 sağlıklı bireyin demografik özellikleri Tablo 14’de verildi. Grupların başlangıç klinik periodontal parametreleri ve DOS hacimleri Tablo 14’dedir. Grupların yaşları karşılaştırıldığında, her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0.05$). Cinsiyet dağılımı ve sigara kullanımında AgP ve KP gruplarının benzer olduğu, ancak kontrol grubunun bu gruplardan anlamlı derecede farklı olduğu gözlemlendi ($p<0.004$ ve $p<0.05$).

SCD bakımından AgP grubunun, KP ve kontrol grubunda anlamlı fark gösterdiği belirlendi ($p<0.001$). Aynı farklılık KP ve kontrol grubu arasında da bulundu ($p<0.001$). KAK, sondalamada kanama ve plak açısından AgP ve KP arasında fark bulunmazken, bu gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$). DOS hacmi değerlendirildiğinde, KP ve AgP grupları benzer DOS hacmine sahipken, sağlıklı grup anlamlı derecede farklıydı ($p<0.001$) (Tablo 15).

Tablo 14: DOS örnekleri alınan bireylerin demografik özellikleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=28)	Şiddetli AgP (n=32)	Sağlıklı Kontrol (n=44)	p
Yaş	48.02±6.1 [§]	29.43±5.3	38.38±9.5*	<0.05
Yaş aralıkları	35-63	16-35	17-70	
Erkek/Kadın	18/10	16/16	14/30*	0.004
Sigara (0/1)	15/13	19/13	41/3*	<0.05

0 : Sigara içmeyen bireyler

1 : Günde 1-9 tane sigara içen bireyler

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

§ : AgP grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

Tablo 15: DOS örnekleri alınan bölgelerin DOS düzeyleri ve klinik periodontal parametreleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=28)	Şiddetli AgP (n=32)	Kontrol (n=44)	p
SCD (mm)	6.5±0.6 [§]	7.4±0.3	2.2±0.4*	<0.001
KAK (mm)	7.4±0.9	8.2±0.2	0.4±0.1*	<0.001
Sondalamada kanama (%)	4.2±0.2	4.3±0.4	1.7±3.7*	<0.001
Plak (%)	4.1±0.4	4±0.4	1±0.2*	<0.001
DOS Hacmi (µl)	0.3±0.2	0.3±0.2	0.08±0.02*	<0.001

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

§ : AgP grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

DOS örnekleri alınan bireylerin DOS MİF total protein miktarları Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 16). Analizin sonuçlarına göre AgP grubunun DOS MİF total miktarının KP ve kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.05). AgP ve kontrol grupları arasındaki farkın da anlamlı olduğu belirlendi (p=0.046).

Tablo 16: DOS örnekleri alınan bireylerin MİF total protein miktarları

		DOS MİF Protein Miktarı (pg/örnek)			
	n	Ortalama Değer	Medyan	RANKLARIN	
				Ort	Ss
KP	32	55.8	56.7 [§]	25.13	18.13
AgP	28	68.2	70.6*	34.18	14.32
Kontrol	44	33.4	29.35	21.53	11.21

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05)

§ : Sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05)

Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma

DOS örnekleri alınan çalışma gruplarının MİF -173 C allel taşıyıcı (CC ve GC) ve GG genotip dağılımları ve allel sıklıkları Tablo 17’de verildi. Çalışma gruplarında genotip dağılımlarının farklı olduğu belirlendi (p= 0.023). Allel sıklığı bakımından gruplar arasında farklılık bulunmadı (p>0.05). C allel taşıyıcılığı sağlıklı kontrol grubunda daha fazla bulundu (p=0.026).

Tablo 17: DOS örneği alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımı ve allel sıklığı (Kişi sayısı(%))

MİF -173G/C		Şiddetli KP (n=28) (%)	Şiddetli AgP (n=32) (%)	Kontrol Grubu (n=44) (%)	p
Genotip	CC	0 (0)	0 (0)	4 (9.1)*	0.023 $\chi^2=0.003$
	GC	8 (28.6)	8 (25)	20 (45.5)*	
	GG	20 (71.4)	24 (75)	20 (45.5)*	
	C Allel taşıyıcı	8 (28.6)	8 (25)	24 (54.6)*	0.04 $\chi^2=0.003$
Allel	C	8 (19.1)	8 (16.8)	28 (30.4)	>0.05 $\chi^2=0.271$
	G	48 (80.9)	56 (83.2)	60 (70.6)	

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

Üç grubun MİF -173 C allel taşıyıcı (CC ve GC) ve GG genotip dağılımlarına göre başlangıç klinik periodontal parametreleri ve DOS hacimleri Tablo 18’dedir. Kontrol, AgP ve KP gruplarının C allel taşıyıcı ve GG genotip alt grupları arasında başlangıç periodontal parametrelerinin değerleri ve DOS hacimleri bakımından anlamlı fark saptanmadı (p>0.05).

Tablo 18: DOS örneği alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımlarına göre başlangıç klinik periodontal parametreleri ve DOS Hacimleri (Ort±ss)

MİF - 173G/C	Şiddetli AgP		Şiddetli KP		Kontrol Grubu	
	GG (n=24)	GC ve CC (n=8)	GG (n=20)	GC ve CC (n=8)	GG (n=20)	GC ve CC (n=24)
SCD (mm)	7.3±0.7	7.4±0.5	6.6±0.8	6.4±0.8	2.2±0.4	2.3±0.4
Grupçi p	0.29		0.26		0.75	
KAK	8.3±1.2	8.2±1.3	7.3±1	7.4±0.6	0.40±0.5	0.38±0.2
Grupçi p	0.16		0.41		0.64	
Sondalamada kanama (%)	3.4±0.2	3.3±0.4	3.1±0.4	3.3±0.2	1.6±0.3	1.5±0.4
Grupçi p	0.31		0.84		0.80	
Plak (%)	4±0.3	4.2±0.4	4.2±0.2	4.1±0.1	1.2±0.4	1.1±0.3
Grupçi p	0.24		0.16		0.40	
DOS Hacmi (µl)	0.3±0.08	0.4±0.3	0.3±0.2	0.3±0.1	0.09±0.02	0.08±0.02
Grupçi p	0.42		0.57		0.56	

DOS örnekleri alınan bireylerin genotip dağılımlarına göre DOS MİF protein seviyeleri Tablo 19’da verildi. Kontrol, AgP ve KP gruplarının C allel taşıyıcıları daha yüksek DOS MİF protein miktarına sahip olmalarına karşın, GG genotipine sahip bireylere göre farklı DOS MİF protein miktarına sahip olmadıkları belirlendi ($p>0.05$).

Tablo 19: DOS alınan bireylerin MİF -173G/C genotip dağılımlarına göre başlangıç DOS MİF protein miktarları

			DOS MİF Protein Miktarı (pg/örnek)			
	Genotip	n	Ortalama Değer	Medyan	RANKLARIN	
					Ort	Ss
AgP	GG	24	74.93	58.7	14.25	8.86
	GC ve CC	8	93.33	71.9	16.61	9.29
KP	GG	20	41.20	22.3	12	8.35
	GC ve CC	8	71.81	57	14.35	7.94
Kontrol	GG	20	33.10	27.7	20.42	12.33
	GC ve CC	24	33.63	31.2	25	13.31

Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma

3.5. Şiddetli KP ve AgP Hastaları ile Kontrol Gruplarının Polimorfik Tipine Göre Dişeti Dokusu MİF mRNA Düzeyleri

Dişeti dokusunda MİF mRNA ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla, şiddetli KP grubundan 24, şiddetli AgP grubundan 23 ve kontrol grubundan 20 bireyden dişeti örnekleri alındı. Dişeti örneği alınan bölgelerden DOS örnekleri de toplandı. Doku örneği toplanan bireylerin demografik özellikleri Tablo 20’ de verildi. Yaş için KP grubunun ($p<0,001$), sigara kullanımı bakımından ise sağlıklı kontrol grubunun diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu ($p=0.003$).

Tablo 20: Dişeti dokusu alınan hastaların demografik özellikleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=24)	Şiddetli AgP (n=23)	Sağlıklı Kontrol (n=20)	p
Yaş	46.66±5.8*	30.36±4.2	28.4±5	<0,001
Yaş aralıkları	35-55	22-36	22-36	
Erkek/Kadın	11/5	6/8	4/8	>0,05
Sigara (0/1)	10/6	11/5	12/0*	0,003

0 : Sigara içmeyen bireyler

1 : Günde 1-9 tane sigara içen bireyler

***:** Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

Dişeti doku örnekleri alınan şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol grubu bireyler genotip dağılımlarına göre değerlendirildiklerinde, gruplar arasında genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 21).

Tablo 21: Dişeti dokusu alınan hastaların genotip dağılımları ve allel sıklıkları
(Kişi sayısı(%))

MİF -173G/C		Şiddetli KP (n=24) (%)	Şiddetli AgP (n=23) (%)	Sağlıklı Kontrol (n=20) (%)	p
Genotip	CC	0 (0)	0(0)	3(15)	>0.05 $\chi^2=0.234$
	GC	10 (41.7)	9 (39.1)	7 (35)	
	GG	14 (58.3)	14 (60.9)	10(50)	
	C Allel taşıyıcı	10 (37.5)	9 (28.6)	10 (47.7)	>0.05 $\chi^2=0.233$
Allel	C	10 (20.8)	9 (13.2)	13 (28.2)	>0.05 $\chi^2=0.105$
	G	38 (79.2)	37 (86.8)	27 (71.8)	

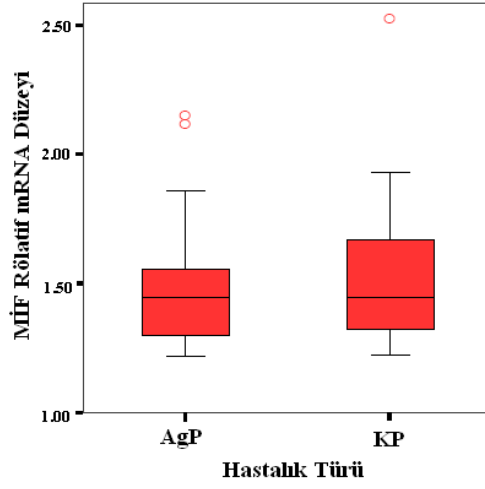
Dişeti dokusu alınan bireylerin klinik periodontal parametreleri ve DOS MİF protein seviyeleri Tablo 22’dedir. Kontrol grubuna göre şiddetli AgP ve KP gruplarında klinik periodontal parametreler ve DOS MİF protein düzeyinin yüksek olduğu bulundu ($p<0.001$). Şiddetli AgP ve KP grupları arasında sadece DOS MİF protein düzeylerinde anlamlı farklılık belirlendi. Şiddetli AgP ve KP grubunda rölatif MİF mRNA ekspresyonu sağlıklı gruba göre 1.5 kat daha yüksek olarak saptandı (Grafik 1). AgP ve KP gerupları arasında anlamlı bir fark belirlenmedi ($p>0.05$)

Tablo 22: Dişeti dokusu alınan hastaların rölatif MİF mRNA ekspresyon düzeyi ve klinik periodontal parametreleri (Ort±ss)

	Şiddetli KP (n=24)	Şiddetli AgP (n=23)	Kontrol (n=20)	p
SCD (mm)	7.4±1.3	8.3±2	2.6±0.5*	<0.001
KAK (mm)	8.6±1.3	9.5±2.5	0.4±0.2*	<0.001
Sondalamada kanama	2.5±0.6	2.6±1	0.4±0.5*	<0.001
Plak (%)	3.7±0.9	3.9±1	0.3±0.5*	<0.001
DOS MİF Protein düzeyi (pg/örnek)	40.6±16.6	47.7±21.6	24.6±4.5*	<0.05

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

Grafik 1: Sağlıklı kontrol grubuna göre şiddetli AgP ve KP gruplarının rölatif MİF mRNA ekspresyonu



Şiddetli AgP ve KP gruplarında genotip dağılımının rölatif MİF mRNA ekspresyonu ve DOS MİF protein düzeyleri üzerine etkisinin değerlendirildiği veriler Tablo 23’ dedir. Şiddetli AgP ve KP gruplarında genotip gruplarının rölatif MİF mRNA ekspresyonu ve DOS MİF protein düzeyleri bakımından benzer olduğu belirlendi ($p>0.05$)

Tablo 23: Dişeti dokusu alınan hastaların rölatif MİF mRNA ve DOS MİF protein düzeyleri (Ort $\pm$ ss)

MİF -173G/C	Şiddetli AgP		Şiddetli KP	
	GG (n=14)	GC ve CC (n=9)	GG (n=14)	GC ve CC (n=10)
MİF mRNA rölatif düzeyi	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.5
P	>0.05		>0.05	
DOS MİF Total Miktarı (pg/örnek)	46.5 $\pm$ 11.4	43.8 $\pm$ 13.7	40.5 $\pm$ 12.1	39.6 $\pm$ 12.5
P	>0.05		>0.05	

Şiddetli AgP grubunda rölatif MİF mRNA ekspresyonu ve DOS MİF protein düzeyleri ile yaş ve klinik peridontal parametreler arasındaki korelasyon Tablo 24’ de verildi. İncelenen parametreler arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı ($p>0.05$).

Tablo 24: Şiddetli AgP hastalarında rölatif MİF mRNA ve DOS MİF protein seviyeleri ile klinik periodontal parametreler arasındaki korelasyon

Şiddetli AgP	Yaş	SCD	KAK	PKİ	Plak
Rölatif MİF mRNA düzeyi	0,059	-0.080	-0.110	-0.010	-0.47
DOS MİF Total Miktarı (pg/örnek)	-0.117	-0.416	-0.301	-0.237	-0.395

Şiddetli KP grubunda MİF rölatif mRNA ekspresyonu ve DOS MİF protein düzeyleri ile yaş ve klinik peridontal parametreler arasındaki korelasyon Tablo 25’ de verildi. İncelenen parametreler arasında sadece mRNA ekspresyonu ile sondalanan cep derinliği arasında anlamlı bir korelasyon saptandı (0.614).

Tablo 25: Şiddetli KP hastalarında MİF rölatif mRNA ve DOS MİF protein seviyeleri ile klinik periodontal parametreler arasındaki korelasyon

Şiddetli KP	Yaş	SCD	KAK	PKİ	Plak
Rölatif MİF mRNA düzeyi	-0.52	0.614*	-0.286	-0.233	-0.016
DOS MİF Total Miktarı (pg/örnek)	0.055	-0.030	-0.058	-0.353	-0.039

* İstatistiksel olarak anlamlı ilişki

3.6.Cerrahisiz Periodontal Tedaviye Yardımcı Olarak Uygulanan Antimikrobiyal Tedavinin Sonuçlarına MİF Genotiplerinin Etkileri

Çalışmamıza dahil ettiğimiz şiddetli KP hastalarından 28’ine ve şiddetli AgP hastalarından 32’ine cerrahisiz periodontal tedavi ile birlikte antimikrobiyal tedavi uygulandı. Gruplar ikiye ayrılarak yarısına azitromisin, diğer yarısına ise plasebo ilaç verildi. Şiddetli KP ve AgP gruplarındaki hastalardan, uygulanan tedavilerin ardından, tedavi sonrası ikinci hafta, 1. ay, 3. ay ve 6 ayda klinik periodontal parametreler ile birlikte DOS örneklerinde MİF protein değerleri tayin edildi. Periodontal tedavi uygulanan hastaların demografik özellikleri Tablo 26’da verildi.

Şiddetli KP ve AgP gruplarında C taşıyıcı ve GG genotip alt grupları arasında yaş açısından anlamlı fark bulundu ($p=0.04$, $p=0.003$). Her iki çalışma grubunun alt grupları arasında cinsiyet ve sigara kullanımı bakımından anlamlı farklar saptandı ($p=0.02$, $p=0.01$).

Tablo 26: Periodontal tedavi uygulanan hastaların demografik özellikleri (Ort $\pm$ ss)

	Şiddetli KP (n=28)			Şiddetli AgP (n=32)		
	GG (n=20) (%71.4)	GC ve CC (n=8) (%28.6)	p	GG (n=24) (%75)	GC ve CC (n=8) (%25)	P
Yaş	47.5 $\pm$ 5.7*	43.1 $\pm$ 4.5	0.04	28.2 $\pm$ 4.4	33.5 $\pm$ 3.3*	0.003
Yaş aralıkları	38-61	35-50		18-35	27-38	
Erkek/Kadın	12/8*	6/2	0.02	14/10*	2/6	0.02
Sigara (0/1)	11/9*	4/4	0.01	14/10*	5/3	0.01

0 : Sigara içmeyen bireyler

1 : Günde 1-9 tane sigara içen bireyler

*: Diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark

§ : AgP grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

İlaç ve plasebo grubu olarak ayrılan hastalarda GG genotipi taşıyıcılığı sırasıyla ~% 70 ve ~%80 olarak belirlendi ($p>0.05$). Genotip dağılımları benzer olan ilaç ve plasebo gruplarında klinik periodontal parametreleri başlangıç ve tedavi sonrası takip dönemlerinde değerlendirildi.

Tüm parametreler için gerçekleştirilen tekrarlanan ölçümler için varyans analizlerinde antibiyotik ve plasebo kullanımının etkisi Tablo 27’de verildi. Elde edilen veriler AgP için değerlendirildiğinde;

SCD değerleri için ilaç ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.36$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 3. ay ve 6. ay, aynı zamanda 3. ay ve 6.ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD’nin 4-6 mm arasında olduğu bölgelerin yüzdesi bakımından ilaç ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemlerinde anlamlı fark saptanamadı

($p=0.37$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 3. ay ve 6. ay, aynı zamanda 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu belirlendi ($p<0.001$).

SCD' nin 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından ilaç ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.42$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Test ve plasebo grubunda, ortalama KAK değerleri başlangıç ve takip dönemlerinde benzer olarak bulundu ($p>0.05$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklar gözlemlendi. Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı değişimler olduğu belirlendi. ($p<0.001$).

Tedavi sonrasında KAK'ın 4-6 mm olduğu bölgelerin yüzdeleri bakımından, test ve plasebo grupları arasında da başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.86$). Benzer olarak başlangıç ve takip dönemleri arasında da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

KAK' ın 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından gruplar arasında başlangıç ve takip dönemleri için anlamlı fark saptanamadı ($p=0.36$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Test ve plasebo gruplarında sondalamada kanama yüzdesi değerlendirildiğinde, başlangıç ve takip dönemleri arasında farklar anlamlı bulunmadı ($p=0.72$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Aynı gruplar içi plak yüzdesi değerlendirildiğinde, her iki grupta başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde benzer sonuçlar elde edildi ($p=0.72$). Test ve plasebo gruplarında başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 6. ay ve 3. ay ile 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Elde edilen veriler KP için değerlendirildiğinde;SCD için plasebo ve ilaç grupları arasında başlangıç ve takip dönemlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p=0.81$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı

düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD'nin 4-6 mm arasında olduğu bölgelerin yüzdesi bakımından iki grup arasında başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.96$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu belirlendi ($p<0.001$).

SCD'nin 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından test ve kontrol grupları arasında başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.99$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Test ve plasebo grubunda, ortalama KAK değerleri başlangıç ve takip dönemlerinde benzer olarak bulundu ($p=0.23$). Her iki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklar gözlemlendi. Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı değişimler olduğu belirlendi. ($p<0.001$).

Tedavi sonrasında KAK=4-6 mm olduğu bölgelerin yüzdeleri bakımından, heriki grupta da başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.32$). Benzer olarak başlangıç ve takip dönemleri arasında da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

KAK'ın 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından test ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemleri için anlamlı fark saptanamadı ($p=0.98$). Her iki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Test ve plasebo gruplarında sondalamada kanama yüzdesi değerlendirildiğinde, başlangıç ve takip dönemleri arasında farklar anlamlı bulunmadı ($p=0.74$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Plak yüzdesi değerlendirildiğinde, her iki grupta test ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde benzer sonuçlar elde edildi ($p=0.74$). Test ve plasebo gruplarında başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Tablo 27: Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların klinik periodontal parametreler üzerine etkisi (Ort±ss)

	Ölçüm zamanları	Şiddetli AgP (n=32)		Grup içi p	Şiddetli KP (n=28)		Grup içi p
		İlaç	Plasebo		İlaç	Plasebo	
SCD (mm)	Başlangıç	4.8±1.1	4.3±0.6	= 0.36	4.1±0.5	3.8±0.5	= 0,81
	1.ay	2.6±0.4	2.5±0.3		2.5±0.4	2.4±0.3	
	3.ay	2.5±0.3	2.5±0.3		2.3±0.3	2.3±0.2	
	6.ay	2.4±0.4	2.3±0.3		2.2±0.3	2.2±0.2	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e,f	a,b,c,d,e,f		a.b.c	a.b.c	
4-6 mm SCD (%)	Başlangıç	42.6±12.8	37.8±11	= 0.37	9.21±9.5	6.5±5.9	= 0.96
	1.ay	23.8±16.1	17±8		0±0	0.2±0.8	
	3.ay	15.3±11.2	13.9±7.9		0±0	0.2±0.6	
	6.ay	11.5±10.3	11.1±7.2		0.07±0.2	0.07±0.3	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e,f	a,b,c,d,e,f		a,b,c	a,b,c	
≥7 mm SCD (%)	Başlangıç	23.8±18.5	17.2±11.8	= 0.42	17.63±16.2	9.8±6.2	= 0.99
	1.ay	0.7±1	0.6±1.2		0.13±0.3	0±0	
	3.ay	0.06±0.2	0.5±0.8		0±0	0±0	
	6.ay	0.06±0.2	0.6±1.3		0±0	0±0	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
KAK (mm)	Başlangıç	5.8±1.6	5.2±0.6	= 0.48	5.8 ±0.7	5.3±1	= 0.23
	1.ay	4.1±1.2	3.7±0.5		4.3±0.7	4±0.6	
	3.ay	3.8±1	3.6±0.6		4.2±0.7	3.9±0.6	
	6.ay	3.7±1	3.5±0.6		4.2±0.7	3.8±0.6	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
4-6 mm KAK (%)	Başlangıç	37.8±13.1	39.8±11.9	= 0.86	52.9±10.3	50.1±12.2	= 0.32
	1.ay	43.4±18.3	41±13.4		60.6±13.2	55.6±16.2	
	3.ay	41.9±18.6	39.1±16.3		59.8±14.8	55±17.4	
	6.ay	42.3±19.9	37.3±15.8		62.6±15	52.7±20.3	
Zamanlar arası p	>0.05	-	-		-	-	
≥7 mm KAK (%)	Başlangıç	37.5±23.4	29.1±12.1	=0.33	34.3±12.4	28.2±17.3	= 0.98
	1.ay	13.4±13.5	5.8±5.9		7.6±6.3	5.7±4.9	
	3.ay	8.1±9.5	5.8±5.8		7.2±7.8	5.5±5.2	
	6.ay	7.4±10.7	5.3±7.1		7.4±7.6	4.6±5.8	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
Sondalamada kanama (%)	Başlangıç	79.6±18	77.9±16.3	= 0.72	68.4±26	65.6±17.8	= 0.74
	1.ay	24.2±11	26.6±10.9		17.3±11.2	18.6±7.8	
	3.ay	22.7±9	26.1±13		15.2±10	17.7±8	
	6.ay	19.2±8.6	22.3±9.4		16.7±10	15.4±6.2	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
Plak (%)	Başlangıç	92.9±9.6	95±8.2	= 0.88	97.8±5.8	88.4±20.7	=0.74
	1.ay	41.2±17	43.8±21.4		37±15.7	34.9±11.7	
	3.ay	37.5±11	36.6±11.5		30.1±6.6	29.6±7.5	
	6.ay	26.2±3.9	27.4±4.6		26.7±4.5	26.6±4.6	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,e,f	a,b,c,e,f		a,b,c,d,e	a,b,c,d,e	

a: başlangıç-1.ay, b: başlangıç-3.ay,c: başlangıç-6.ay, d: 1.ay-3.ay, e: 1.ay-6.ay, f: 3.ay-6.ay

Her iki hastalık grubunda klinik periodontal parametrelerin başlangıç değerlerinin ortalamaları ile 1. ay, 3. ay ve 6. ay dönem değerlerinin ortalamalarının farklarının önemliliği eşleştirilmiş t testi ile değerlendirildi. Aynı dönemlerde ilaç ve plasebo grupları arası değişimlerin ortalamalarının farklarının önemliliği t testi ile analiz edildi (Tablo 28). AgP hastalarının ilaç kullanan grubunda plasebo grubuna oranla başlangıca göre 1. ay ve 3. ay sondalanan cep derinliği değişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p=0.032$ ve $p=0.037$). 6. ay değişimlerinin ise ilaç grubunda plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmaması ile birlikte daha fazla değişim olduğu gözlemlendi ($p=0.054$). Sondalamada kanama ve plak değişimlerinin ilaç ve plasebo gruplarında benzer olduğu gözlemlendi. Kronik periodontitis grubunda ise; ilaç ve plasebo grupları arasında sadece sondalanan cep derinliğinin 3 ay değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0.039$). Klinik ataşman kazancı, sondalamada kanama ve plak değişimleri açısından grupların benzer olduğu belirlendi ($p>0.05$).

Tablo 28: Şiddetli AgP ve KP hastalarının ilaç ve plasebo gruplarının klinik periodontal parametrelerinin 1.,3. ve 6. ay değerlerinin başlangıca göre farklılıkları

	Şiddetli AgP (n=32)			Şiddetli KP (n=28)		
	İlaç (n =16)	Plasebo (n=16)	p	İlaç (n =14)	Plasebo (n=14)	p
SCD B-1.AY	2.10±0.71*	1.70±0.55	0.032	1.56±0.43	1.44±0.55	>0.05
SCD B-3.AY	2.33±0.81*	1.80±0.67	0.037	1.79±0.36*	1.49±0.47	0.039
SCD B-6.AY	2.44±0.99	2.00±0.70	>0.05	1.82±0.47	1.66±0.48	>0.05
KAK B-1.AY	1.78±0.69	1.54±0.56	>0.05	1.47±0.26	1.36±0.54	>0.05
KAK B-3.AY	2.04±0.79*	1.60±0.68	0.038	1.58±0.4	1.45±0.56	>0.05
KAK B-6.AY	2.14±0.86*	1.73±0.62	0.042	1.59±0.5	1.54±0.53	>0.05
Kanama B-1.AY	55.4±16.9	49.4±19.2	>0.05	51.4±20.8	47.1±16.8	>0.05
Kanama B-3.AY	56.9±19.9	51.8±16.1	>0.05	53.4±20.3	47.9±17.8	>0.05
Kanama B-6.AY	60.4±19.1	55.6±15.1	>0.05	51.9±20.2	50.3±17.2	>0.05
PLAK B-1.AY	51.6±20.4	51.1±20.9	>0.05	60.8±16.5	53.6±24.1	>0.05
PLAK B-3.AY	55.3±12.4	58.4±13.7	>0.05	67.6±9.39	58.8±21.4	>0.05
PLAK B-6.AY	66.7±8.9	67.6±9.7	>0.05	71.0±7.35	61.7±20.5	>0.05

* Plasebo grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark

İlaç ve plasebo uygulamalarının klinik periodontal parametreler üzerine benzer etki göstermeleri nedeniyle, KP ve AgP hastaları C allel taşıyıcı ve GG genotipine göre gruplandırılarak tedavinin etkinliği değerlendirildi.

Tüm parametreler için gerçekleştirilen tekrarlanan ölçümler için varyans analizlerinde tedaviye yanıt ile MİF-173C allel taşıyıcı genotip (GC ve CC) faktörü arasındaki ilişki Tablo 29’da verildi. Değerlendirilen tüm parametreler için başlangıca göre 1., 3., ve 6. aylardaki değişimler iki genotip grubunda da benzer bulundu ($p>0.05$).

AgP için değerlendirildiğinde;

SCD için her iki genotip grubunda da başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde benzer sonuçlar elde edildi ($p=0.20$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 3. ay ve 6. ay, aynı zamanda 3. ay ve 6.ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD’ nin 4-6 mm arasında olduğu bölgelerin yüzdesi bakımından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.31$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 3. ay ve 6. ay, aynı zamanda 3. ay ve 6.ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD’ nin 7 mm’ den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.31$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Ortalama KAK değerleri için iki genotip grubunda , başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$). GG grubunun, tedaviye verdiği cevabın (GC ve CC) grubuna göre KAK için daha farklı olduğu, ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p=0.20$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklar gözlemlendi. Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında bununla birlikte, 1. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu belirlendi. ($p<0.001$).

Tedavi sonrasında KAK'ın 4-6 mm olduğu bölgelerin yüzdeleri bakımından, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.30$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$).

KAK'ın 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.36$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

İki genotip grubunda sondalamada kanama yüzdesi değerlendirildiğinde, başlangıca ve takip dönemleri arasında farklar anlamlı bulundu ($p=0.02$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 6. ay, aynı zamanda 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Plak yüzdesi değerlendirildiğinde, her iki genotip grubunda da başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde benzer sonuçlar elde edildi ($p=0.20$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

KP için değerlendirildiğinde;

SCD için her iki genotip grubunda da başlangıç ve takip dönemlerinde anlamlı fark elde edildi ($p=0.04$). CC ve GC grubunda GG grubuna göre anlamlı düşüş gözlemlendi. Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklar saptandı ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde GG grubunda sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, GC ve CC grubunda ise bununla birlikte 1. ay ile 3. ay ve 6. ay ($p<0.001$), aynı zamanda 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD'nin 4-6 mm arasında olduğu bölgelerin yüzdesi bakımından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.96$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

SCD'nin 7 mm'den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.46$).

Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

Ortalama KAK değerleri için iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0.68$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklar gözlemlendi. Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu belirlendi. ($p<0.001$).

Tedavi sonrasında KAK'ın 4-6 mm olduğu bölgelerin yüzdeleri bakımından, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.30$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

KAK'ın 7 mm' den fazla olduğu bölgelerin yüzdesi açısından iki genotip grubunda, başlangıç ve takip dönemleri arasında anlamlı fark saptanamadı ($p=0.67$). Heriki grupta da zaman içerisinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

İki genotip grubunda sondalamada kanama yüzdesi değerlendirildiğinde, başlangıç ve takip dönemleri arasında farklar anlamlı bulunmadı ($p=0.87$). Yapılan ikili analizlerde sadece başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Plak yüzdesi değerlendirildiğinde, her iki genotip grubunda da başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde benzer sonuçlar elde edildi ($p=0.74$). Heriki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili analizlerde başlangıca göre 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında, bununla birlikte 1. ay ile 3 ay ve 1.ay ile 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$).

Tablo 29: MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip AgP ve KP hastalarının başlangıç, 1.ay, 3. ay ve 6. ay klinik periodontal parametreleri (Ort±ss)

	Ölçüm zamanları	Şiddetli AgP		Grup içi p	Şiddetli KP		Grup içi p
		GG (n=24)	GC ve CC (n=8)		GG (n=20)	GC ve CC (n=8)	
SCD (mm)	Başlangıç	4.7±1	4.2±0.7	= 0.20	3.8±0.5	4.1±0.5*	=0.04
	1.ay	2.6±0.4	2.5±0.3		2.5±0.4	2.4±0.3	
	3.ay	2.5±0.3	2.3±0.3		2.3±0.3	2.3±0.2	
	6.ay	2.3±0.3	2.2±0.1		2.2±0.3	2.2±0.3	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e,f	a,b,c,d,e,f		a,b,c	a,b,c,e,f	
4-6 mm SCD (%)	Başlangıç	39.7±12.8	41.6±11.1	=0.31	46.6±11.4	51±15.6	=0.96
	1.ay	21.6±13.6	16.8±10.7		11.3±11.2	10.4±6	
	3.ay	15.5±9.8	11.9±8.7		9.7±10.6	7.8±5.7	
	6.ay	12.6±9.3	7.25±5.3		7.45±9.2	6±4.6	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e,f	a,b,c,d,e,f		a,b,c	a,b,c	
≥7 mm SCD (%)	Başlangıç	21.4±15.6	17.63±16.2	= 0.38	7.1±8.4	9.8±6.2	=0.46
	1.ay	0.8±1.2	0.13±0.3		0.2±0.6	0±0	
	3.ay	0.3±0.7	0±0		0.2±0.4	0±0	
	6.ay	0.4±1.1	0±0		0.1±0.3	0±0	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
KAK (mm)	Başlangıç	5.6±1.2	5.4±0.9	=0.20	4.9±1.2	5.7±0.6	=0.68
	1.ay	4±0.8	4.2±0.8		3.5±1	4.1±0.6	
	3.ay	3.8±0.7	4±0.7		3.5±1.1	4.1±0.5	
	6.ay	3.7±0.7	3.9±0.7		3.3±1	4.1±0.6	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,e	a,b,c,e		a,b,c	a,b,c	
4-6 mm KAK (%)	Başlangıç	38.4±12	39.75±14.2	=0.30	52.4±10.5	49±13.1	=0.88
	1.ay	43.8±13.6	37.4±21.5		57.3±15.2	60.1±14.3	
	3.ay	42.5±14.8	34.63±23.2		57.4±17	57.3±14.3	
	6.ay	42.8±16.8	30.8±18.9		56.5±20	60.5±13.4	
Zamanlar arası p	>0.05	-	-		-	-	
≥7 mm KAK (%)	Başlangıç	35.21±17.3	27.63±23	=0.36	29.5±15.7	35.6±13.5	=0.67
	1.ay	10.8±11.1	6±10.3		7.2±6	5.4±4.5	
	3.ay	7.4±7.6	5.6±8.7		6.1±5.9	7±8.4	
	6.ay	6.4±7.2	6.1±13.7		5.9±6.4	6.4±7.8	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
Sondalamada kanama (%)	Başlangıç	80.5±16.4*	73.5±18.4	=0.02	66.6±22.8	68.5±20.8	=0.87
	1.ay	27.5±9.8	19.1±11.7		17.3±9.2	19.6±10.6	
	3.ay	27.9±10.4	15.4±8.4		17.3±8.9	14.5±9.3	
	6.ay	21.8±8.5	17.8±10.2		15.7±7.7	17±9.1	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c	a,b,c		a,b,c	a,b,c	
Plak (%)	Başlangıç	92.8±9.8	97.13±3.9	=0.59	90.4±17.9	99±1	=0.18
	1.ay	43.9±17.4	39±24.4		34.6±14.3	39.3±11.8	
	3.ay	37.1±11.3	36.9±10.9		29.8±7.2	30.1±6.5	
	6.ay	27.5±4.5	24.9±2.8		26.9±4.1	26.1±3.9	
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,e	a,b,c,e		a,b,c,d,e	a,b,c,d,e	

a: başlangıç-1.ay, b: başlangıç-3.ay, c: başlangıç-6.ay, d: 1.ay-3.ay, e: 1.ay-6.ay, f: 3.ay-6.ay (p<0,05)

Şiddetli agresif ve kronik periodontitis hastalarında uygulanan antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların sondalanan cep derinliği ve klinik ataşman kazancı için belirli dönemlerin ortalamaları ile başlangıç ortalaması arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir .Bu anlamlılığın genetik farklılığa bağlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacı ile ilaç ve plasebo grubu gözetmeksizin tedaviye verilen cevaba genetiğin etkisi Fisher exact test ile değerlendirildi (Tablo 30). Bu amaçla MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotiplerine sahip hastaların tüm klinik periodontal parametrelerinin ortalamalarının medyanları belirlendi. Tüm klinik periodontal parametreler için bu medyanların altında olanlar tedaviye iyi cevap verenler, üstünde olanlar ise tedaviye iyi cevap vermeyenler olarak değerlendirildi. Buna göre agresif periodontitis grubunda SCD, sondalamada kanama ve plak değerleri her iki genotip grubunda da benzer bulundu ($p>0.05$). KAK için ise 3. ve 6. aylarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($p=0.042$ ve $p=0.043$). Kronik periodontitis grubunda da agresif periodontitis grubuna benzer olarak SCD, sondalama kanama ve plak değerleri benzer olarak saptanırken ($p>0.05$), KAK 3.ve 6. ay değerleri için genotip grupları arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p=0.41$ ve $p=0.43$). Bu sonuçlara göre MİF -173 GG genotipinin tedaviye daha başarılı cevap verdiği, MİF -173 C allelini taşıyan bireylerin tedaviye daha kötü cevap verdiği sonucuna ulaşılabilmektedir. Anlamlı çıkan bu sonuçlarda tedavi ilaç ve plasebo kullanan gruplar olarak ayrıldığında, bireylerin gruplardaki dağılımlarının dengeli olmadığı görüldü. Düşük sayıdaki hasta sayısı ile yapılacak istatistik değerlendirmesinin yeteri güce sahip olmayacağından dolayı tedavi gruplarının ayrı değerlendirildiği bir analiz yapılamadı.

Tablo 30: MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipilerinin klinik periodontal parametrelerinin dönem ortalamaları ile başlangıçları arasındaki farklar üzerine etkisi (Grup medyanlarının altındaki ve üstündeki hasta sayısı)

		Şiddetli AgP (n=32)				Şiddetli KP (n=28)		
		GG	GC VE CC	p		GG	GC VE CC	P
SCD B-1.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
SCD B-3.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	5	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
SCD B-6.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
KAK B-1.AY	-	12	4	p>0.05	-	11	3	p>0.05
	+	12	4		+	11	3	
KAK B-3.AY	-	9	7*	p=0.042	-	8	6*	p=0.041
	+	15	1*		+	14	0*	
KAK B-6.AY	-	10	6*	p=0.043	-	9	5*	p=0.043
	+	14	2*		+	13	1*	
Kanama B-1.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
Kanama B-3.AY	-	12	4	p>0.05	-	11	3	p>0.05
	+	12	4		+	11	3	
Kanama B-6.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
PLAK B-1.AY	-	11	5	p>0.05	-	12	2	p>0.05
	+	13	3		+	10	4	
PLAK B-3.AY	-	11	5	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	
PLAK B-6.AY	-	10	6	p>0.05	-	10	4	p>0.05
	+	13	3		+	12	2	

* Diğer gruptan istatistiksel olarak anlamlı fark

Genotip dağılımları benzer olan ilaç ve plasebo gruplarında DOS hacmi ve DOS MİF protein seviyeleri başlangıç ve tedavi sonrası takip dönemlerinde değerlendirildi. Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanılan azitromisin ve plasebo grubu ilaçların DOS MİF protein seviyeleri üzerine olan etkisinin karşılaştırılması AgP için Tablo31’de verildi.

AgP değerlendirildiğinde; DOS hacimlerinde başlangıç ve takip dönemlerinde test ve plasebo grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.28$). Zamanlar arasında her iki grupta da anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda iki grup için benzer olarak başlangıca göre tedavi sonrası, ikinci hafta, 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 35).

Test ve plasebo grupları için DOS MİF protein düzeyi karşılaştırıldığında, test ile plasebo gruplarında başlangıç değerlerinin benzer olduğu belirlendi ($p>0.05$). Her iki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmedi ($p>0.05$).

KP ele alındığında; DOS hacimleri test ve plasebo grupları arasında başlangıç ve takip dönemlerinde elde edilen değerler arasındaki fark anlamlı değildi ($p=0.49$). Test ve plasebo gruplarında başlangıca göre tedavi sonrasında, ikinci haftada, 1. ay, 3. ay ve 6 ayda anlamlı farklar belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 35).

Test ve plasebo grupları arasında DOS MİF protein düzeyleri bakımından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo32). Test ve kontrol gruplarında başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

MİF-173C genotipine (GC ve CC) ve GG genotipine sahip bireylerdeki başlangıç ve tedavi tamamlandıktan hemen sonra, 2. hafta, 1. ay, 3. ay ve 6. aylarda DOS MİF protein seviyeleri değerlendirildi. İlaç ve plasebo uygulamalarının DOS hacmi ve DOS MİF protein seviyeleri üzerine benzer etki göstermeleri nedeniyle, KP ve AgP hastaları C allel taşıyıcı ve GG genotipine göre gruplandırılarak tedavinin etkinliği değerlendirildi.

AgP grubunda DOS hacimlerinde başlangıç ve takip dönemlerinde iki genotip grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.45$). Zamanlar arasında her iki grupta da DOS hacimlerinde anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0.001$). Yapılan ikili karşılaştırmalarda iki grup için de benzer olarak başlangıca göre tedavi sonrası, ikinci hafta, 1. ay, 3. ay ve 6. ay arasında DOS hacimleri bakımından anlamlı farklar olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo 35).

C taşıyıcı ve GG genotip grupları için DOS MİF protein düzeyleri karşılaştırıldığında, GG grubu ile C taşıyıcı (GC ve CC) gruplarının başlangıç ve takip dönemlerindeki değerlerinin benzer olduğu gözlemlendi ($p=0.05$). Her iki grupta da başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı bir değişim gözlemlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 33).

KP ele alındığında;

DOS düzeylerinde gruplar arasında başlangıç ve takip dönemlerinde elde edilen fark anlamlı değildi ($p=0.52$). Her iki grupta başlangıca göre zaman içerisinde anlamlı düşüşler gözlemlendi ($p<0.001$). GG ile C taşıyıcı (GC ve CC) gruplarında başlangıca göre tedavi sonrasında, ikinci haftada, 1. ay, 3. ay ve 6 ayda anlamlı farklar belirlendi ($p<0.001$) (Tablo 35).

C taşıyıcı ve GG genotip grupları arasında DOS MİF protein düzeyleri bakımından anlamlı fark belirlenemedi ($p>0.05$). GG grubu ile C taşıyıcı (GC ve CC) gruplarının başlangıç ve takip dönemlerindeki değerlerinin benzer olduğu gözlemlendi ($p=0.05$). GG ile GC ve CC gruplarında başlangıca göre takip dönemlerinde anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 34).

AgP ve KP grupları birbirleri ile tedaviye verdikleri cevap açısından karşılaştırıldıklarında başlangıç ve takip dönemlerinde DOS hacimlerinde anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0.05$). DOS MİF protein seviyeleri bakımından başlangıç ve tüm takip dönemlerinde AgP grubunda KP grubuna oranla istatistiksel olarak daha yüksek miktarlarda DOS MİF protein seviyesine sahip olduğu gözlemlendi ($p<0.001$) (Tablo 36).

Tablo 31: Şiddetli AgP hastalarında cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların DOS MİF protein seviyeleri üzerine etkisi

			DOS MİF Protein Seviyeleri (pg/Örnek)				
Şiddetli AgP	Tedavi	n	Ortalama Değer	Mediyan	RANKLARIN		p
					Ort.	Ss.	
Başlangıç	İlaç	16	98.35	68.15	15.25	8.42	>0.05
	Plasebo	16	74.56	66.4	15.79	9.54	
Tedavi Sonrası	İlaç	16	88.72	50.4	18.31	9.17	>0.05
	Plasebo	16	58.15	47.6	14.69	9.53	
2.Hafta	İlaç	16	62.45	48.4	15.87	9.72	>0.05
	Plasebo	15	86.43	50	16.13	8.78	
1.Ay	İlaç	16	80.54	52.1	16.63	9.10	>0.05
	Plasebo	16	79.87	52	16.38	9.95	
3.Ay	İlaç	16	54.18	50.2	14.75	8.77	>0.05
	Plasebo	16	79.84	51.4	18.25	9.92	
6.Ay	İlaç	15	59.34	56.8	16.64	9.59	>0.05
	Plasebo	16	49.87	42.2	13.47	7.38	

Tablo 32: Şiddetli KP hastalarında cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçların DOS MİF protein seviyeleri üzerine etkisi

			DOS MİF Protein Seviyeleri (pg/Örnek)				
Şiddetli KP	Tedavi	n	Ortalama Değer	Mediyan	RANKLARIN		p
					Ort.	Ss.	
Başlangıç	İlaç	16	67.43	53.7	14.64	8.98	>0.05
	Plasebo	16	59.65	47.9	13.31	6.94	
Tedavi Sonrası	İlaç	16	45.53	24.9	15.29	8.27	>0.05
	Plasebo	16	37.39	32.1	12.62	7.64	
2.Hafta	İlaç	16	53.85	47.4	15.31	8.37	>0.05
	Plasebo	15	40.45	26.8	11.69	6.69	
1.Ay	İlaç	16	41.68	38.05	14.57	9.50	>0.05
	Plasebo	16	40.35	32.95	14.43	7.09	
3.Ay	İlaç	16	41.00	25.4	14.79	8.11	>0.05
	Plasebo	16	40.83	28.7	14.21	8.64	
6.Ay	İlaç	15	53.84	47.4	15.07	9.33	>0.05
	Plasebo	16	40.35	37.4	12.85	6.28	

Tablo 33: MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip AgP hastalarının başlangıç, tedavi sonrası, 2. hafta, 1.ay, 3. ay ve 6. ay DOS MİF protein seviyeleri

			DOS MİF Protein Seviyeleri (pg/Örnek)				
Şiddetli AgP	Tedavi	n	Ortalama Değer	Mediyan	RANKLARIN		p
					Ort.	Ss.	
Başlangıç	GG	24	85.16	70.6	15.29	8.59	>0.05
	CC ve GC	8	73.25	58.7	14.25	8.86	
Tedavi Sonrası	GG	24	73.09	50.5	17.17	9.23	>0.05
	CC ve GC	8	74.49	49	14.50	10.18	
2.Hafta	GG	23	73.46	53.5	14.87	9.18	>0.05
	CC ve GC	8	50.17	44.5	10.63	6.70	
1.Ay	GG	24	71.86	53.9	17.67	10.10	>0.05
	CC ve GC	8	74.75	49.35	13	5.98	
3.Ay	GG	24	72.73	54.7	18	9.45	>0.05
	CC ve GC	8	49.85	43.4	12	8.07	
6.Ay	GG	24	47.55	51.7	13.67	9.97	>0.05
	CC ve GC	8	49.87	42.2	13.47	7.38	

Tablo 34: MİF-173C allel taşıyıcı (GC veCC) ve GG genotipine sahip KP hastalarının başlangıç, tedavi sonrası, 2. hafta, 1.ay, 3. ay ve 6. ay DOS MİF protein seviyeleri

			DOS MİF Protein Seviyeleri (pg/Örnek)				
Şiddetli KP	Tedavi	n	Ortalama Değer	Mediyan	RANKLARIN		p
					Ort.	Ss.	
Başlangıç	GG	20	72.36	55.8	14.53	7.81	>0.05
	CC ve GC	8	32.40	22.3	12.75	8.65	
Tedavi Sonrası	GG	20	73.09	50.5	17.17	9.23	>0.05
	CC ve GC	8	74.49	49	14.50	10.18	
2.Hafta	GG	18	42.64	36.2	13.42	7.44	>0.05
	CC ve GC	8	34.55	14.9	10.13	7.45	
1.Ay	GG	20	49.3	42.95	15.35	8.22	>0.05
	CC ve GC	8	33.56	23.85	12.38	8.38	
3.Ay	GG	20	72.73	54.7	18	9.45	>0.05
	CC ve GC	8	49.85	43.4	12	8.07	
6.Ay	GG	20	47.55	51.7	13.67	9.97	>0.05
	CC ve GC	8	49.87	42.2	13.47	7.38	

Tablo 35: Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak verilen antibiyotik ve plasebo grubu ilaçlar ve MİF-173 GG ile GG ve CC genotiplerinin DOS hacmi üzerine etkisi (Ort±ss)

	Ölçüm zamanları	Şiddetli AgP		Grup içi p	Şiddetli KP		Grup içi p	Gruplar arası p
		İlaç (n=16)	Plasebo (n=16)		İlaç (n=14)	Plasebo (n=14)		
DOS Hacmi (µl)	Başlangıç	0.4±0.2	0.3±0.1	= 0.28	0.3±0.1	0.4±0.2	=0.49	>0.05
	Tedavi Sonrası	0.2±0.1	0.1±0.07		0.2±0.07	0.2±0.1		
	2. Hafta	0.1±0.06	0.2±0.1		0.1±0.06	0.1±0.1		
	1.ay	0.1±0.07	0.1±0.04		0.1±0.08	0.1±0.08		
	3.ay	0.1±0.05	0.2±0.09		0.1±0.05	0.1±0.07		
	6.ay	0.1±0.06	0.1±0.05		0.1±0.05	0.1±0.06		
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e	a,b,c,d,e		a,c,d,e	a,b,c,d,e		
		GG (n=24)	GG veCC (n=8)		GG (n=20)	GG veCC (n=8)	Grup içi p	Gruplar arası p
DOS Hacmi (µl)	Başlangıç	0.3±0.08	0.4±0.3	=0.45	0.3±0.2	0.3±0.1	=0.52	>0.05
	Tedavi Sonrası	0.2±0.09	0.1±0.1		0.2±0.1	0.2±0.06		
	2. Hafta	0.2±0.1	0.1±0.05		0.1±0.06	0.1±0.03		
	1.ay	0.2±0.06	0.08±0.03		0.2±0.09	0.1±0.1		
	3.ay	0.2±0.09	0.1±0.05		0.1±0.07	0.1±0.1		
	6.ay	0.1±0.06	0.1±0.06		0.1±0.06	0.1±0.06		
Zamanlar arası p	<0.001	a,b,c,d,e	a,b,c,d,e		a,b,c,d,e	a,b,c,d,e		

Tablo 36: Şiddetli AgP ve KP hastalarının başlangıç ve takip dönemlerindeki DOS MİF Protein düzeylerinin karşılaştırılması

			DOS MİF Protein Seviyeleri (pg/Örnek)				
	Hastalık Grubu	n	Ortalama Değer	Mediyan	RANKLARIN		P
					Ort.	Ss.	
Başlangıç	Şiddetli KP	32	63.1	55.8	25.13	18.13	<0.05
	Şiddetli AgP	28	93.3	68.2	34.18	14.32	
Tedavi Sonrası	Şiddetli KP	31	41.6	39.7	24.39	18.49	<0.05
	Şiddetli AgP	28	73.4	50.4	36.21	13.33	
2.Hafta	Şiddetli KP	31	45.3	27.2	23.10	17.45	<0.05
	Şiddetli AgP	27	58.7	49.4	35.12	13.65	
1.Ay	Şiddetli KP	32	45.1	28.5	23.25	17.48	<0.05
	Şiddetli AgP	28	55.6	50.7	36.49	13.45	
3.Ay	Şiddetli KP	32	41.1	29.3	23.34	18.38	<0.05
	Şiddetli AgP	28	67.0	51.4	38.68	12.18	
6.Ay	Şiddetli KP	30	47.2	37.4	23.39	16.63	<0.05
	Şiddetli AgP	27	54.3	56.1	33.04	12.78	

BÖLÜM IV TARTIŞMA

Çalışmamızda Türk toplumundaki bireylerde, enflamatuvar ve immün yanıtta öncü bir sitokin olduğu kabul edilen MİF'e ait -173G/C polimorfizminin KP ve AgP'ye yatkınlıktaki rolü, genotipin fenotip üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca tek başına veya azitromisin ile birlikte uygulanan cerrahisiz periodontal tedavinin etkilediği klinik periodontal ve biyokimyasal parametrelerin genotip ile ilişkisi araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler Türk toplumunda değerlendirilen MİF-173G/C gen promoter polimorfizminin şiddetli AgP ve KP ile ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. AgP ve KP gruplarındaki GG ile GC ve CC genotiplerine sahip olan bireylerin uygulanan periodontal tedaviye verdikleri cevabın farklı olabileceği bulunmuştur. Şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol gruplarında DOS MİF protein düzeyleri ve genotip ilişkisi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu sonuçlara benzer olarak, dişeti dokusunda MİF mRNA ekspresyonları da genotip ile ilişkili bulunmamıştır.

Dişeti oluşu içerisinde biriken bakterilerin ve ürünlerinin dişeti dokularını uyarması sonucunda, konak tarafından enflamatuvar cevap oluşturulur. Periodontitise karşı oluşan enflamatuvar yanıt çift taraflı bir bıçak gibidir. Bir taraftan dokuların içine bakteriyel invazyonu engelleyerek koruyucu görev görürken, diğer taraftan koruyucu amaçla üretilen medyatörler doku yıkımına neden olurlar (146). Bu özelliği ile enflamatuvar artrit, enflamatuvar kemik ve solunum sistemi hastalıkları gibi kronik enflamatuvar hastalıklarla benzer özellikler göstermektedir.

Periodontal hastalıkların ilerlemesinde; periodontopatojenlerin uyarısı altında konağa bağlı faktörler ile çevresel ve genetik faktörlerin kombinasyonu, konak cevabını yönlendirmekte, enflamatuvar sitokinlerin ve doku yıkımına neden olan enzimlerin (MMP ve PGE2) yüksek konsantrasyonlarda, buna karşılık antienflamatuvar sitokinlerin ise düşük konsantrasyonlarda bulunmasına neden olmaktadır. Ancak periodontal hastalıklara karşı oluşturulan immün yanıtın bireyler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılığın genetik faktörlere bağlı olabileceği görüşü üzerinde birleşilmektedir. Ancak periodontitiste genetik olarak meydana gelen varyasyonlar Mendel tarafından tanımlanan kurallara uygun değildir. Periodontal hastalıklardaki genetik yatkınlık, birçok gendeki değişime ve çevresel faktörlere bağlı bununla birlikte istatistiksel güce dayalı kompleks bir yapıdır.

Periodontal hastalıkların enflamatuvar ve immun cevabını etkileyen genler üzerinde genetik araştırmalar yapılmaktadır. İmmun cevapta hücre içerisinde hazır bulunması, ve uyarılması için düşük antijen konsantrasyonlarına ihtiyaç duyması nedeniyle proenflamatuvar bir sitokin olarak kabul edilen MİF'e ait genetik varyasyonların periodontal hastalıkların patogenezinde rol alabileceği düşünülerek, bu sitokine ait MİF-173G/C polimorfizmi ile periodontal hastalığa yatkınlık ve periodontal hastalığın şiddeti arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

MİF polimorfizmleri, MİF'in promoter bölgesinde 2 tane, intron bölgesinde de 2 tane olan, tek nükleotid polimorfizmleridir. Donn ve ark. (44), 4 farklı polimorfizm bölgesini (-173G/C, -794CATT5-7, +254T/C, +656C/G) değerlendirdikleri çalışmalarında, sadece promoter bölgesindeki (-173 ve -794) polimorfizmlerin fonksiyonel olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte - 173G/C polimorfizminin MİF ekspresyonunu doğrudan etkilediğini in vivo ve in vitro olarak göstermişlerdir. - 794 CATT polimorfizminin MİF ekspresyonu üzerindeki etkisinin ise sınırlı olduğunu belirlenmiştir. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda MİF ekspresyonu üzerinde doğrudan etkisi olan -173G/C polimorfizmi değerlendirilmiştir. Ancak tek bölgede meydana gelen nükleotid değişimlerinin tek başlarına her zaman hastalığa yatkınlık veya hastalık şiddeti üzerine etkin olamadığı bilinmektedir. Birden fazla polimorfizm değerlendirilerek, haplotipin etkisinin inceleneceği ileri çalışmalara gereksinim olduğunu düşünüyoruz.

Periodontal hastalıklar ile koroner kalp hastalıkları, inme, diyabet ve aterosklerozis gibi sistemik hastalıklar arasında kronik enflamatuvar süreç açısından benzerlik olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (142). Buna ek olarak periodontal hastalıkların Romatoid artrit ile nedensel ilişkisi benzer olmasa da, hastalık patogenezinin benzer olduğu saptanmıştır (13, 97). Kronik enflamatuvar hastalıklar ile periodontitisin ilişkisinden yola çıkarak, adı geçen bu hastalıklardaki MİF polimorfizmleri ile ilgili çalışmalar değerlendirilmiştir. Kronik enflamatuvar hastalık gruplarında MİF polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, Çin toplumunda C allel taşıyıcılığının koroner kalp hastalığı için risk faktörü olabileceği öne sürülmektedir (115). İtalyan toplumunda yapılan ve inme ile MİF polimorfizmi arasında ilişkinin değerlendirildiği çalışmada, test ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (102). Periodontitis ile patogenezi açısından benzerliği olduğu kabul edilen obesite ile MİF-173G/C polimorfizmi

arasında pozitif bir ilişki saptanmamış, ancak bu çalışmada CATT5-7 polimorfizmi ile obesite arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (110).

Donn ve ark. (46), MİF-173G/C polimorfizmi ile juvenil idiopatik artrit (JİA) arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, C allel sıklığının juvenil idiopatik artrit (%20.5), kontrol grubuna (% 10.2) göre daha fazla olduğunu saptamışlardır. Genotip dağılımında da CC ve GC genotipleri için gruplar arasında anlamlı fark olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonucunda C allel taşıyıcılığının JİA için risk faktörü olduğu ve hastalığa yatkınlıkta rol aldığı belirlenmiştir. JİA ile MİF polimorfizminin araştırıldığı diğer bir çalışmada; C allel sıklığının JİA grubunda daha fazla olduğu ve hastalığa yatkınlığa neden olduğu saptanmıştır (44). Benedetti ve ark. (17)'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada, diğer araştırmalara benzer olarak JİA ile MİF -173G/C polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada, C allel taşıyıcılığı ile hastalığa yatkınlık arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. Ayrıca serum ve eklem sıvısındaki MİF konsantrasyonu C allel taşıyıcılarda G allel taşıyıcılarına oranla daha yüksek saptanmıştır. Donn ve ark (45) JİA için yaptıkları diğer bir çalışmada da, C allelinin hastalığa yatkınlıkta etkin olduğu saptanmış, aynı zamanda CATT7-173C* haplotipini hastalık için risk faktörü olarak belirlemişlerdir. C alleli taşıyan bireylerde serum MİF konsantrasyonu diğer çalışmalara benzer olarak yüksek bulunmuştur. Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada, C alleli ile JİA arasında pozitif bir ilişki olduğu yayımlanmıştır (158). Enflamatuvar poliartrit'in değerlendirildiği bir çalışmada, önceki çalışmalara benzer olarak C allelinin poliartrite yatkınlıkta risk faktörü olduğu, C allelinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olmadığı ortaya konmuştur (14). Bu araştırmaların aksine, Mitterski ve ark (103), riskli olduğu kabul edilen C allelinin sıklığını kontrol grubu ve juvenil romatoid artrit hastalarında benzer, romatoid artrit hastalarında ise daha düşük olarak saptamışlardır. RA'nın değerlendirildiği başka bir çalışmada, MİF polimorfizmleri ile RA arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış, C allelini taşıyanlarda daha fazla eklem hasarı olduğu ve serum MİF konsantrasyonun daha yüksek olduğu belirlenmiştir (121). Martinez ve ark. (95) yaptıkları çalışmada ise, C alleli ile RA arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. RA ile MİF polimorfizmi arasındaki ilişkinin incelendiği araştırmalarda sonuçların farklı olmasının, seçilen populasyonun heterojenliğine bağlı olduğu öne sürülmüştür. Berdeli ve ark. (20) tarafından Türk toplumunda yapılan bir çalışmada, JİA ile MİF-173G/C polimorfizmi arasındaki ilişki

değerlendirilmiş, JİA hastaları ile kontrol grubu arasında genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından anlamlı bir fark saptanamamıştır. Araştırmacılar hasta sayısının az olması ile bu sonuçların ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, C allelini taşıyan hastaların glikokortikoid tedavisine verdikleri cevabın daha kısa süreli ve etkilenen eklem sayısının daha fazla olduğunu saptamışlardır (20). Daha önce yapılmış, MİF polimorfizmi ile periodontal hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma günümüzde mevcut değildir. Bizim sonuçlarımıza göre, genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımında KP, AgP ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Berdeli ve ark.(20)'nın çalışması ile bizim çalışmamızın sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, Türk toplumunda MİF-173G/C polimorfizminin ve allel sıklıklarının kronik enflamatuvar hastalıklara duyarlılıkta etkin olmadığı öne sürülebilir.

Genetik polimorfizmlerin periodontal hastalıklardaki olası etkisini inceleyen birçok genetik çalışma, istatistiksel değerlendirmeler için periodontitis oluşumunda etkili olan diğer risk faktörlerini göz önüne almamıştır (144). Oysaki genetik risk faktörlerinin periodontitise yatkınlıktaki rolü araştırılırken yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörler ile mikrobiyal enfeksiyon bileşenlerinin düzenleyici faktörler olarak regresyon analizlerine alınması gerektiği ileri sürülmüştür (88,144). Bu nedenle araştırmamızda yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve sondalamada kanamayı içeren risk faktörleri düzeltici faktörler olarak dikkate alınarak lojistik regresyon analizleri yapılmıştır. Sonuçta incelenen MİF polimorfik allel taşıyıcı genotiplerinin şiddetli AgP ve KP için risk faktörü olmadıkları belirlenmiştir. Diğer taraftan araştırmamızda; yaş, sigara kullanımı ve sondalamada kanamanın AgP ve KP grupları için risk oluşturduğu, cinsiyetin ise anlamlı bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sondalamada kanamanın periodontal hastalığın ilerleme riskini belirlemede önemli bir gösterge olduğu kabul edilmektedir (157). Sondalamada kanamanın olmaması ise büyük ölçüde periodontal sağlığın bir göstergesidir (80). Bireyin sondalamada kanama olan dişeti bölgelerinin yüzdesi, o bireyde periodontal hastalığın meydana gelme riskinin belirlenmesinde önemlidir (80). Araştırmamızda sondalamada kanamanın şiddetli AgP ve KP için risk faktörü olarak belirlenmesi bu bilgiler ile paralellik göstermiştir. Şiddetli KP ve AgP gruplarının oluşturulmasında, sigara içmeyenlerin yanısıra 5 yıldan daha kısa süre için günde 10 ve daha az sigara kullanan bireylerin seçilmesine dikkat edilmesine rağmen, gruplarda sigara

kullananların oranı oldukça yüksektir. Bu nedenle çalışmamızda sigara kullanımı bir risk faktörü olarak belirlenmiş olup, sigara kullanımı polimorfizm ile hastalığa yatkınlık arasındaki ilişkinin maskelenmesine yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızın bir diğer amacı; MİF-173G/C genotip dağılımlarının fenotipik özelliklere nasıl yansıdığının araştırılmasıdır. Şiddetli AgP ve KP gruplarında MİF-173G/C geninin polimorfik allelini taşıyan genotiplere sahip bireylerin, bu genotipe sahip olmayanlardan klinik periodontal parametreler için farklı fenotipik özellik göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla hastalık şiddeti ile MİF polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Daha önce MİF polimorfizmi ile periodontitis arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışma bulunmamasından dolayı sonuçlarımız karşılaştırılamamıştır. Geniş bir populasyon içeren grup ile bu polimorfik alleli taşıyan genotip ile bunun fenotip ile olan ilişkisinin incelenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

DOS'daki MİF protein düzeyleri ile MİF'in incelenen polimorfik genotiplerinin ilişkisini değerlendirmek için, DOS'dan birim zamanda elde edilen proteinlerin toplam miktarları gözönüne alınmıştır. DOS'da bulunan biyokimyasal bileşenlerin miktarları toplam miktar ve konsantrasyon olarak verilebilir. Ancak serum ve tükürük gibi birim hacimde alınabilen vücut sıvılarının içerikleri konsantrasyon olarak ifade edilebilirken, DOS gibi birim hacimde alınamayan vücut sıvılarındaki, özellikle çok küçük hacimde alınabilen sıvı örneklerindeki protein düzeylerinin birim zamanda toplanan örneklerdeki toplam miktar olarak ifade edilmesinin gerektiği bildirilmiştir (78). Bu nedenle çalışmamızda, DOS MİF protein seviyeleri, birim zamanda toplanan DOS'da bulunan enzimlerin toplam miktarı (pg/örnek) olarak değerlendirilmiştir. Literatürde, MİF'in dişeti oluğu sıvısındaki protein ekspresyonunu inceleyen bir araştırma bulunmamaktadır. Çalışmamız DOS MİF protein düzeylerini inceleyen ilk çalışma olma niteliğindedir. Şiddetli AgP, KP ve sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldığında, DOS MİF protein seviyelerinin, şiddetli AgP grubunda, şiddetli KP ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Şiddetli KP ve sağlıklı kontrol grubu arasında da anlamlı bir farklılık belirlenmiştir. Şiddetli AgP grubunda başlangıç ve takip dönemlerinin tümünde DOS MİF protein seviyeleri şiddetli KP grubunda göre yüksek değerlerde saptanmıştır.

Şiddetli AgP, KP ve sağlıklı bireylerde dişeti dokusundaki rölatif MİF mRNA ekspresyon miktarı ve DOS'daki protein düzeyleri ile MİF-173C allel taşıyıcı genotipi (GC ve CC) arasındaki ilişkinin belirlenmesi çalışmamızın diğer bir amacını oluşturmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda şiddetli AgP ve KP gruplarında birbirine benzer, aynı zamanda sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek oranlarda MİF mRNA ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. AgP ve KP gruplarında polimorfik allel taşıyan ve taşımayan genotip gruplarında MİF mRNA ekspresyonlarının benzer olduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada herhangi bir hastalık grubu belirtilmeksizin dişeti dokusunda MİF mRNA ekspresyonunun varlığı araştırılmış ve kalitatif olarak gösterilmiştir (104). Çalışmamız, periodontitisli hastalarda farklı genotip gruplarında dişeti dokusunda MİF mRNA ekspresyonunun varlığını araştıran ilk araştırmadır. Varlığını kantitatif olarak belirlediğimiz MİF mRNA düzeyinin, daha geniş çalışma gruplarında değerlendirilmesiyle daha sağlıklı sonuçlar elde edilebileceği kanısındayız.

Cerrahisiz periodontal ve antimikrobiyal tedavilerin tamamlanmasının ardından, hastalarımız destekleyici periodontal tedavi için kontrol programına alınmış ve uygulanan periodontal tedavinin etkinliğinin MİF gen polimorfizmi ile ilişkisi incelenmiştir. Şiddetli AgP ve KP gruplarında uygulanan tedavilerden sonra takip dönemlerinde, MİF-173C polimorfik allel taşıyıcı (GC ve CC) grupları ile bu polimorfik alleli taşımayan genotip (GG) grubunda klinik periodontal parametrelerde benzer değişikliklerin olduğu bulunmuştur. Ancak ilaç ve plasebo grubu ayrı olarak değerlendirilmeden GG ile GC ve CC genotiplerine sahip bireylerin tedaviye verdikleri cevap karşılaştırıldığında C allel taşıyıcısı bireylerin tedaviye verdikleri cevabın daha kötü olduğu belirlenmiştir. C alleli taşımayan grubun, C alleli taşıyan gruba göre, gerek AgP ve gerekse de KP grupları için tüm dönemlerde tedaviye daha iyi cevap verdiği, ancak bu farklılığın KAK 3. ay ve 6. aylarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Tedavi grupları ilaç ve plasebo olarak ayrılarak değerlendirdiğinde, hasta dağılımlarının dengeli olmadığı belirlenmiştir. Yapılacak analizin istatistiksel gücünün yeterli olmayacağından dolayı ayrı bir değerlendirme yapılmamıştır. Çalışmamızda, diğer sistemik enflamatuvar hastalık gruplarına benzer olarak, C allel taşıyıcısı olan bireylerin tedaviye verdikleri cevap C allel taşıyıcısı olmayanlara oranla daha kötü bulunmuştur. Çalışmamız MİF polimorfizmi

ile cerrahisiz periodontal ve antimikrobiyal tedavinin etkinliğinin ilişkisini değerlendiren ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

MİF-173G/C polimorfizmi ile uygulanan tedavilerin etkinliklerinin biyokimyasal olarak belirlenmesi amacıyla, DOS MİF protein seviyeleri tedavi sonrası, 2. hafta, 1, 3 ve 6. ayda tekrar değerlendirilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen ve tedavi gören şiddetli AgP hastalarından elde edilen DOS MİF protein düzeylerinin C alleli taşıyan ve taşımayan bireylerde benzer olduğu belirlenmiştir. Şiddetli AgP grubunda C allel taşıyan veya GG genotipine sahip bireylerde tedavi sonrası zaman içerisindeki değişimlerin anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Şiddetli KP grubundaki bireyler değerlendirildiğinde, bu bireylerden elde edilen DOS örneklerindeki MİF protein seviyelerinin AgP'ye benzer olarak, C allelini taşıyan ve taşımayan bireylerde benzer olduğu saptanmıştır. GC ve CC ile GG genotipine sahip bireylerde DOS MİF düzeyi bakımından takip sürecinde zaman içerisinde değişim olmadığı belirlenmiştir. DOS MİF protein düzeyinde zaman içerisinde değişiklik meydana gelmemesinin varolan enflamasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan tedavi sonrası tüm dönemlerde enflamasyonun önemli bir belirtisi olan sondalamada kanamanın fizyolojik sınırlar içerisinde ancak ~ %20 değerlerinde olduğu belirlenmiştir. Enflamauvar süreçte öncü olduğu kabul edilen MİF'in dönemler arası değişikliğin benzer değerlerde saptanmasının erken enflamatuvar yanıtındaki rolüne bağlı olduğu kanısındayız. Ayrıca Morimoto ve ark (2003) tarafından yapılan çalışmada diş fırçalama gibi mekanik uyarıların ardından MİF ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. DOS MİF protein miktarının zaman içerisinde değişmemesinin gerek dişetine gelen mekanik travmalar gerek se de varolan sınırlı enflamasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak azitromisin grubu antibiyotik tedavisi uyguladığımız hastalarda çalışmamızın sonuçlarına göre, her iki hastalık grubunda ilaç ve plasebo grupları arasında klinik periodontal parametreler ve DOS MİF protein seviyeleri bakımında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. AgP ve KP hastalarının tüm klinik periodontal parametrelerinin dönem değerlerinin ortalamaları ile başlangıç değerlerinin ortalamaları arasındaki farklar ilaç ve plasebo grubu için değerlendirilmiştir. AgP hastalarında SCD 1. ile 3. aylardaki ve KAK 3. ile 6. aylardaki değişimlerinin ilaç grubunda plasebo grubuna göre daha fazla olduğu saptanmıştır. KP grubunda ise SCD 3. ay değişiminin ilaç grubunda plaseboya göre

daha yüksek olduğu saptanmıştır. Literatürde AgP hastalarının tedavisinde cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanılan azitromisinin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak ilaç kullanan grupta sondalanan cep derinliğindeki azalmanın plasebo grubuna göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (64). KP hastalarının tedavisinde azitromisinin etkinliğinin değerlendirildiği dört çalışmanın tümünde de SCD>6 mm olan bölgelerde ilaç grubunda plasebo grubuna göre daha başarılı sonuçların elde edildiği belirlenmiştir (61,68,96,147). Bizim alışmamızda KP hastalarının ilaç ve plasebo gruplarında tüm parametreler için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sadece SCD 3. ayındaki değişim anlamlı bulunmuştur. Araştırmamızda klinik periodontal parametreler bakımından çalışma gruplarımız arasında anlamlı farkın elde edilememesinin ve sonuçlarımızın diğer çalışmalardan farklı olmasının nedeninin, çalışmamızda yapılan cerrahisiz periodontal tedavinin etkinliğinin yüksek olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol gruplarında MİF-173G/C genotip dağılımları farklılık göstermemiştir.
2. Şiddetli KP, AgP ve sağlıklı kontrol gruplarında genotip dağılımları ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
3. Şiddetli KP ve AgP hastaları için polimorfik allel taşıyan genotip grupları ile polimorfik allel taşımayan genotip grubunun başlangıç klinik periodontal parametreleri arasında fark olmadığı belirlenmiştir.
4. KP ve AgP için risk faktörü olabilecek parametrelere (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, sondalamada kanama) düzeltme yapılarak uygulanan lojistik regresyon analizinde, MİF-173C* allelinin bu hastalıklar için risk oluşturmadığı gözlenmiştir.
5. Uygulanan periodontal tedavinin ardından her iki hastalık grubunda başlangıç ile takip dönemleri arasındaki SCD ve KAK değerleri bakımından farkların ilaç grubunda plasebo grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
6. Şiddetli AgP ve KP hastalarının uygulanan periodontal tedavilere verdikleri yanıtta incelenen polimorfik allel taşıyan genotipin etkisi incelendiğinde; C allel taşıyıcısı olan bireylerin tedaviye verdiği cevabın daha kötü olabileceği belirlenmiştir.
7. Şiddetli AgP ve KP hastalarının başlangıç ve takip dönemlerindeki DOS MİF protein seviyelerinin, AgP hastalarında başlangıç ve tüm takip dönemlerinde KP'ye göre daha yüksek değerlerde olduğu saptanmıştır.
8. Şiddetli AgP ve KP hastalarının dişeti dokusundaki rölatif MİF mRNA düzeyleri sağlıklı kontrole göre daha yüksek oranda bulunmuştur.
9. DOS örnekleri alınan bireylerin genotip dağılımlarına bakıldığında; şiddetli AgP, KP ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.
10. Polimorfik allel taşıyan ve taşımayan genotip gruplarının cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak kullanılan azitromisin tedavisine verilen yanıt üzerine etkisi değerlendirildiğinde, gerek şiddetli AgP ve gerekse de KP hastalarında genotip gruplarının tedaviye benzer cevap verdiği saptanmıştır.

Çalışmamızın sonuçları ışığında, enflamatuvar hastalıkları patogenezinde yer alan MİF' in periodontal hastalıkların patogenezinde de rol alabileceğini düşünmekteyiz. Peridontal hastalıkların patogenezindeki yerinin tam olarak belirlenebilmesi için hayvan çalışmalarına ihtiyaç olduğu görüşündeyiz. MİF defektli hale getirilen farelerde periodontitisin gelişip gelişmediğinin belirlenmesi elde edilen sonuçları destekler yönde veriler elde etmemizi sağlayacaktır. Bu çalışmalar sonucunda patogenezdaki yerini tam olarak belirleyecek sonuçlar elde edilirse, yine hayvan çalışmaları ile anti-MİF tedavilerinin etkinliğinin araştırılması söz konusu olabilir.

BÖLÜM VI

ÖZET

Periodontitisli Bireylerde MİF-173 G/C Polimorfizmi ile Dişeti Dokusundaki MİF Ekspresyonunun Saptanması: Cerrahisiz Periodontal Tedaviye Ek Olarak Kullanılan Azitromisin'in DOS MİF Düzeyi Üzerine Etkisinin Araştırılması.

Şiddetli KP ve AgP hastaları ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde MİF polimorfizminin incelenmesi, bu polimorfizmin; klinik periodontal parametreler, dişeti dokusunda MİF mRNA ekspresyonu ve MİF' dişeti oluğu sıvısındaki protein düzeyleri üzerine olan etkisi ve cerrahisiz periodontal tedaviye yardımcı olarak uygulanan antimikrobiyal tedaviye verilen cevap ile genotip arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. 97 şiddetli KP, 123 şiddetli AgP ve 124 periodontal sağlıklı birey çalışmamıza dahil edildi. Periferik kan örneklerinden genomik DNA elde edildi. MİF -173 G/C polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi ile değerlendirildi. Dişeti örneklerinde, RT-PCR yöntemi ile MİF mRNA ekspresyon düzeyi incelendi. Alınan DOS örneklerinde, MİF protein seviyeleri değerlendirildi. Ayrıca bu hastalara cerrahisiz periodontal tedavi ve buna yardımcı olarak azitromisin grubu antibiyotik verilerek tedavi edildi. MİF protein seviyeleri ELİSA yöntemi ile saptandı. Grupları arasında MİF -173 G/C polimorfizmi için genotip dağılımları ve allel sıklıkları bakımından anlamlı bir fark saptanmadı. Lojistik regresyon analizinde bu polimorfizmin KP ve AgP için risk faktörü olmadığı belirlendi. Dokudaki rölatif MİF mRNA ekspresyonu AgP ve KP için sağlıklı gruptan daha yüksek olduğu bulundu. Polimorfik allel taşıyan ve taşımayan genotip gruplarında mRNA ekspresyonlarının benzer olduğu saptandı. C alleli taşıyan bireylerin uygulanan tedaviye verilen cevabın C alleli taşımayanlara oranla daha kötü olduğu belirlendi. DOS MİF protein düzeyleri başlangıçta AgP grubunda KP ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha fazla bulundu. Çalışmamızda; Türk toplumunda MİF -173 G/C promoter polimorfizminin şiddetli KP ve AgP ile ilişkili olmadığını, ancak uygulanan tedaviye verilen cevapta bu polimorfizmin bir etkisinin olabileceği belirlenmiştir. Bu çalışma MİF' in periodontal hastalıklardaki etkisini araştıran ilk çalışmadır. Sonuçlarımıza göre şiddetli AgP grubunda MİF mRNA ve DOS MİF protein düzeyleri sağlıklı gruba göre yüksek bulunmuştur. Bu noktadan hareketle daha geniş populasyonlar ile araştırmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler:Kronik-agresif periodontitis,MİF,polimorfizm,mRNA,DOS

ABSTRACT

Evaluation of the -173 G/C Polymorphism and Gingival Expression of MIF in Periodontitis Subjects: The Effect of Azithromycin as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid MIF Level.

The aim of this study is to determine the MIF polymorphism in periodontally healthy subjects, severe KP and AgP patients and the relationship between genotype and the response of the antimicrobial treatment of the polymorphism which is an associate implementation of non-surgical periodontal treatment and the effect on the protein levels of MIF Gingival Crevicular Fluid (GCF) and MIF mRNA expression in gingival tissue with clinical periodontal parameters. 97 severe KP, 123 severe AgP and 124 periodontally healthy subjects were included to our study. Genomic DNA is obtained from the periferic blood samples of this subjects. MIF -173 G/C polymorphism is evaluated with the PCR-RFLP method. MIF mRNA expression levels examined with RT-PCR method. GCF MIF protein leves are evaluated. Also this patients are treated with azithromicyn as adjunct of non-surgical periodontal treatment. MIF protein levels in GCF samples with are determined with ELISA method. Significant differences are not determined for MIF -173G/C polymorphism from the genotype distribution and allele frequency point of view in examined KP, AgP and healthy control groups. It is determined that this polymorphism is not a risk factor for AgP and KP in logistics regression analysis. It is found that relative MIF mRNA expression in tissue for AgP and KP is higher than healthy group. Relative mRNA expression similarity is determined in the genotype groups which are polymorphic allele carrying and non-carrying. The difference is founded between the genotype groups in the response of the periodontal treatment. In the beginning, GCF MIF protein levels are found to be higher in AgP groups than KP and healty control group. Our study is determined that there is no relationship between MIF -173 G/C promoter polymorphism with severe KP and AgP in Turkish population and there is an effect of this polymorphism in the response of the treatment. This study is the first study investigate the effect of the MIF in periodontal diseases. According to our results, MIF mRNA and GCF MIF protein levels are higher in severe AgP group than healty groups. From this point, investigations must be covered with wide range of populations.

Key Words:Chronic and aggressive periodontitis,MIF,polymorphism,mRNA,GCF

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R., Metz, C.N. (2001). Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor (MIF), *J Immun*, 166:747-753.
2. Amoli, M.M., Donn, R.P., Thomson, W., Hajeer, A.H., Garcia-Porua, C., Lueiro, M., Ollier, W.E., Gonzalez-Gay, M.A. (2002). Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism as associated with Sarkoidosis in biopsy proven erythma nodosum, *J. Rheum*, 29:1671-3.
3. Amoli, M.M., Garcia-Pourra, C., Ollier, W.E., Gonzalez-Gay, M.A. (2005). Lack of association between macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism and giant cell arteritis, *J Rheumatol*, 32(1):74-6.
4. Amoli, M.M., Martin, J., Miranda-Fillooy, J.A., Garcia-Porrua, C., Ollier, W.E., Gonzales-Gay, M.A. (2006). Lack of association between macrophage migration inhibitory factor gene (-173G/C) polymorphism and cutaneous vasculitis, *Clin Exp Rheumatol*, 24:576-9.
5. Arıkan, C., Berdeli, A., Özgenç, F., Tümgör, G., Yağcı, R.V., Aydoğdu, S. (2006). Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene - 173 G/C polymorphism with biliary atresia, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 42:77-82.
6. Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Nakamura, M., Yoshioka, D., Arima, Y., Okubo, M., Hirata, I., Nakano, H. (2007). Functional polymorphism in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and chronic gastritis, *Int. J. Mol. Med*, 20:539-44.
7. Armitage, G.C. (1999). Development of classification system for periodontal diseases and conditions, *Ann Periodontol*, 4:1-6.
8. Awandare, G.A., Ouma, C., Keller, C.C., Were, T., Otieno, R., Ouma, Y., Davenport, G.C., Hittner, J.B., Ong'echa, J.B., Ferrell, R., Perkins, D.J. (2006). A macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphism is associated with high-density parasitemia in children with malaria, *Genes Immun*, 7:568-75.

9. Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H.Y., Mu, W., Metz, C.N., Chesney, J.A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R.C., Bucala, R. (1997). Macrophage Migration Inhibitory Factor in experimentally induced endotoxemia, *Amer. J. Pathol*, 150:235-246.
10. Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Domnelly, T., Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in T-cell activation, *PNAS* 93:7849-7854.
11. Bartold, P.M. (1991). Connective tissue of the periodontium. Research and clinical implications, *Aust Dent J*, 36:255-268.
12. Bartold, P.M. (2000). Connective tissues of the periodontium, *Periodontology* 2000, 24:9-27.
13. Bartold, P.M., Marshall, R.I., Haynes, D.R. (2005). Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review, *J Periodontol*, 76 (11 Suppl):2066-74.
14. Barton, A., Lamb, R., Symmons, D., Silma, A., Thomson, W., Worthington, J., Donn, R. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism is associated with susceptibility to but not severity of inflammatory polyarthritis, *Genes and Immunity*, 4:487-491.
15. Baugh, J., Chitnis, S., Donnelly, S.C., Monterio, J., Lin, X., Plant, B.J., Wolfe, F., Gregersen, P.K., Bucala, R. (2002). A functional promoter polymorphism in the Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis, *Genes and Immunology*, 3: 170-176.
16. Baugh, J., Donnelly, S.C. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation, *Journal of Endocrinology*, 179:15-23.
17. Benedetti, F., Meazza, C., Vivarelli, M., Rossi, F., Pistorio, A., Lamb, R., Lunt, M., Thomson, W., the British Paediatric Rheumatology study group, Ravelli, A., Donn, R., Martini, A. (2003). Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the Macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, *Journal of Arthritis & Rheumatism*, 48(5): 1398-1407.

18. Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., Metz, C., Echtenacher, B., Peng, T., Bucala, R. (2000). The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) induces glucose catabolism in muscles, *J. Clin. Invest*, 106:1291-1300.
19. Berdeli, A., Mir, S., Ozkayın, N., Serdaroğlu, E., Tabel, Y., Cura, A. (2005). Association of macrophage migration inhibitory factor -173C allele polymorphism with steroid resistance in children with nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol*, 20:1566-71.
20. Berdeli, A., Özyürek, A.V., Ülger, Z., Gürses D., Levent, E. Salar, K. Gürpınar, A.R., (2006), Association of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene -173 G/C polymorphism with prognosis in turkish children with juvenil rheumatoid arthiritis, *Rheumatol Int*, 26:726-731.
21. Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A., Bucala, R. (1994). Purification, bioactivity and secondry structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Biochemistry*, 33:14144-14155.
22. Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Monague, K.R., Cerami, A., Bucala. R.(1993). MIF is a pituitary- derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia, *Nature* 365:756-759.
23. Blandizzi, C., Malizia, T., Lupetti, A., Pesce, D., Gabriele, M., Giuca, M.R., Campa, M., Del Tacca, M., Senesi, S. (1999). Periodontal tissue disposition of azithyromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases, *J Periodontol*, 70:960-966.
24. Bloom, B.R., Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in-vitro associated delayed-type hypersensitivity, *Science*, 153:80-2.
25. Bonfil, J.J., Dillier, F.F., Mercier, P.(1999). A “case control” study on the role of HLA-DR4 in severe periodontitis rapidly porgressive periodontitis. Identification of types and subtypes using molecular biology, *J Periodontol*, 26:77.
26. Bozza, M., Kolakowski, L.F., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., David, J.R., Gerard, C. (1995). Structural Characterization and chromozomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene and pseudogenes, *Genomics*, 27:412-419.

27. Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Friedrich, G., Schaefer, H.E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J., Ihling, C. (2002). Expression of Macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis, *Circulation*, 105:1561-1566.
28. Butler, J.H. (1969). A familial pattern of juvenile periodontitis (periodontosis), *J Periodontol*, 40:115.
29. Calandra, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and innate responses to microbes, *Scand Journal of Infectious Diseases*, 35: 573-576.
30. Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., Bucala, R. (1995), MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production, *Nature*, 377:68-71.
31. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R. (1994). Macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor (MIF), *J. Exp. Med*, 179:1895-1902.
32. Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D.L., Pugin, J., Metz, C.N., Hultner, L., Heumann, D., Manne, D., Bucala, R., Glauser, M.P. (2000). Protection from septic shock neutralization of macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Nature Med*, 6:164-170.
33. Calandra, T., Froidevaux, C., Martin, C., Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis, *The Journal of Infectious Diseases*, 187 (Suppl 2):385-90.
34. Calandra, T., Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity, *Journal of Immunology*, 3:791-800.
35. Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N., Bucala, N. (1998). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical mediator of the activation of immun cells by endotoxins of Gram-positive bacteria, *PNAS*, 95:11383-11388.
36. Carranza, F.A., Newman, M.G., Takei, H.H. (1996). Clinical Periodontology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 26:398-403.
37. Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., Bucala, R. (1999). An essential role for Macrophage migration inhibitory factor in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma, *Mol. Med*, 5:181-191.

38. Churchill, W.H.J., Piessens, W.F., Sulis, C.A., David, J.R. (1975). Macrophage activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells, *J. Immun.* 115:781-786.
39. Dambacher, J., Staudinger, T., Seiderer, J., Sisic, Z., Schnitzler, F., Pfennig, S., Hofbauer, K., Konrad, A., Tillack, C., Otte, J.M., Diebold, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173 G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and diseases activity in patients with Chron's disease, *Inflamm Bowel Dis*, 13:71-82.
40. Darby, I., Mooney, J., Kinane, D. (2001) Changes in subgingival microflora at humoral immun response following periodontal therapy, *J. Clin. Periodontol*, 28:796-805.
41. Daun, J.M., Cannon, J.G., (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha, *American. J. Phys. Reg. Int. Comp. Phys*, 279:1043-1049.
42. David, J.R. (1966). Delayed Hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction, *Proc Natl Acad Sci USA*, 56:72-7.
43. Dixon, D.R., Bainbridge, B.W., Darveau, R.P. (2004). Modulation of the innate immune response within the periodontium, *Periodontol 2000*, 35:53-74.
44. Donn, R., Alourfi, Z., Benedetti, F., Meazza, C., Zeggini, E., Lunt, M., Stevens, A., Shelly, E., Lamb, R., the British Paediatric Rheumatology study group, Ollier, E.R.W., Thomson, W., Ray, D. (2002). Mutation screening of the Macrophage migration inhibitory factor gene, *Journal of Arthritis & Rheumatism*, 46(9): 2402-2409.
45. Donn, R., Alourfi, Z., Zeggini, E. (2004). A Functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis, *Arthritis and Rheum*, 50:1604-10.
46. Donn, R., Shelly, E., Ollier, W.E.R., Thomson, W., the British Paediatric Rheumatology study group. (2001) A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, *Journal of Arthritis & Rheumatism*, 44(8): 1782-1785.

47. Donn, R.P., Plant, D.,Jury, F., Richards, H.L., Worthington, J., Ray, D.W. (2004). Macrophage Migration Inhibitory Factor Gene polymorphism is associated with Psoriasis, *J Invest Dermatol*, 123:484-487.
48. Donnelly, S.C., Haslett, C., Reid, P.T., Grant, I.S., Wallace, W.A.H., Metz, C.N., Bruce, L.J., Bucala, R. (1997). Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in acute respiratory distress syndrome, *Nature Med*, 3-321-323.
49. Doungudomdacha, S., Rawlinson, A., Walsh, T., Douglas, C., (2001), Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of Porphyromonas gingivalis, Prevotella Intermedia and actinobacillus actinomycetemcomitans at adult periodontitis sites, *J. Clin Periodontol*, 28:437:445.
50. Esumi, N. (1998). Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF, *Mamm. Genome*, 9:753-757.
51. Fei,B.Y.,Lv, H.X.,Yang,J.M.,Ye, Z.Y.(2008).Association of-173G/C gene with inflammatory bowel disease in Chinese Han population, *Cytokine*,41:44-7.
52. Fiero, D., Langkamp, H., Piesco, N., Kewitt, G., Johns, L., Agarwall, S.(1995). Characterization of human oral epithelial cell immune response, *J Dental Research*, 540-543.
53. Flaster, H., Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R. (2007). The MIF glucocorticoid Dyad: Regulation of inflammation and immunity, *Mol. Endoc*, 21(6):1267-80.
54. Flemming, T.F. (1999). Periodontitis, *Ann Periodontol*, 4:32-33
55. Flex A., Gaetani E., Papaleo P., Proia A.S., Pecorini G., Tondi P., Pola R. (2004). Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke, *Stroke*, 35; 2270-5.
56. Flex, A., Pola, E., Serricchio, P., Gaetani, E., Poia, A., Giorgio, A., Papaleo, P., Bernabei, R., Pola, P. (2004). Polymorphisms of the macrophage migration inhibitory factor and C-reactive protein genes in subjects with alzheimer dementia, *Dement. Geria. Cong. Proc*, 18:261-264.
57. Foulds, G., Shepard, R.M., Johnson, R.B. (1990). The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues, *J Antimicrobial Chemotherapy*, 25:73-82.

58. Glaude, R.P., Bright, G.M. Isaacson, R.E. (1989). In vitro and in vivo uptake of azithyromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: Possible mechanism of delivery and release at sites of infection, *Antimicrob Agents Chemother*, 33:277-282.
59. Gomez, L.M., Sanchez, E.i, Ruiz-Narvaez, E.A., Lopez-Nevot, M.A., Anaya, J.M., Martim, J. (2007). macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population, *Tissue Antigens*, 70(1): 28-33.
60. Gomi, K., Yashima, A., Iino, F., Kanazashi, M., Nagano, T., Shibukawa, N., Ohshima, T., Maeda, N., Arai, T. (2007). Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithyromycin, *J Periodontol*, 78:918-923.
61. Gomi, K., Yashima, A., Nagano, T., Kanazashi, M., Maeda, N. (2007). Effects of Full-Mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithyromycin, *J Periodontol*, 78:422-429.
62. Gonzales, J.R., Kobayashi, T., Michel, J., Mann, M., Yoshie, H., Meyle, J. (2004). Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasians patients with aggressive periodontitis, *J Clin Periodontol*, 31:384-389.
63. Gonzales, J.R., Michel, J., Diete, A., Herrmann, J.M. Bodeker, R.H., Meyle, J. (2002). Analysis of genetic polymorphism at the interleukin-10 loci in aggressive periodontitis, *J Clin Pei odontol*, 29: 816-822.
64. Haas, A.N., de Castro, G.D., Moreno, T., Susin, C., Albandar, J.M. Oppermann, R.V., Rösing, C.K. (2008). Azithyromycin as an adjunctive treatment og aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial, *J Clin Periodontol*, 35:969-704.
65. Haber, J., Wattles, J., Crowley, M. (1993). Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis, *J Periodontol*, 64:16.
66. Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R.L., Socransky, S.S., (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal deseases, *J. Clin. Periodontol*, 24:324-34.

67. Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Dibart, S., Smith, C., Kent, R.L., Socransky, S.S., (1997) Clinical and microbiological futures of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning, *J. Clin. Periodontol*, 24:767-776.
68. Haffajee, A.D., Torresyap, G., Socransky, S.S. (2007). Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results, *J Clin Periodontol*, 34:243-253.
69. Hart, T.C. (1996). Genetic risk factors for early onset periodontitis, *J Peridontol*,67:355.
70. Hizawa, N., Yamaguchi, E., Takashiba, D., Nishinira, J.,Nishimura, M. (2004). Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy, *Am J Respir Crit Care Med*, 169:1014-8.
71. Jasisnka, A., Michlewski, G., de Mezer, M., Sobczak, K., Kozlowski, P., Napierala, M., Krzyzosiak, W.J. (2003). Structures of trinucleotide repeats in human transcrips and their functional implications, *Nucleic Acids Res*, 31:5463-5468.
72. Kang, B.Y., Choi, Y.K., Choi, W.Y., Kim, K.T., Choi, S.S. Kim, K., Ha, N.J. (2003). Two polymorphisms of IL-4 gene in Korean adult periodontitis, *Arch Pharm Res*, 26:482-486.
73. Kaznowska, E., Przyłowska, K., Kulig, A., (2007). The -173G/C polymorphism of the promoter region macrophage migration inhibitory factor is not associated with incidence of pulmonary hamartoma, *Pol. J. Pathol*, 58:189-92.
74. Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Kentischer, B.A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurnlotu, A., Grell, M., Finkelmeler, D., Brunner, H., Bernhagen, J. (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab-1, *Nature*, 408:211-216.
75. Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, *Periodontol 2000*, 14: 33-53.

76. Kozak, C.A., Adamson, M.C., Buckler, C.E., Segovia, L., Paralkar, V., Wistow, G. (1995). Genomic Clonning of Mouse macrophage migration inhibitory factor (MIF) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes, *Genomics*, 27:405-411.
77. Kupper, T.S.(1990). The activated keratinocyte : a model for inducible cytokine production by none-bone marrow derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses, *J Invest Dermatol*, 94 (6 suppl):146-150.
78. Lambster, I.B., Hartley, L.J.,Oshrain, R.L., Gordon, J.M. (1985). Evaluation and modification of spectrophotometric procedures for analysis of lactate de hydrogenase, beta-glucuronidase and arylsulphatase in human gingival crevicular fluid collected with filter-paper strips, *Arch Oral Biol*, 30(3):235-242.
79. Lang, N., Bartold, P.M., Cullinan, M. (1999). Consensus report:Aggressive Periodontitis, *Ann Peridontol*,4:53.
80. Lang, N.P., Adler, R., Joss, A., Nyman, S. (1990). Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability, *J Clin Periodontol*, 17:714-721.
81. Leech, M., Metz, C., Santos, L., Peng, T., Holdsworth, S.R., Bucala, R., Morand, E.F. (1998). Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the evolution of rat adjuvant arthritis, *Arth. Rheum*, 41:910-917.
82. Leech, M., Lacey, D., Xue, J.R., Santos, L., Hutchinson, P., Wolvwatang, E., David, J.R., Bucala, R., Morand, E.F. (2003). Regulation p53 Macrophage migration inhibitoryy factor in inflammatory arthritis, *Journal of Arthritis & Rheumatism*,48(7):1881-1889.
83. Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutckinson, P., Ginanis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S.R., Bucala, R., Morand, E.F. (1999). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in rheumatoid arthritis: Evidence pro-inflammatory function and regulation by glicocorticoids, *Arth. & Rheumatism*, 42:1601-1608.
84. Leino, L., Hurttia, H. (1999). A potential role intracellular signalling in neutrophil functional abnormalities and promotion of tissue damage in patients with localized juvenile periodontitis, *Clin Chem Lab Med*, 37: 215.
85. Leng, L., Metz, C., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., Bucala, R. (2003). MIF signal transduction inhitaded by binding to CD74. *J. Exp. Med*, 197:1467-1476.

86. Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420:868-874.
87. Loesche, W.J., Giordano, J.r., Hujoel, P., Schwarcz, J., Smith, B.A. (1992). Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery, *J Clin Periodontol*, 19(2):103-12.
88. Loos, B.G., John, R.P., Laine, M.L. (2005). Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action, *J Clin Periodontol*, 32:159-179.
89. Loos, B.G., Leppers-Van de Straat, F.G., Van de Winkwl, J.G., Van der Velden, U. (2003). FcGamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis, *J Clin Periodontol*, 30:595-602.
90. Lue, H., Kapurniotu, A., Rowson, G.R., Roger, T., Leng, L., Thiele, M, Calandra, T., Bucala, R., Bernhagen, J. (2006). Rapid and transient activation of the ERK MAPK signaling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity, *Cell. Signal*, 18:688-703.
91. Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease, *Microbes and Infection*, 4: 449-460.
92. Makhija, R., Kingsnorth, A., Demaine, A. (2007). Gene polymorphhism of the Macrophage Migration Inhibitory Factor and Acute Pancreatitis, *J Pancreas*, 8(3): 289-295.
93. Marazati, M.L., Burmeister, J.A., Gunsolley, J.C. (1994). Evidince for autosomal dominant inheritance and race-specificheterogenecity in early-onset periodontitis, *J Periodontol*, 65:623.
94. Martiney, J.A., Sherry, B., Metz, C.N. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) release by macrophage after ingestion of plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia, *Inf. Immun*, 68:2259-67.
95. Martinez, A., Orozco, G., Varade, J., Lopez, M.S., Pascual, D., Balsa, A., Garcia, A., Concha, E.G., Gutierrez, B.F., Martin, J., Urcelay, E.(2007). Macrophage migration inhibitory factor gene: Influence on rheumatoid arthritis susceptibility, *Hum Immunol*, 68(9):744-7.

96. Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K., Hill, R., Soehren, S., Fenno, J. C., Giannobile, W.V., Wang, H. L. (2005). Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers, *J Periodontol*, 76:426-436.
97. Mercado, F.B., Marshall, R.I., Bartold, P.M. (2003). Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review, *J Clin Periodontol*, 30(9):761-72.
98. Meyer, D.D., Fives-Tyler, P.M. (1993). Evidence that extracellular components function in adherence in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells, *Infect Immun*, 61:4933-4936.
99. Meyer-Siegler, K. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) increases MMP-2 activity in DU-145 prostate cells, *Cytokine*, 12:954-921.
100. Meyer-Siegler, K.L., Vera, P.L., Iczkowski, K.A., Bifulco, C., Lee, A., Gregersen, P.K., Leng, L., Bucala, R. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence, *Genes Immun*, 8:646-52.
101. Mitchell, R., Liao, H., Chesney, J., Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response, *PNAS*, 99(1):345-350.
102. Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T., Bucala, R. (1999). Sustained Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action, *J. Bio. Chem*, 274:18100-18106.
103. Mitterski, B., Drynda, S., Böschow, G., Klein, W., Oppermann, J., Kekow, J., Epplen, J.T. (2004). Complex predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis, *BMC Genet*, 5:2-8.
104. Morimoto, T., Nishihira, J., Kohgo, T. (2003). Immunohistochemical localization of Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human gingival tissue and its pathophysiological functions, *Histochem Cell Biol*, 120:293-298.

105. Muro, M., Koseki, T., Akifusa, S., Kato, S., Kowashi, Y., Ohsaki, Y., Yamamoto, K., Nishijima, M., Nishihara, T. (1997). Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by macrophages and subsequent induction of apoptosis. *Infect Immun*, 65:1147-1151.
106. Nathan, C.F., Karnovsky, M.I., David, J.R., (1971). Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 133:1356-1376.
107. Nohara, H., Okayama, N., Inoue, N., Koike, Y., Fujimura, K., Suehiro, Y., Hamanaka, Y., Higaki, S., Yanai, H., Yoshida, T., Hibi, T., Okita, K., Hinoda, Y. (2004). Association of the -173 G/C polymorphism of the macrophage inhibitory factor gene with ulcerative colitis, *J Gastroenterol*, 39:242-246.
108. Ohshima, H., Takashiba, S., Oyaizu, K. (1996). HLA Class II genotypes associated with early onset periodontitis: DOB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease, *Journal of Periodontology*, 67:888.
109. Onodera, S., Tanji, H., Suzuki, K., Kaneda, K., Mizue, Y., Sagawa, A., Nishihira, J. (1999) High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine*. Feb;11(2):163-7.
110. Onodera, S., Nishihira, J., Koyama, J., Majima, T., Aoki, Y., Ichiyama, H., Ishibashi, T., Minami, A. (2004). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) up-regulates the expression of interleukin-8 mRNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8, interleukin-1 beta, *Arth. Rheum*, 50:1437-47.
111. Onodera, S., Kaneda, K., Mizue, Y., Koyama, Y., Fujinaga, M., Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis, *J. Bio. Chem*, 275:444-450.
112. Onodera, S., Nishihira, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanaka, S., Minami, A. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblast. Relevance to intracellular signaling pathways, *J. Bio Chem*, 277:7865-7874.
113. Page, R.C., Offenbacher, S., Schroder, H.E., Seymour, G.I., Kornman, K.S. (1997). Advances in pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications, future directions, *Periodontol 2000*, 14: 216-248.

114. Pajukanta, R. (1993). In vitro antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* to azithyromycin, a novel macrolide, *Oral Microbiol Immunol*, 8:325-326.
115. Pajukanta, R., Asikainen, S., Saarela, M. (1992). In vitro activity of azithyromycin compared with that of erythromycin against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 1241-43.
116. Pan, J.H., Sukhova, G.G., Yang, J.T., Wang, B., Xie, T., Fu, H., Zhang, Y., Satoskar, A.R., David, J.R., Metz, C.N., Bucala, R., Fang, K., Simon, D.I., Chapman, H.A., Libby, P., Shi, G.P. (2004). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice, *Circulation*, 109:3149-153,.
117. Paralkar, V., Wistow, G. (1994). Clonning the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Genomics*, 19:48-51.
118. Plant, B.J., Gallagher, C.G., Bucala, R., Baugh, J.A., Chappell,S., Morgan, L., O'Connor, C. M., Morgan, K., Donnelly, S.C. (2005). Cystic fibrosis, disease severity and a macrophage migration inhibitory factor polymorphism, *Am J Respir Crit Care Med*, 1(172):1412-5.
119. Plant, B.J., Ghani, S., O'Mahony, M.J., Morgan, L., O'Connor, C.M., Morgan, K., Baugh, J.A., Fonnelly, S.C. (2007). Sarcoidosis anf MIF gene polymorphism:a case control study in an Irish population, *Eur Respir J*, 29:325-9.
120. Quigley, G.A., Hein, J.W. (1962). Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing, *J Am Dent Assoc*, Jul;65:26-9.
121. Radstake, T.R.D.J., Sweep, F.C.G.J., Welsing, P., Franke, B., Vermeulen, S.H.H.M., Moespot, A.G., Calandra, T., Donn, R., Riel, P.L.C.M. (2005). Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor, *Arthrits and Rheum*, 52:3020-29,
122. Ranney, R.R. (1993). Classification of periodontal diseases, *Periodontol* 2000,2:13-25.
123. Reich, D.E., Lander, E.S. (2001). On the allelic spectrum of human disease, *Trends Genet*, 17:502-510.

124. Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J., Egelberg, J., (1990), Effect of root debridement on the elimination of *actinobacillus actinomycetemcomitans* and *bacteroides gingivalis* from periodontal pockets, *J. Clin. Periodontol.*, 17:345-350.
125. Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J., Egelberg, J., (1990), On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets, *J. Clin. Periodontol.*, 17:351-355.
126. Retsema, J., Girard, A., Schelkly, W., Manousos, M., Anderson, M., Bright, G., Borovoy, R., Brennan, L., Mason, R. (1987). Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31:1939-1947.
127. Rigante, D., Flex, A., Federico, G., Pola, R., Candelli, M., Manna, R., Pugliese A., Cerquaglia, C., Compagnone, A., Stabile, A., (2007). Serum macrophage migration inhibitory factor in the intercritical phase of hereditary periodic fevers and its relationship with the MIF -173G/C polymorphism, *Scan. J. Rheum*, 36(4):307-10.
128. Roberts, M.C. (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development, *Periodontol 2000*, 28:280-97.
129. Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C., Calandra, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4), *Journal of Endotoxin Research*, 9: No:2.
130. Rossi, A.G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A.P., Rahman, I., Metz, C.N., Bucala, R., Donnelly, S.C. (1998). Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF): potential role in asthma, *J. Clin. Invest.*, 101:2869-2874.
131. Rowson, G., Koch, P., Bikoff, R., Lin, X., Metz, C., Dhabhar, F., Meinhardt, A., Bucala, R. (2003). Regulation of Macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *American Journal of Pathology*;162(1):47-56.

132. Saglie, R., Marfany, A., Camargo, P. (1988). Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteriodes gingivalis* in active destructive periodontal lesions, *J Periodontol*, 59:259-265.
133. Sakaue, Z., Ishimaru, S., Hizawa N., Ohtsuka, Y., Tsujino, I. Honda, T., Suzuki, J., Kawakami, Y., Nishihira J., Nishimura M., (2006), Promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene is associated with obesity, *Int J Obes*, 30(2):238-42.
134. Sanchez,E., Gomez, L.M., Lopez-Nevot, M.A., Gonzalez-Gay, M.A., Sabio, J.M., Ortego-Centeno, N., de Ramon, E., Anaya, J.M., Gonzalez-Escribano, M.F., Koeleman, B.P., Martin, J. (2006). Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus, *Genes Immun*,7:433-6.
135. Santos, L., Hall, P., Metz. C., Bucala, R., Morand, E.F. (2001). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: Interaction with glucocorticoids, *Clin. & Exp. Immun*, 123:309-314.
136. Sapadin, A.N., Flischmajer,R. (2006). Tetracyclines:nonantibiotic properties and their clinical implications, *J Am Dermatol*, 54:258-65.
137. Satoskar, A.R., Bozza, M., Rodriguez, S.M., Lin, G., David, J.R. (2001). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major*, *Infection and Immunity*, 69:906-911.
138. Saxer, U.P., Muhlemann, H.R. (1975). Motivation and education, *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*,85(9):905-19
139. Scarel-Caminaga, R.M., Trevilatto, P.C., Souza A.P., Brito, R.B., Line, S.R. (2002). Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*, 29:587-591.
140. Scarel-Caminaga, R.M., Trevilatto, P.C., Souza A.P., Brito, R.B., Camargo, L.E., Line, S.R. (2004). Interleukin-10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*, 31: 443-448.
141. Schober, A., Weber, C. (2005). Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury, *Antioxid. Redox. Signal*, 7:1249-1257.
142. Seymour, G.J., Ford, P.J., Cullinan, M.P., Leischman, S., Yamazaki, K. (2007). Relationship between periodontal infections and systemic diseases, *Clin Microbiol Infect*, 13(Suppl):3-10.

143. Shan, Z.X., Fu, Y.H., Yu, X.Y., Deng, C.Y., Tan, H.H., Lin, Q.X., Yu, H.M., Lin, S.G. (2006). Association of the polymorphism of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene with coronary heart disease in chinese population, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 23(5):548-50.
144. Shapira, L., Wilensky, A., Kinane, D.F., Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection, *J. Clin. Periodontol*, 32:72-86.
145. Shapira, L., Soskolone, W.A., Van Dyke, T.E. (1996). Postoglandin E₂, secretion , cell maturation and CD 14 expression by monocyte-derived macrophages from localized juvenil periodontitis patients, *J Periodontol*, 67:224.
146. Slots, J., Feik, D., Rans, T.E. (1990). In vitro antimicrobia sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult peridontitis, *Oral Microbiol Immunol*, 5(5): 298-301.
147. Smith, S.R., Foyle, D.M., Daniels, J., Joyston-Bechal, S., Smales, F.C., Sefton, A., Williams, A. (2002). A double-blind placebo-controlled trial of azithyromycin as an adjunct to non-surgical periodontal treatment of periodontitis in adults:clinical results, *J Clin Pei odontol*, 29:54-61.
148. Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Goodson, J.M., Lindhe, J. (1984). New concepts of destructive periodontal disease, *Journal of Clinical Periodontology*, 11:21-32.
149. Stadnyk, A.W. (1990). Cytokine producton by epithelial cells, *FASEB J*, 8:1041-1047.
150. Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6Å resolution of macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5191-5196.
151. Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nisihira, J., Sakai, M. (1996). Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor (MIF) from rat liver, *Nat. Struct. Biol*, 3:259-66.
152. Svanborg, C., Agace, W., Hedges, S., Lindstedt, R., Svensson, M.L. (1994). Bacterial adherence and mucosal cytokine production, *Ann N Y Acad Sci*, 730:162-181.

153. Takamatsu, N., Yano, K., He, T., Umeda, M. Ishikawa, I., (1999), Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *J. Periodontol*, 70:574-580.
154. Takashiba, S., Naruishi, K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease, *Periodontol 2000*, 40:94-106.
155. Tonetti, M.S., Mombelli, A. (1999). Early onset periodontitis, *Ann Periodontol*, 4:39.
156. Umeda, M., Takeuchi, Y., Noguchi, K., Huang, Y., Koshy, G., Ishikawa, I. (2004). Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota, *Periodontol 2000*, 36:98-120.
157. Van der Velden, U., Winkel, E.G., Abbas, F. (1985). Bleeding/plaque ratio. A possible prognostic indicator for periodontal breakdown, *J Clin Periodontol*, 12:861-866.
158. Vivarelli, M., D'urbanu, L.E., Insalaco, A., Lundt, M. Jury, F., Tozzi, A.E., Ravelli, A., Martini, A., Donn, R., De Benedetti, F., (2007) macrophage migration inhibitory factor and oligoarticular juvenil idiopathic arthrititis (o-JIA): association of MIF promoter polymorphisms with response to intra-articular glucocorticoid, *Clin. Exp. Rheum*, 25(5):775-81.
159. Waeber, G., Callandra, T., Roduit, R. (1997). Insuline secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet B-cell macrophage migration inhibitory factor (MIF), *Proc. Nat. Acad. USA*, 94:4782-7.
160. Walker, C., Gordon, J. (1990). The effect of clindamycin on the microbiota associated with refractory periodontitis, *J Periodontol*, 61(11):692-8.
161. Weiser, W.Y., vd. (1989). Molecular Clonning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7522-7526
162. Wilkström, M., Renvert, S., Johson, T. Dahlen, G., (1993), Microbial associations in periodontitis sites before and after treatment, *Oral Microbiol. Immunol*, 8:213-218.
163. Wilson, M.E., Kalmar, J.R.(1996). FcγRIIa (CD32): A potential marker definig susceptibility to localized juvenile periodontitis, *J Periodontol*, 67:323.

164. Wistow, G.J., Shaughnessy, M.P., Lee, D.C., Hodin, J., Zelenka, P.S. (1993) Macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lense, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1272-1275.
165. Worthington, J. (2005). Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis, *J Autoimmunity*, 25;16-20.
166. Wu, S.P., Leng, L., Feng, Z., Liu, N., Zhao, H., McDonald, C., Lee, A., Arnett, F.C., Gregersen, P.K., Mayes, M.D., Bucala, R. (2006). Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms and the clinical expression of scleroderma, *Arthritis Rheum*, 54(11):3661-9.
167. Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., Galicia, J.C. (2007). The role of genetic polymorphism in periodontitis, *Periodontol 2000*, 43:102-132.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Sivas'ta doğdum. İlk öğretimimi Reşat Şemsettin Sirer ilkokulunda tamamladım. Orta öğretimime devam ettiğim Sivas Selçuk Anadolu Lise'sinden 1996 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nde üniversite eğitime başladım. 2001 yılında bölüm dördüncüsü olarak mezun oldum. 2002 yılında Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında doktora programına başladım, halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.