

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

PERİODONTAL AÇIDAN SAĞLIKLİ VE
PERİODONTAL HASTALIĞA SAHİP BİREYLERDE
TÜKÜRÜK BAKTERİSİDAL GEÇİRGENLİK
ARTTIRICI PROTEİN (BPI) VE İNTERLÖKİN-1BETA
(IL-1 β) DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Mustafa Burak DEMİRCİ

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Özlem DALTABAN

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

PERİODONTAL AÇIDAN SAĞLIKLI VE
PERİODONTAL HASTALIĞA SAHİP BİREYLERDE
TÜKÜRÜK BAKTERİSİDAL GEÇİRGENLİK
ARTTIRICI PROTEİN (BPI) VE İNTERLÖKİN-1BETA
(IL-1 β) DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Mustafa Burak DEMİRCİ

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Özlem DALTABAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDH-2019-4869 proje numarası ile desteklenmiştir.

2020-ANTALYA

ONAY SAYFASI

Mustafa Burak DEMİRCİ tarafından sunulan bu çalışma jürimiz tarafından **oy birliği/oy çokluğu** ile Periodontoloji Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Özlem DALTABAN
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Şükrü ENHOŞ
(İzmir Katip Çelebi Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Kemal ÜSTÜN
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Mükerrerem HATİPOĞLU
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Mehmet ÖZGÖZ
(Akdeniz Üniversitesi)

Bu tez,/...../..... tarih ve/..... sayılı Yönetim Kurulu kararıyla belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Diş Hekimliği Fakültesi

Kurum Yöneticisi

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Dt. Mustafa Burak DEMİRCİ

İmza

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık tezimin hazırlanma sürecinde karşılaştığım her sorunda yanımda olan, çalışmalarına bilgi ve deneyimleriyle yön veren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem DALTABAN'a,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, tez süreci ve uzmanlık eğitimim boyunca her türlü sorunu kendisine danışmaktan çekinmediğim, üzerimde emeği olan anabilim dalı başkanım Sayın Doç.Dr. Kemal ÜSTÜN'e,

Akademik ve sosyal hayatta desteğini hiçbir zaman esirgemeyeceğini bildiğim Sayın Doç. Dr. Mükerrerem HATİPOĞLU'na,

Güler yüzü ve samimiyetiyle desteğini her zaman hissettiğim Sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZGÖZ'e,

Akademik bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan mutluluk duyan, mesleki anlamda farklı bir bakış açısına sahip olmamı sağlayan ve bunlar için büyük fedakarlıklar gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nezahat Arzu KAYAR'a,

İyi günlerin en iyisini, kötü günlerin en kötüsünü beraber yaşadığımız, uzmanlık eğitimim sırasında, tez yazma sürecimde, özel hayatımda bana her zaman destek olan, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, bir kıdemlimden çok ablam olarak gördüğüm Sayın Uzm. Dt. Dilara SEZEN KORANA'ya

Birlikte vakit geçirmekten ve çalışma arkadaşı olmaktan büyük mutluluk duyduğum Arş. Gör. Dt. Murat ÇALIŞIR, Arş. Gör. Dt. Kazım KORKMAZ, Arş. Gör. Dt. M. Serhat YILMAZ, Arş. Gör. Dt. Mehmet Can KILINÇASLAN, Arş. Gör. Dt. Hilal KORKMAZ, Arş. Gör. Dt. Fatma KÖKSEL BABUN ve Dr. Dt. Zeliha AYTEKİN'e

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum klinik hemşirelerimiz Ulviye KAPLAN ve Derya SÜLÇE'ye, klinik personellerimiz Ahmet ÖZMEN ve Halil TURGUT'a

Her zaman yanımda olan, sevgilerini daima hissettiğim ve bugünlere gelme sürecimde büyük emek veren aileme,

Teşekkürlerimi

sunarım.

ÖZET

Amaç: Bakterisidal geçirgenlik artırıcı protein (BPI), gram negatif bakteri ve endotoksinlerine karşı antimikrobiyal ve endotoksin nötralize edici fonksiyonları ile konak savunmasında önemli rol oynayan ve tükürükte bulunan katyonik bir proteindir. Bu çalışmanın amacı, periodontal olarak sağlıklı ve periodontitisli bireydeki tükürük BPI ve interlökin-1beta (IL-1 β) seviyelerinin tespiti ve bu moleküllerin birbirleriyle ve klinik periodontal parametrelerle olan ilişkilerinin incelenmesidir.

Yöntem: Çalışmamıza sağlıklı kontrol grubu (n=50) ve periodontitis grubu (n=50) olmak üzere toplam 100 birey dahil edilmiştir. Tüm bireylerden plak indeksi (PI), gingival indeks (GI), sondlanabilir cep derinliği (SCD), sondlamada kanama (SK) ve klinik ataşman seviyesini (KAS) içeren klinik periodontal parametreler kayıt edildi. Tüm bireylerden uyarılmamış tükürük örnekleri toplandı. Toplanan tükürük örneklerindeki BPI ve IL-1 β seviyeleri enzim bağlı immün absorban yöntem (ELİSA) ile belirlendi. Elde edilen veriler SPSS 23.0 programı aracılığı ile analiz edildi

Bulgular: Yapılan istatistiksel analiz sonucunda tüm klinik periodontal parametrelerin periodontitis grubunda, periodontal olarak sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (p<0,001). Tükürükte değerlendirilen BPI ve IL-1 β seviyelerinin periodontitis grubunda periodontal olarak sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek seviyede olduğu belirlendi (p<0,001). Tükürük BPI seviyeleri ile tüm klinik periodontal parametreler ve tükürük IL-1 β seviyeleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar saptandı (p<0,01).

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarına göre; periodontitis grubunda tükürük BPI seviyelerinin daha yüksek olması bu biyobelirtecin periodontal hastalık patogenezinde rol oynayabileceğini ve ayrıca tükürük BPI seviyelerinin periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılabilecek bir biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Periodontitis grubunda tükürük BPI seviyelerinin periodontal olarak sağlıklı gruba göre yüksek seviyede gözlenmesi periodontitis ile BPI arasında patofizyolojik mekanizmanın açıklanmasında sonraki çalışmalara yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Periodontitis, IL-1 β , BPI, ELİSA, tükürük

ABSTRACT

Objective: Bactericidal permeability enhancing protein (BPI) is a cationic protein found in saliva that plays an important role in host defense with its antimicrobial and endotoxin neutralizing functions against gram-negative bacteria and endotoxins. The aim of this study is to determine the levels of BPI and interleukin-1beta (IL-1 β) in the saliva of periodontally healthy individuals and patients with periodontitis, and to examine the relationships between these molecules with each other and with clinical periodontal parameters.

Method: A total of 100 subjects, including the healthy control group (n = 50) and the periodontitis group (n = 50), were included in our study. Clinical periodontal parameters including plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD), bleeding at probing (BOP) and clinical attachment level (CAL) were recorded from all participants. Unstimulated saliva samples were collected from all participants. BPI and IL-1 β levels in the collected saliva samples were determined by enzyme linked immune absorbent method (ELISA). The obtained data were analyzed through the SPSS 23.0 program.

Results: As a result of the statistical analysis, it was found that all clinical periodontal parameters in the periodontitis group were statistically significantly higher than the periodontally healthy group ($p < 0,001$). BPI and IL-1 β levels in saliva were found to be statistically significantly higher in the periodontitis group compared to the healthy group ($p < 0,001$). Strong positive correlations were found between saliva BPI levels and all clinical periodontal parameters and saliva IL-1 β levels ($p < 0,01$).

Conclusion: According to the results of our study; we consider that higher salivary BPI levels in the periodontitis group may play a role in the pathogenesis of periodontal disease and also salivary BPI levels may be a biomarker that can be used in the diagnosis of periodontal diseases. The high level of saliva BPI levels in the periodontitis group compared to the healthy group may guide future studies in explaining the pathophysiological mechanism between periodontitis and BPI.

Keywords: Periodontitis, IL-1 β , BPI, ELISA, saliva

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Periodontal hastalıklar	3
2.2. Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması	3
2.2.1. Periodontal Sağlık ve Gingival Sağlık	4
2.2.2. Biyofilm ile İlişkili Gingivitis	5
2.2.3. Periodontitis	5
2.3. Periodontal Hastalıklarda Mikrobiyolojik Özellikler	8
2.4. Periodontal Hastalıklarda İmmünolojik Mekanizmalar	11
2.5. Periodontal Hastalıklarda Konak Savunması	12
2.6. Periodontitisin Patogenezi	14
2.7. Periodontitiste Sitokinler	17
2.7.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β)	18
2.8. Tükürük	19
2.9. Antimikrobiyal Protein ve Peptitler	21
2.9.1. Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein (BPI)	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Hasta Seçimi	28
3.2. Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri	28
3.3. Araştırma Planı	29
3.4. Klinik Periodontal Değerlendirmeler	30
3.4.1. Plak İndeksi (PI)	30
3.4.2. Gingival İndeks (Gİ)	31
3.4.3. Sondlanabilir Cep Derinliği (SCD)	31
3.4.4. Sondlamada Kanama (SK)	32
3.4.5. Klinik Ataşman Seviyesi (KAS)	32

3.5. Biyokimyasal Analizler	32
3.5.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması	32
3.5.2. Tükürük Örneklerinin Hazırlanması	33
3.5.3. Tükürük Örneklerinin Biyokimyasal Analizi	33
3.6. İstatiksel Analizler	36
3.6.1. Güç Analizi (Power Analizi)	36
3.6.2. Verilerin İstatistiksel Analizi	36
4. BULGULAR	37
4.1. Demografik Bulgular	37
4.2. Klinik Bulgular	37
4.3. Biyokimyasal Bulgular	38
4.3.1. Tükürük IL-1 β Seviyeleri	39
4.3.2. Tükürük BPI Seviyeleri	39
4.4. Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Korelasyon Analizleri	40
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55
EKLER	
EK-1 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	66
EK-2 Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	68
EK-3 Hasta Anamnez ve Periodontal İndeks Formu	72
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

Aa	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	Amerikan Periodontoloji Akademisi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMP	Antimikrobiyal Protein ve Peptitler
BPI	Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein
CD	Farklılaşma Kümesi
CETP	Kolesteril Ester Transfer Proteini
DC	Dendritik Hücre
DOS	Dişeti Oluğu Sıvısı
EFP	Avrupa Periodontoloji Federasyonu
ELISA	Enzym Linked-Immuno- Sorbent Assay
Fn	Fusobacterium nucleatum
g	Gram
Gİ	Gingival İndeks
GNB	Gram Negatif Bakteri
ICAM-1	Hücreler Arası Adezyon Molekülü
IL	İnterlökin
IFN- γ	İnterferon-gamma
Ig	İmmüoglobülin
KAK	Klinik Ataşman Kaybı
KAS	Klinik Ataşman Seviyesi
kDa	Kilodalton
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LBP	Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LOS	Lipooligosakkarit
LPS	Lipopolisakkarit
MCP-1	Monosit Kemoatraktan Protein-1
MD2	Lenfosit antijeni 96
ml	Mililitre
μ l	Mikrolitre
MMP	Matriks Metalloproteinaz

N	Newton
nm	Nanometer
NO	Nitrik Oksit
ns.	Nanosaniye
OD	Optical Density
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Pg	Porphyromonas gingivalis
Pİ	Plak İndeksi
Pi	Prevotella intermedia
PLTP	Fosfolipit Transfer Proteini
PLUNC	Damak, Akciğer ve Nazal Epitel Klonu
rBPI	Rekombinant BPI
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SCD	Sondlanabilir Cep Derinliği
SK	Sondlamada Kanama
sn.	Saniye
Td	Treponema denticola
Tf	Tannerella forsythia
Th	T Helper Hücre
TLR	Toll-Like Reseptör
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	T regulator hücre
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
° C	Santigrat Derece

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Periodontal Hastalıklarla İlişkili Mikrobiyal Kompleksler

Şekil 2.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi

Şekil 2.3. Tükürüğün Fonksiyonları

Şekil 2.4. Gram Negatif Bakterilerin LPS veya LOS Yapısı

Şekil 2.5. BPI'nin Yapı ve Fonksiyonları

Şekil 2.6. BPI ve LBP'nin Etki Mekanizması

Şekil 3.1. Çalışma Şeması

Şekil 3.2. A) Plakanın, Mikroplaka Yıkayıcıda Yıkanması B) Plakanın Çalkalayıcıda İnkübe Edilmesi C) Durdurma Solüsyonu Eklenmesiyle Mavi Rengin Sarı Renge Dönüşümü D) Mikroplaka Okuyucu Kullanılarak 450 nm'de Optik Yoğunluğun Belirlenmesi

Şekil 4.1. Çalışma Grupları Arasında Tükürük IL-1 β Seviyesinin Karşılaştırma Grafikleri

Şekil 4.2. Çalışma Grupları Arasında Tükürük BPI Seviyelerinin Karşılaştırılma Grafikleri

Şekil 4.3. Tükürük IL-1 β ile SCD Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

Şekil 4.4. Tükürük IL-1 β ile KAS Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

Şekil 4.5. Tükürük BPI ile SCD Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

Şekil 4.6. Tükürük BPI ile KAS Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

Şekil 4.7. Tükürük BPI ile SK Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

TABLULAR

Tablo 2.1. Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması

Tablo 2.2. Periodontitis Evreleri

Tablo 2.3. Periodontitis Dereceleri

Tablo 4.1. Demografik Verilerin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Tablo 4.2. Çalışma Grupları Arasında Periodontal Klinik Parametrelerin Karşılaştırılması

Tablo 4.3. Çalışma Grupları Arasında Tükürük IL-1 β ve BPI Seviyelerinin Karşılaştırılması

Tablo 4.4. Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Korelasyonları



1. GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, dental plak biyofilmine karşı başlayan dişeti enflamasyonunun, uygun şekilde tedavi edilmediği takdirde periodontal dokularda meydana gelen yıkım sonucunda diş kayıplarına sebep olabilen, toplumda sıklıkla görülen kronik multifaktöriyel enflamatuvar hastalıklardır.⁽¹⁾

Periodontal hastalıkların temel etkeni, subgingival biyofilm içerisinde bulunan gram negatif mikroorganizmaların başlattığı enfeksiyondur. Sağlıklı bireylerde faydalı mikroorganizmalar ile fırsatçı mikroorganizmalar arasında bir denge vardır. Bu dengenin bozulduğu, faydalı mikroorganizmaların çoğunluğunu yitirdiği durumlarda hastalık başlar. Mikrobiyotadaki dengenin fırsatçı mikroorganizmalar lehine bozulmasına “disbiyozis” denir. Periodontal hastalıkların ilerlemesi ve şiddetinde esas belirleyici olan biyofilm içerisinde meydana gelen disbiyotik değişiklikler ve patojen bakterilere karşı gelişen konak cevabıdır.⁽²⁻⁵⁾

Subgingival biyofilm içerisinde bulunan bakteriler konak savunma sistemlerini aşabilirse direk olarak periodontal dokularda yıkıma sebep olurken indirek olarak konak immün cevabında değişikliklere yol açarak yıkıma sebep olabilirler.^(6,7)

Periodontal dokularda mikrobiyal biyofilme karşı ilk savunma hattı epitel dokusu ve nötrofiller tarafından oluşturulur.⁽⁸⁾ Epitel dokusu ve nötrofiller; interlökinler (IL-1, IL-6), tümör nekrozis faktör, proteazlar (matriks metalloproteinaz) ve çeşitli antimikrobiyal protein ve peptitler (AMP) üreterek konak cevabında etkili olurlar.^(9,10)

AMP'ler farklı görevleri bulunan doğal antibiyotiklerdir. Antimikrobiyal özellikleriyle koruyucu etki gösterir ve konak savunma sistemlerinin düzenlenmesinde görev alır. Oral epitel hücreleri, nötrofiller ve tükürük bezlerinden salgılanabilen, yapısal olarak birçok gruba ayrılan AMP'ler gram pozitif, gram negatif bakterilere, virüslere ve mantarlara karşı geniş antimikrobiyal aktivite gösterir.^(10,11) Periodontal hastalıkların mikrobiyal bir hastalık olması sebebiyle AMP'lerin periodontal hastalık oluşumu ve ilerlemesinde patogenezinde rolü olabileceği ve yeni tedavi edici ilaçların üretiminde temel sağlayabilecek moleküller olduğu düşünülmektedir.^(10,12)

Yeni bir AMP olan bakterisidal geçirgenlik arttırıcı protein (BPI), fosfolipid transfer proteinleri ailesinin bir üyesidir.⁽¹³⁾ Yüksek oranda nötrofillerden eksprese edilir. Güçlü antimikrobiyal ve endotoksin nötralize edici özellikleri gram negatif bakteri ve endotoksinlerine karşı konak savunmasında önemli rol oynamaktadır.⁽¹⁴⁾

Gram negatif bakterilerde (GNB) bulunan lipopolisakkarit (LPS) enflamasyonun esas belirleyicisidir.⁽¹⁵⁾ BPI'nin GNB'lerin LPS'leri için ortak olan lipit A bölgesine yüksek afinite gösterir. BPI anti-enfektif aktivitelerini (i) doğrudan antimikrobiyal aktivite, (ii) LPS'yi bağlayarak, böylece endotoksik aktiviteyi nötralize ederek ve (iii) opsonik aktivite olarak 3 şekilde gerçekleştirir. BPI'nin bu aktiviteleri biyolojik sıvılarda tespit edilebilir.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

Konak savunma sistemlerinin ilk basamağında tükürük bulunur. Tükürük mekanik temizlik sağlar ve içeriğindeki bileşenler tamponlama ve antibakteriyel etki gösterir.⁽¹⁹⁾ Koruyucu etkilerine ek olarak tükürük, periodontal hastalıklara ve bakterilere karşı konak cevabında görevli bileşenleri içerir.⁽²⁰⁾ Bu nedenle tükürük, periodontal hastalıkların erken teşhisinde önemli bir biyolojik sıvıdır.⁽²¹⁾

Günümüzde periodontal hastalıklar, klinik periodontal parametrelerin değerlendirilmesi ve radyografik incelemeler ile belirlenmektedir.⁽²²⁾ Ancak bu yöntemler uygulandığı zaman dilimi hakkında bilgi verir. Bu nedenle hastalık aktivitesinin belirlenmesi ve risk taşıyan bireyleri tespit etmek amacıyla son yıllarda tükürük örnekleri yaygın teşhis seçeneği olarak kullanılmaktadır.^(23,24)

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, daha önce periodontal hastalıklarda incelenmemiş olan tükürük BPI seviyelerini tespit ederek, IL-1 β ve klinik periodontal parametrelerle karşılaştırılması sonucunda BPI'nin periodontal hastalıkların patogenezindeki rolünün belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalık, plak biyofilmi tarafından başlatılan dişeti enflamasyonunun, ilerleyen süreçlerde periodontal doku yıkımına ve alveolar kemik kaybına neden olması ile karakterize kronik multifaktöriyel enflamatuvar bir hastalıktır.⁽¹⁾ Toplumda yaygın olarak görülen periodontal hastalıklar, bireylerin yemek yeme ve konuşma gibi günlük aktivitelerini etkileyebilmelerinin yanı sıra ekonomik, sosyal ve psikolojik etkileri nedeni ile de önemli bir halk sağlığı sorunudur.^(1,25)

Periodontal sağlıktan, diş kaybının önde gelen nedenleri arasında sayılan periodontitise doğru ilerleyiş sürecini, biyofilm patojenleri ile birlikte buna eşlik eden konak immün yanıtları belirler.^(4,5)

2.2 Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal hastalık sınıflamalarının oluşturulmasındaki temel amaç, klinisyenlerin hastalıkları doğru bir şekilde teşhis ve tedavi etmelerini sağlamaktır. Ayrıca hastalıkların etiyojisi, patogenezi ve tedavisinin araştırılması esnasında bilim adamları arasında ortak bir dilin oluşması açısından da son derece önemlidir.

Amerikan Periodontoloji Akademisinin (AAP) düzenlemiş olduğu 1999 Çalıştay'ından bu yana nüfus çalışmalarından, temel bilim araştırmalarından, çevresel ve sistemik risk faktörlerini değerlendiren epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen yeni verilerin analizi, 2017 yılında yapılan Dünya Çalıştay'ını periodontal hastalıklar için yeni bir sınıflandırma geliştirmeye teşvik etmiştir. Amerikan Periodontoloji Akademisi (AAP) ve Avrupa Periodontoloji Federasyonunun (EFP) yayınladığı yeni sınıflamaya göre periodontal ve peri-implant hastalıklar ve durumlar dört ana başlık altında sınıflandırılmıştır (Tablo 2.1.).⁽²⁶⁾

Tablo 2.1. Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması⁽²⁶⁾

Periodontal Sağlık, Gingival Hastalıklar ve Durumlar

- Periodontal Sağlık ve Gingival Sağlık
- Gingivitis: Dental Biyofilme Bağlı
- Gingival Hastalıklar: Dental Biyofilme Bağlı Olmayan

Periodontitis

- Nekrotizan Periodontal Hastalıklar
- Periodontitis
- Sistemik Hastalıkların Bir Belirtisi olarak Periodontitis

Periodonsiyumu Etkileyen Diğer Durumlar

- Periodontal Destekleyici Dokuları Etkileyen Sistemik Hastalıklar veya Durumlar
- Periodontal Abseler ve Endodontik-Periodontal Lezyonlar
- Mukogingival Deformiteler ve Durumlar
- Travmatik Okluzal Kuvvetler
- Diş ve Protezle İlişkili Faktörler

Peri-İmplant Hastalıklar ve Durumlar

- Peri-İmplant Sağlık
- Peri-İmplant Mukozitis
- Peri-İmplantitis
- Peri-İmplant Yumuşak ve Sert Doku Eksiklikleri

2.2.1 Periodontal Sağlık ve Gingival Sağlık

Periodontal sağlığı tanımlamak; periodontal hastalığı doğru teşhis etmek ve ideal tedavi sonuçlarını belirlemek için ortak bir referans noktasının oluşturulması, periodontal enflamasyonun biyolojik gelişimini sistematik olarak değerlendirmek, popülasyonlardaki dişeti ve periodontal hastalık prevalansını belirlemek ve gelecekte hastalık gelişimi açısından bireysel riskleri değerlendirmek açısından büyük öneme sahiptir.⁽²⁷⁾

Periodontal sağlık; gingivitis, periodontitis ve periodonsiyumu etkileyen diğer durumların bulunmamasını ifade eder. Ayrıca herhangi bir enflamasyon belirtisi göstermeyecek şekilde başarılı bir şekilde tedavi edilmiş gingivitis, periodontitis ve diğer periodontal durumlarla ilişkili hastalık hikayesi bulunan hastaları da içerebilir.⁽²⁸⁾

Güncel sınıflandırmaya göre periodontal ve gingival sağlık durumlarında; ≤ 3 mm sondlama derinliği, $< 10\%$ sondlamada kanama olması ve dişetinde şişlik/ödem, pü ve renk değişikliğinin olmadığı durumdur.⁽²⁷⁾

2.2.2 Biyofilm ile İlişkili Gingivitis

Dental plağa bağlı gelişen gingivitis, dişeti kenarında ve apikalinde dental plak biyofilmi birikimi sonucu, mikrobiyal biyofilm ve konak arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelir. Dental plağa bağlı gelişen gingivitis dişeti ile sınırlıdır ve geri dönüşümlüdür.⁽²⁹⁾

2017 Dünya Çalıştayı'nda dental plak biyofilmine bağlı gelişen gingivitisler; sağlam periodonsiyum varlığında gelişen gingivitis, periodontitis olmayan bir hastada azalmış periodonsiyum varlığında gelişen gingivitis (örn. çekilme, kron boyu uzatma) ve başarıyla tedavi edilen bir periodontitis hastasında azalmış bir periodonsiyum varlığında gelişen gingivitis olarak 3 grupta sınıflandırılmıştır.⁽²⁷⁾

Dental plak biyofilmine bağlı gelişen gingivitisin önemli belirtilerinden biri sondlamada kanamadır ve tüm dişlerin $\geq 10\%$ 'unda sondlamada kanama izlenmesi gingivitis olarak tanımlanır. Sondlamada kanama değeri, 10% ve 30% arasında izlenirse lokalize gingivitis, 30% 'dan fazla izlenir ise generalize gingivitis olarak tanımlanır.^(30,31) Dental plak biyofilmine bağlı gelişen gingivitisin diğer klinik belirtileri arasında eritem, ödem, hassasiyet ve şişlik bulunur.^(32,33)

2.2.3 Periodontitis

2017 Dünya Çalıştayı'nda bildirildiği üzere periodontitis, disbiyotik plakla ilişkili ve periodontal destek dokuların ilerleyici yıkımı ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır.⁽¹⁾ Periodontitisin patofizyolojisi, marjinal periodontal ligament liflerinin yıkımına neden olan konak kaynaklı proteinazların aktivasyonu ve bu yıkım sonucunda bağlantı epitelinin apikale göçü ve bakteriyel biyofilmin kök yüzeyi boyunca apikale yayılması ile karakterizedir.⁽³⁾ Hastalığın temel özellikleri, periodontal cep varlığı ve dişeti kanaması ile görülen klinik ataşman kaybı ve radyografik olarak değerlendirilen alveolar kemik kaybıdır.⁽¹⁾

Yeni sınıflamada belirtildiği üzere periodontitisin klinik olarak teşhisi için; birbirine komşu olmayan en az 2 veya daha fazla dişte interdental klinik ataşman kaybı

bulunması ya da aynı şekilde 2 veya daha fazla dişin bukkal ya da oral bölgelerinde 3mm ya da daha fazla klinik ataşman kaybı ile birlikte 3mm ya da daha fazla sondlanabilir cep derinliği bulunması gerekmektedir. Ancak travmaya bağlı dişeti çekilmesi, dişin servikal bölgesine uzanan diş çürükleri, üçüncü molar dişin malpozisyonu veya çekimi kaynaklı ikinci molar dişin distalinde meydana gelen klinik ataşman kaybı, marjinal periodonsiyum bölgesinden drene olan endodontik lezyonlar ve vertikal kök kırıklarına bağlı meydana gelen klinik ataşman kayıpları periodontitis ile ilişkili olmayan sebeplere bağlı klinik ataşman kayıpları olmaları sebebiyle periodontitis olarak değerlendirilemez.^(1,34)

Günümüze kadar periodontitisler; başlama yaşı, hastalığın şiddeti ve seyri, mikrobiyal flora ve immünolojik özellikleri gibi birçok kriter göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. 2017 Çalıştayında ise periodontitisler patofizyolojilerine göre “Nekrotizan Periodontal Hastalıklar”, “Sistemik Hastalıkların Bir Belirtisi Olan Periodontitis” ve (daha önceki 1999 sınıflandırmasında iki ayrı hastalık olarak tanımlanan kronik ve agresif periodontitis formlarının patofizyolojik olarak farklı olmadığı sonucuna varılarak tek bir kategoride) “Periodontitis” olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca periodontitis formlarını evre (stage) ve derece (grade) olarak karakterize eden sisteme geçilmiştir.⁽²⁶⁾

Evre

Periodontitiste evrelemenin amacı; periodontal destek dokularda yıkıma sebep olan mevcut hastalığın şiddeti, dağılımı ve tedaviyi kompleks hale dönüştüren ve bu nedenle dikkat edilmesi gereken etkenlerin belirlenebilmesidir. Kısacası evreleme teşhis esnasında mevcut periodontal klinik durumun belirlenmesidir. Hastalığın şiddeti; interdental ataşman kaybı, radyografik olarak belirlenen oransal kemik yıkımı ve periodontitis kaynaklı diş kaybı sayısı tarafından belirlenir. Tedavi kompleksliği; ise sondlanabilir cep derinliği, kemik yıkım modeli (vertikal ve/veya horizontal), furkasyon tutulum derecesi, kapanış düzensizlikleri, rezidüel kret defekt boyutu ve diş mobilitesi gibi tedavi planı ve takibi açısından dikkat edilmesi gereken etkenlerden oluşur. Dağılım ise; her evre için lokalize (ilgili dişlerin <%30’u), generalize veya molar/keser tutulumu olarak belirlenir. Periodontitis evreleri 4 gruba ayrılarak değerlendirilir (Evre I-IV) (Tablo 2.2.).^(1,3)

Tablo 2.2. Periodontitis Evreleri^(1,3)

Periodontitis Evreleri		Evre I Başlangıç Periodontitis	Evre II Orta Derecede Periodontitis	Evre III Şiddetli Periodontitis	Evre IV İleri Periodontitis
Şiddet	En Fazla Kayıp Olan Bölgedeki İnterdental Klinik Ataşman Kaybı	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radyografik Kemik Kaybı	Koronal Üçlü (<%15)	Koronal Üçlü (%15-%33)	Kökün Orta ve Apikal Üçlüsüne Uzanan	Kökün Orta ve Apikal Üçlüsüne Uzanan
	Diş Kaybı	Periodontitise Bağlı Diş Kaybı Yoktur.		Periodontal Kaynaklı Diş Kaybı ≤ 4 Diş	Periodontal Kaynaklı Diş Kaybı ≥5
Karmaşıklık	Lokal	Maksimum Sondalama Derinliği ≤4 mm ve Çoğunlukla Horizontal Kemik Kaybı	Maksimum Sondalama Derinliği ≤5 mm ve Çoğunlukla Horizontal Kemik Kaybı	Evre II'ye Ek Olarak; Sondalama Cep Derinliği ≥6 mm Vertikal Kemik Kaybı ≥3 mm Sınıf II veya III Furkasyon Problemi Orta Seviyede Kret Defekti	Evre III'e Ek Olarak; Çiğneme Disfonksiyonu Dişlerde Sekonder Oklüzal Travmaya Bağlı Sınıf II veya Daha Fazla Mobilite Şiddetli Kret Defekti, Kapanış Düzensizliği Kalan Diş Sayısı <20
Yaygınlık ve Dağılım	Evrelemeye Tanımlayıcı Olarak Eklennmelidir	Her Evre İçin Lokalize (Etkilenen Alanlar %30'dan Az Olduğunda), Generalize ve Molar-Keser Tutulumu Olarak Belirtilir.			

Derece

Derecelendirme; hastalığın ilerleme hızına ilişkin geçmişe dayalı bir analiz, hastalığın ilerleme riskinin değerlendirilmesi (sigara kullanımı ve diyabet), tedavide beklenen kötü sonuçların değerlendirilmesi ve hastalığın veya tedavisinin hastanın genel sağlık durumunu olumsuz etkileme riskinin öngörülebilmesi de dahil olmak üzere hastalığın biyolojik özellikleri hakkında ek bilgi sağlar. Periodontitis, ilerleme riski ve tedaviye tahmini yanıtı göre 3 (Derece A, B, C) grupta derecelendirilir (Tablo 2.3.).^(1,3)

Tablo 2.3. Periodontitis Dereceleri^(1,3)

Periodontitis Derecesi			Derece A Yavaş İlerleme Oranı	Derece B Orta İlerleme Oranı	Derece C Hızlı İlerleme Oranı
Primer Kriter	İlerlemenin Direk Kanıtı	Radyografik Kemik Kaybı veya Klinik Ataşman Kaybı	5 yıl boyunca radyografik kemik kaybı yok	5 yıl boyunca radyografik kemik kaybı <2 mm	5 yıl boyunca radyografik kemik kaybı ≥2 mm
	İlerlemenin İndirek Kanıtı	% Kemik Kaybı/Yaş	<0,25	0,25-1	>1
		Vaka Fenotipi	Biyofilm miktarına göre periodontal dokularda düşük seviyeli yıkım	Biyofilm miktarı ile periodontal dokulardaki yıkım uyumlu	Biyofilm miktarına göre periodontal dokulardaki yıkım beklenenden fazla
Derece Modifiye Ediciler	Risk Faktörleri	Sigara	-	<10 sigara/gün	≥10 sigara/gün
		Diyabet	-	HbA1c<7	HbA1≥7
Periodontitisin Sistemik Etkisinin Riski	Enflamatuvar Yük	High Sensivity CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1-3 mg/L	3> mg/L
Biyomarkerlar	Klinik Ataşman Kaybı/Kemik Kaybı Markerları	Tükürük DOS Serum	?	?	?

2.3 Periodontal Hastalıklarda Mikrobiyolojik Özellikler

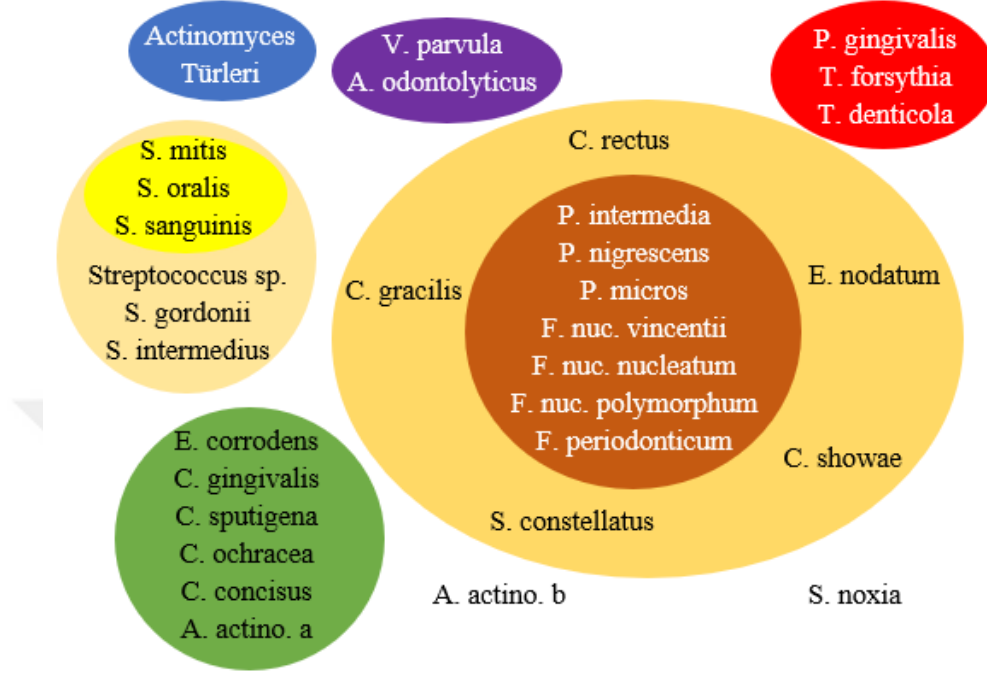
Periodontal hastalığın birincil etiyolojik etkeni, subgingival mikrobiyal biyofilm içerisinde bulunan gram negatif mikroorganizmalardır.⁽²⁾ Moleküler biyoloji teknolojisinde DNA tabanlı yöntemlerin kullanımı (polimeraz zincir reaksiyonu, PCR) gibi modern gelişmeler sonucunda subgingival plak örneklerinde 400'den fazla farklı bakteri türü izole edilmiş olmasına rağmen yalnızca spesifik patojen mikroorganizmalar periodontal hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar. Bu periodontal patojenlerin *Porphyomonas gingivalis* (Pg), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythia* (Tf), *Prevotella intermedia* (Pi),

Campylobacter rectus (Cr), *Eubacterium nodatum* (Er), *Treponema denticola* (Td), spiroketler, *Streptococcus intermedia* (S.i), *Prevotella nigrescens* (P.n), *Peptostreptococcus micros* (P.m), *Fusobacterium nucleatum* (F.n) ve *Eikenella corrodens* (E.c) olduğu gözlenmiştir.⁽³⁵⁾

Mikroorganizmalar, periodontal hastalıkların gelişiminde anahtar rol oynayan, yapısal ve fonksiyonel olarak organize olmuş biyofilm olarak adlandırılan, kompleks polimikrobiyal topluluk içerisinde yaşarlar. Biyofilm oluşumu dişeti iltihabını başlatır ancak periodontitisin başlaması ve ilerlemesi, enflamasyon başladıktan sonra mikrobiyom içerisinde bazı türlerin gelişimi ve virülans faktörlerinin ortaya çıkmasını tetikleyen disbiyotik ekolojik değişikliklere bağlıdır.⁽³⁾ Socransky ve arkadaşları, periodontal olarak sağlıklı ve kronik periodontitisli 185 kişiden aldıkları 13.000'den fazla subgingival plak örneğinde “checkerboard DNA-DNA” hibridizasyon tekniği kullanılarak yaptıkları mikrobiyolojik değerlendirme sonucunda periodontal hastalığa neden olduğu düşünülen beş özel tür bakteri birlikteliği tespit ederek bunları renk kodları ile sınıflandırmıştır.⁽³⁶⁾

Diş yüzeyi temizlendikten hemen sonra, tükürük tarafından oluşturulan bir film tabakasıyla kaplanmaya başlar. Glikoprotein, fibronektin, statherin, prolinden zengin proteinler gibi tükürük bileşenleri içeren bu film tabakası pelikül olarak adlandırılır. Pelikül mikroorganizmaların tutunmasını kolaylaştıran bir yapı görevi görür.⁽³⁷⁾ Pelikül yüzeyine başlangıç kolonizasyonu Actinomyces türleriyle birlikte erken kolonize olan sarı (*Streptococcus* Türleri), yeşil (*Capnocytophaga* Türleri) ve mor (*Veillonella Parvula* ve *Actinomyces Odontolyticu*) kompleks mikroorganizmaları içerir. Adezinleri yardımı ile pelikül yüzeyine sıkıca tutunmaya başlayan mikroorganizmalar sayıca artarak ve birbiri ile etkileşime girmeye başlayarak mikrokolonileri ve daha sonra da biyofilmi oluştururlar. Başlangıç biyofilm tabakasında gram pozitif aerob bir flora hâkim iken plak olgunlaştıkça heterojenitesi artar ve daha patojenik yapıya sahip geç kolonize olan turuncu (*P. intermedia*, *P. nigrescense*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *C. showae*) ve kırmızı (*P. gingivalis*, *T. forsythia* ve *T. denticola*) kompleks mikroorganizmaları biyofilme katılır. *F. Nucleatum*, erken kolonize olanlar ile pelikül yüzeyine tutunamayan ve periodontal hastalığın klinik bulgularıyla birebir ilişkili olan kırmızı kompleks mikroorganizmalar arasında bir köprü görevi görerek tutunmalarını sağlar

(koagregasyon). Yapılan çalışmalar sonucunda kırmızı kompleks mikroorganizmalarının bulunduğu bölgelerde aktif periodontal doku yıkımının olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1).^(36,38-40)



Şekil 2.1. Periodontal Hastalıklarla İlişkili Mikrobiyal Kompleksler⁽³⁶⁾

Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmalar, “otoagregasyon” (birbirine eş hücreler arasında hücre-hücre etkileşimi), “koagregasyon” (genetik olarak farklı bakterilerin özel moleküller aracılığıyla birbirleri ile etkileşimi) ve “quorum sensing” (otoindükleyici sinyal molekülleri) yolu ile birbirleriyle sürekli iş birliği halindedirler. Böylelikle periodontal hastalık ve diş çürüklerinde önemli bir etken olan biyofilm, mikroorganizmalara kolonize olmaları için uygun çevre, hayatta kalabilmeleri için besin ve mikroorganizmaların konak savunma mekanizmaları ve antimikrobiyal ajanlardan korunmaları için uygun bir ortam sağlar. Periodontal hastalıkların tedavisindeki temel amaç da mekanik olarak biyofilmi uzaklaştırarak periodontal cep içerisindeki ekolojik koşulları sağlık yönünde değiştirmektir.^(39,41,42)

Geçmişten günümüze periodontal hastalıklarda mikrobiyal dental plağın önemini öne süren çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. 19. yüzyılın sonlarında mikroorganizmaların virülans özellikleri dikkate alınmadan, sadece diş yüzeyinde biriken dental plak miktarını değerlendiren “non-spesifik plak hipotezi” gündeme gelmiştir.^(43,44)

20. yüzyılda ise mikroorganizmaların tanımlanmasını sağlayan tekniklerin gelişmesiyle birlikte, mevcut dental plağın miktarından çok içeriğinde bulunan mikroorganizmalara odaklanan “spesifik plak hipotezi” ortaya atılmıştır. Bu hipoteze göre periodontal hastalıkların oluşumu, dental plakta spesifik mikroorganizmaların bulunmasına ve bu mikroorganizmaların sayılarındaki artışa bağlanmıştır.^(36, 45) Bu hipoteze göre periodontal hastalığa sahip kişilerde spesifik mikroorganizmalar bulunurken sağlıklı bireylerde bu mikroorganizmalar bulunmamaktadır. Ancak periodontal olarak sağlıklı bireylerde de bu spesifik mikroorganizmalara rastlanması sonucunda 1994 yılında Philip D. Marsh tarafından “ekolojik plak hipotezi” öne sürülmüştür. Bu hipoteze göre, periodontal hastalığın oluşumu spesifik mikroorganizmalarla birlikte ekolojik etkenler (besin varlığı, redoks potansiyeli, ph vb.) ve konağa ait faktörlere bağlı olarak mikroflorada oluşan dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.⁽⁴⁶⁾

Daha sonra 2012 yılında ise konak ile mikroorganizmalar arasında bulunan dengenin, kırmızı kompleks mikroorganizmalarının lehine değişmesinin şiddetli periodontal hastalıklarla yakın ilişkili olduğu düşüncesinden yola çıkılarak “anahtar patojen plak hipotezi” ortaya atılmıştır.⁽⁴⁷⁾

Dental plak içeriği, patojenlerin virülans özellikleri ve immün cevaptaki rollerinin detaylı analiz edilmesi gibi gelişmelere bağlı olarak da son yıllarda periodontal hastalıklara karşı önleyici ve tedavi edici yaklaşımlarda, biyofilmin kontrolü amacıyla, antagonistlerle yapışmayı önlemek, erken kolonize olanların eliminasyonu, probiyotik kullanımı, pasif immünizasyon, sinyal moleküllerinin kullanımı ve özel hedefli antimikrobiyal peptit teknolojileri gibi yeni tedavi yaklaşımları da gündeme gelmiştir.⁽⁴⁸⁾

2.4 Periodontal Hastalıklarda İmmünolojik Mekanizmalar

Periodontal immünite, periodonto-patojenlerin kontrol edilmesini amaçlayan doğal (innate immünite) ve kazanılmış (adaptif immünite) immün yanıtlardan oluşur. Doğal ve kazanılmış immün yanıtlardaki düzensizlikler, periodontal hastalıkların etiolojisinde önemli rol oynamaktadır.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾

Genetik olarak belirlenmiş doğal immün yanıt konak savunmasının ilk hattını oluşturur ve enflamatuvar cevabın başlaması, ilerlemesi ve sınırlandırılmasında

görevlidir. Periodontal hastalıkta doğal immün yanıtın temel görevi; lipopolisakkaritler, bakteriyel DNA ve peptidoglikan gibi mikrobiyal ürünlerin tanımlanması ve enflamatuvar mediatörlerin üretimiyle birlikte enfeksiyonlara karşı ilk savunmanın oluşturulmasıdır.^(51,52) Doğal immün yanıt hızlıdır fakat seçicilik bakımından yetersizdir. Bu durum periodontal dokularda yıkıma sebep olabilir.^(53,54)

Kazanılmış immün yanıtın ise seçicilik yeteneği bulunur. Konağın kendi hücrelerini istenmeyen yabancı mikroorganizmalardan ayırt edebilir. Kazanılmış immün yanıtın temel fonksiyonu antijen sunumu sırasında bu antijenlerin tanınması, spesifik patojenlere karşı uygun cevabın oluşturulması ve tekrarlayan enfeksiyonlarda antijenlere karşı hafızanın oluşturulmasıdır.⁽⁵⁵⁾

Dokularda hasar meydana gelmesi sonucunda antijene özgü T ve B hücreleri çoğalır. T hücreleri istenmeyen yabancı antijeni tanıyıp bu antijeni hedef alırlar ve B hücrelerinin uyarılmasıyla istenmeyen yabancı mikroorganizmalara karşı özgül antikor üretimi gerçekleşir.⁽⁵⁵⁾

Konak tarafından oluşturulan bu cevapların, bireye özgü olması sebebiyle periodontitis sonucu diş destek dokularında meydana gelecek yıkım da, hastalar arasında farklılık gösterir.⁽⁵⁶⁾ Konak cevabı, genel sağlık durumu, genetik özellikler, kötü alışkanlıklar, beslenme ve diğer çeşitli çevresel faktörler gibi birçok etken tarafından düzenlenir.⁽⁵⁷⁾

2.5 Periodontal Hastalıklarda Konak Savunması

Oral kavite mikroorganizmaların üremesi ve çoğalması için uygun bir ortam yaratır. Ancak mikroorganizmaların ilgili bölgede kolonize olmaları, adezyon güçlerine, burada yeterli bir süre bulunmalarına ve konak savunma mekanizmalarından kaçabilme yeteneklerine bağlıdır. Periodontal patojen bakterilerin sınırlı sayıda kalmasında, dokuya invazyonlarında ve doku yıkımı oluşturmasını engellemede konak savunma sistemi temel rol oynar. Koruyucu konak savunma mekanizmalarında görev alan ilk etkenlerden biri tükürüktür.⁽¹⁹⁾

Oral kavitede her gün yaklaşık 0,5-1,5 litre tükürük salgılanır. Tükürük akışı, bakterilerin diş yüzeyine ve oral mukozal yüzeylere yapışmasını önleyerek mekanik bir temizlik sağlar. Ayrıca tükürük bileşenleri, periodontal patojenler tarafından

salınan ürünlerin tamponlanmasını ve bakteriyel aktivitenin sınırlandırılmasını sağlayan çok sayıda moleküler bileşen içerir.⁽¹⁹⁾ Bu bileşenler, oral yüzeylere yapışmayı inhibe ederek ve aglütinasyonu teşvik ederek plak biyofilm oluşumunu non-spesifik inhibe eden moleküller (örn. müsinler), spesifik virülans faktörlerini inhibe edenler (örn. LPS'yi nötralize eden histatinler) ve bakteriyel hücre büyümesini inhibe eden molekülleri (örn. laktoferrin) içerir.^(58,59) Tükürük içeriğinde ayrıca belirli antijenleri hedefleyen ve bakteriyel yapışmayı inhibe eden spesifik immüoglobülinler de (örn. IgA) bulunur.⁽⁴⁸⁾

Diğer bir savunma mekanizması ise epitelyal bariyerdir. Sağlıklı periodontal dokularda birleşim epiteli ve sulkuler epitel, mikroorganizmalara karşı bir bariyer görevi görerek bakteriyel invazyonu önler. Mikroorganizmaların ürünlerine ve bileşenlerine karşı etkili bir fiziksel bariyer oluşturur.⁽⁵³⁾ Epitelin hızlı turnover özelliği sayesinde yüzeye tutunan mikroorganizmaların uzaklaştırılması sağlanır.⁽⁶⁰⁾ Epitel hücreleri bu özelliklerinin yanı sıra, periodontal patojenlere karşı çeşitli proenflamatuvar sitokinleri (IL-1 β , TNF- α , IL-6), damarlardan periodontal doku içerisine nötrofil ve monositlerin migrasyonunu sağlayan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve IL-8 salgılayarak ve ayrıca mikroorganizmalara karşı etkili olan antimikrobiyal peptit ve proteinleri üreterek lokal konak cevabında önemli rol oynarlar.⁽⁶¹⁾

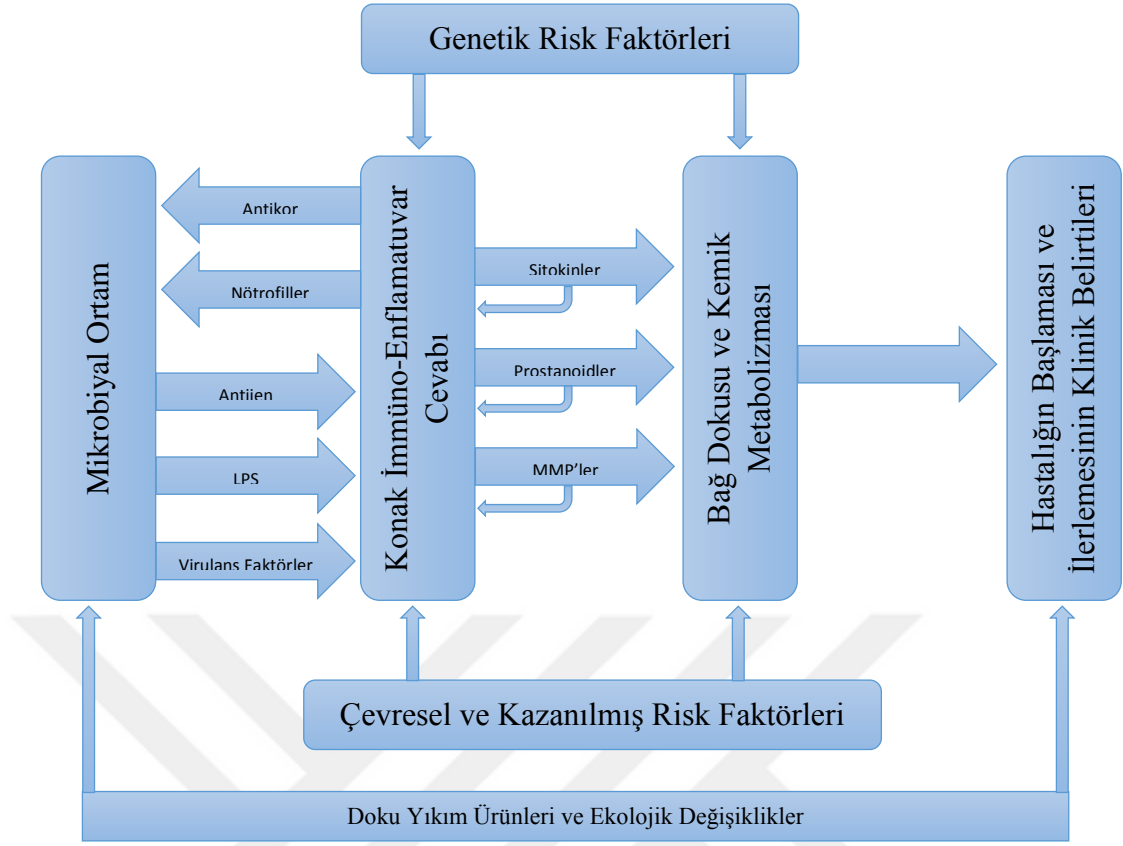
Gingival pleksusun postkapiller venüllerinden kaynaklanan diş eti oluğu sıvısı ise epitelin koruyucu mekanizmalarıyla birlikte gingival sulkusun yıkanmasını sağlar ve içeriğindeki konak savunmasına ait anahtar bileşenleri (örn. nötrofiller, antikorlar, kompleman bileşenleri) sayesinde periodontal patojenler ve ürünlerine karşı konak savunma mekanizmalarına katkıda bulunur. Vücudun normal florası da patojenik mikroorganizmaların büyümesini önleyerek enfeksiyonlara karşı etkili bir tampon görevi görür.⁽⁶²⁾

Subgingival biyofilm içerisinde bulunan bakteriler konak savunma mekanizmalarını aşabilirlerse, direk olarak endotoksinleri, ekzotoksinleri, toksik metabolik ürünleri ve lizozomal enzimleri ile periodontal dokularda yıkıma sebep olurken, indirek olarak ise konağın immün cevabında değişikliklere yol açarak periodontal dokularda yıkıma sebep olurlar.^(6,7)

Periodontitiste, bağ dokusu yıkımı sonucu, epitel hücreleri apikal yönde çoğalarak periodontal cebin oluşmasına sebep olur. Bu durum histopatolojik olarak birleşim epitelinin apikale migrasyonu, cep epiteli altındaki kollajen fibrillerde yıkım, birleşim epitelinde ve cep epitelinde çok sayıda polimorfonükleer lökosit ve yoğun enflamatuvar hücre infiltrasyonu şeklinde izlenir. Cep derinliğinin artışı florada anaerobik türlerin daha baskın hale gelmesine neden olur. Bunun sonucunda konak cevabı daha yıkıcı ve kronik bir hale dönüşür ve ilerleyen süreçte dişlerin kaybıyla sonuçlanabilir.^(63,64)

2.6 Periodontitisin Patogenezi

Periodontitis, oral florada sürekli bulunan periodonto-patojenler ile konak arasındaki dengenin bakteriler lehine bozulması sonucu ortaya çıkan fırsatçı bir enfeksiyondur. Klinik sağlık durumunda oral kavitede plak bakterileri ve bakteri ürünlerinin oluşturduğu biyofilm ve konak cevabı arasında simbiyotik ilişkilerin olduğu bir denge mevcuttur. Bu ekolojik dengenin bozulması, bakteri sayı veya çeşitliliğindeki değişimler (disbiyosis) veya konak immün sistemini zayıflatan durumlar sonucu meydana gelir.^(65,66) Periodontal hastalıkların patogenezi şekil 2.2.'de gösterilmiştir.⁽⁶⁷⁾



Şekil 2.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi⁽⁶⁷⁾

Periodontal hastalıklarda, periodontal sağlıktan periodontitise ilerleyen süreç, klinik ve histopatolojik olarak değerlendirilerek; başlangıç lezyonu, erken lezyon, yerleşmiş lezyon ve ilerlemiş lezyon olmak üzere 4 aşamada incelenmiştir.⁽⁶⁸⁾

Başlangıç lezyonu, mikrobiyal dental plak birikiminin 2-4. günlerinde izlenir ve mikrobiyal dental plağa karşı akut enflamatuvar bir cevaptır. Herhangi bir klinik belirti göstermez. Değişimler ancak histolojik seviyede izlenir. Bu değişimler vazodilatasyon, kollajen kaybı, periodontal dokulara nötrofil ve monositlerin göçü ve hücreler arası adezyon molekülünün birleşim epitelini uyarmasıdır. Başlangıç lezyonunda vasküler geçirgenlik ve DOS miktarı artar. Lezyon gingival sulkus bölgesinde sınırlıdır, bağ dokusunun ve birleşim epitelinin bir kısmı etkilenmiştir.⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾

Erken lezyon, mikrobiyal dental plak birikiminin 4-7. günlerinde izlenir ve başlangıç lezyonundaki değişimler daha da şiddetlenmiştir. Klinik olarak ödem, eritem ve sondlamada kanamanın bulunduğu gingivitis tablosu izlenir.⁽⁶²⁾ Erken lezyonda yüksek oranda kollajen kaybı vardır. Kayıp olan bu bölgelere sulkuler epitel ve birleşim epiteli proliferasyon olarak mikroorganizma ve ürünlerine karşı bir bariyer

oluşturmaya çalışır.⁽⁶⁹⁾ Lezyon bölgesi incelendiğinde baskın hücreler nötrofil ve T lenfositlerdir. Nötrofiller ekstra vasküler alanda, gingival sulkusta mikroorganizmaları fagosite etmektedir.⁽⁷²⁾

Yerleşmiş lezyon, mikrobiyal dental plak birikiminin 14-21. günlerinde izlenir ve enflamatuvar cevabın artmasıyla kronik gingivitis belirtileri şiddetli olarak izlenir.⁽⁷³⁾ Yerleşmiş lezyonda kollajen yıkımı daha da artmıştır ancak kemik yıkımı bulunmamaktadır.⁽⁷⁴⁾ Birleşim epiteli ve sulkuler epitel, bağ dokusunda kollajen yıkımı olan bölgelere doğru proliferer olur ve geçirgen bir epitel şekillenir.⁽⁷⁵⁾ Yerleşmiş lezyon histolojik olarak incelendiğinde baskın hücre tipi plazma hücreleridir.⁽⁶⁸⁾ Uygun oral hijyen uygulamalarıyla mikrobiyal dental plak uzaklaştırılırsa enflamatuvar değişiklikler tamamen düzelebilir.⁽⁷⁶⁾

İlerlemiş lezyon, gingivitisten periodontitise geçişi ifade eden geri dönüşümsüz aşamadır. Birleşim epitelinin apikale göçü başlar ve bu aşamada periodontal ligament ve alveolar kemik yıkımı gerçekleşir. İlerlemiş lezyon histolojik olarak incelendiğinde bağ dokusunda plazma hücreleri baskın olarak izlenirken, cep epiteli ve periodontal cep içerisinde nötrofiller baskın olarak izlenir.⁽⁷²⁾ Birleşim epitelinin apikale göçüyle birlikte periodontal cep oluşumu ve cebin derinleşmesi gerçekleşir. Periodontal cebin derinleşmesi sonucu mikroorganizmalar için uygun ortam sağlanır.⁽⁷⁷⁾

Periodontal sağlık dinamik bir durumdur. Bu yüzden anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar faktörlerin dengelenmesi gereklidir. Bu denge periodonto-patojenler tarafından bozulursa toll-like reseptörler(TLR) aktive olur.⁽⁷⁸⁾

Toll-like reseptörler makrofaj, nötrofil ve dendritik hücrelerden eksprese edilir ve lipopolisakkaritlere, peptidoglikanlara, flagelinlere, bakteriyel DNA ve nükleik asitlere bağlandıklarında pro-enflamatuvar sitokinler ve antimikrobiyal peptitler salgırlar. Toll-like reseptörlerin aşırı uyarımı ve pro-enflamatuvar sitokinlerde meydana gelen artış sonucu doku yıkımı meydana gelir. Epitelyal bariyerin periodonto-patojenler ve sitotoksik ürünlerince yıkıma uğraması sonucu fibroblast, osteoblast ve osteoklast hücrelerindeki toll-like reseptörler de aktive olurlar. Sonuçta periodontal dokuların yıkımına katkı sağlayan sitokin seviyelerinde artış gerçekleşir.⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾

Gingival epitel hücreler tarafından mikrobiyal invazyonu ilk belirleyen TLR 2,3,4,5,6 ve 9 eksprese edilir.⁽⁸⁰⁾ Periodontitiste TLR 2, 4, 7 ve 9'da up-regülasyon meydana gelir.⁽⁸²⁾ Periodontitisin patogeneğinde TLR 4 önemli bir role sahiptir. *Porphyromonas gingivalis* gibi gram negatif bakteriler ve varsayılan periodontopatojenlerin başlıca virülans faktörü lipopolisakkaritlerdir. Lipopolisakkaritler TLR 4'ü aktive ederler.⁽⁸¹⁾ Ayrıca gram negatif bakteriler; TLR 2'yi hücre membran proteinleri ile TLR 5'i flagellaları ile aktive edebilirler. Toll-like reseptörler doğal immün yanıtı doğrudan etkilerken kazanılmış immün yanıtı da dolaylı olarak etkileyebilir.⁽⁸³⁾

Doğal immün yanıt antijenik uyarıyı yok etme konusunda başarısız olduğu zaman kazanılmış immün yanıt devreye girer. Kazanılmış immün yanıtta, T hücreleri ve B hücreleri, antijen sunan hücrelerle etkileşerek aktive olur ve çoğalarak enflamasyon bölgesine göç ederler.⁽⁵⁰⁾ Kazanılmış immün yanıtın oluşmasında doğal immün yanıtta hücreler rol oynayabilir. Toll-like reseptörler patojenle etkileştiği zaman, sinyaller ile dendritik hücreler uyarılır. Dendritik hücrelerin uyarılması ile birlikte T hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması açısından önemli sitokin, kemokin ve uyarıcı moleküllerin üretimi sağlanmış olur.⁽⁸⁴⁾

T hücre topluluklarının en önemli özelliği hem doğal hem de kazanılmış immün yanıtta görev almalarıdır.⁽⁸⁵⁾ T hücrelerinin, immün yanıtların bileşenlerini aktive eden CD4+ T yardımcı hücreleri ve enfekte olan hücreleri öldürme yeteneğine sahip CD8+ sitotoksik T hücre türleri bulunur.⁽⁵⁰⁾ Antijen sunumu yapabilen (örn. dendritik hücreler) hücrelerin, antijen sunumu yapmaları sonrasında CD4+ T hücreler uyarılır ve çoğalır. Bu çoğalma farklı sitokinler ve farklı transkripsiyon etkenleri tarafından yönlendirilir. Bu farklılıklar sonucunda CD4+ T hücreleri, yardımcı T1 (Th1), yardımcı T2 (Th2), yardımcı T17 (Th17) ve düzenleyici T (Treg) gibi farklı alt gruplara farklılaşırlar.⁽⁸⁶⁾

Th1 hücreleri ağırlıklı olarak hücre immün cevapta görev almalarına rağmen enflamatuvar ve gecikmiş tipte hipersensitivite tepkimelerinde de görev alır.⁽⁸⁶⁾ Th1 hücreleri İnterferon-Gama (IFN- γ), Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α), Tümör Nekrozis Faktör-Beta (TNF- β), İnterlökin-2 (IL-2), İnterlökin-12 (IL-12) salgılayarak hücre içindeki patojenlerin öldürülmesinde ve T hücrelerinin sayı artışlarında görev almaktadır.⁽⁸⁵⁾ Th1 hücreleri proenflamatuvar özellikler gösterirken

Th2 hücreleri antienflamatuvar özellikler gösterir. Th2 hücreleri İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5) ve İnterlökin-13 (IL-13) salgılayarak B hücrelerini uyarır ve T hücrelerle ilişkili immün cevabı baskılar. Th17 hücreleri immün cevapta hücre dışı enfeksiyonlar ve mantar enfeksiyonlarına karşı immün sistemi uyaran yanıtlara aracılık eder. Th17 hücreleri enflamatuvar, otoimmün ve kemik yıkım bozukluklarında rol alır. Treg hücreleri ise immün cevapta baskılayıcı olarak rol alır. Sonuç olarak Th1, Th2, Th17, düzenleyici T (Treg) hücrelerinin, birbirine göre az veya fazla etkinlikleri periodontal hastalığın meydana gelmesini, şiddetini, ilerlemesini ve sonuçta doku yıkım miktarında belirleyici olur.⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾

2.7 Periodontitiste Sitokinler

Sitokinler; hücreler arası haberleşmeyi sağlayan, çözülmüş, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Sitokinlerin enflamasyon, hücrel aktivite (büyüme, farklılaşma, çoğalma), immün cevapta ve immün cevabın düzenlenmesinde önemli görevleri vardır.⁽⁸⁹⁾

Sitokinler, temel olarak doğal ve kazanılmış immün cevapta görev alan hücreler tarafından üretilebilirken, fibroblastlar, endotelial hücreler ve stromal hücreler gibi pek çok hücre tarafından da üretilebilir.⁽⁹⁰⁾ Sitokinler, genellikle geçici olarak üretilirler ve bu süreçte spesifik hücre yüzey reseptörleriyle etkileşime girerek immün cevabın düzenlenmesinde görev alırlar.⁽⁹¹⁾ Sitokinler birbirlerini etkileyerek antagonist veya sinerjik etki oluşturabilirler. Farklı sitokinlerin aynı hedef hücre üzerinde farklı etkileri olabilir. Ayrıca tek bir sitokin farklı hücreleri etkileyebilir. Tek bir sitokinin farklı hücreleri etkilemesi pleiotropizm olarak adlandırılır. Birçok sitokin pleiotropik özellik gösterir.^(92,93)

Enflamasyona teşvik eden sitokinlere proenflamatuvar sitokinler (örn. IL-1 β , TNF- α), bu sitokinleri baskılayan sitokinlere ise antienflamatuvar sitokinler (örn. IL-4, IL-10, TGF- β) adı verilir. Proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinlerin etkinlikleri arasındaki dengenin, periodontal hastalığın seyri üzerine etkisi büyüktür.^(6,94)

2.7.1 İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β esas olarak monositler, makrofajlar ve nötrofiller tarafından ve ayrıca fibroblastlar, keratinositler, epitelyal hücreler, B hücreleri ve osteositler gibi diğer

hücre tipleri tarafından üretilir⁽⁹⁵⁾ ve periodontitiste doku yıkımında önemli bir lokal mediatördür. Kollojenaz ve proteinaz üretimini uyarır.⁽⁹⁶⁾ Periodonto-patojenlerin yapısındaki lipopolisakkaritler, periodonsiyumda IL-1 β seviyelerinde artışa sebep olarak kemik yıkımına neden olur. Periodontal dokulardaki enflamasyon seviyesinin azalmasına, IL-1 β seviyesindeki azalma eşlik eder.⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾

IL-1 β enflamatuvar değişikliklere ve doku hasarına katkıda bulunan diğer mediatörlerin sentezini ve salgılanmasını uyarır. Örneğin, IL-1 β , PGE2, trombosit aktive edici faktör ve azot oksidin sentezini uyarır, böylece enflamasyon ile ilişkili vasküler değişikliklere sebep olarak enfeksiyon veya doku yaralanması bölgesine kan akışının artmasına neden olur. IL-1 β , endotelyal hücreler üzerinde hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ekspresyonunu artırır ve IL-8 salgılanmasını uyarır, böylece nötrofillerin etkilenen dokulara çıkışını uyarır ve kolaylaştırır.⁽⁴⁸⁾

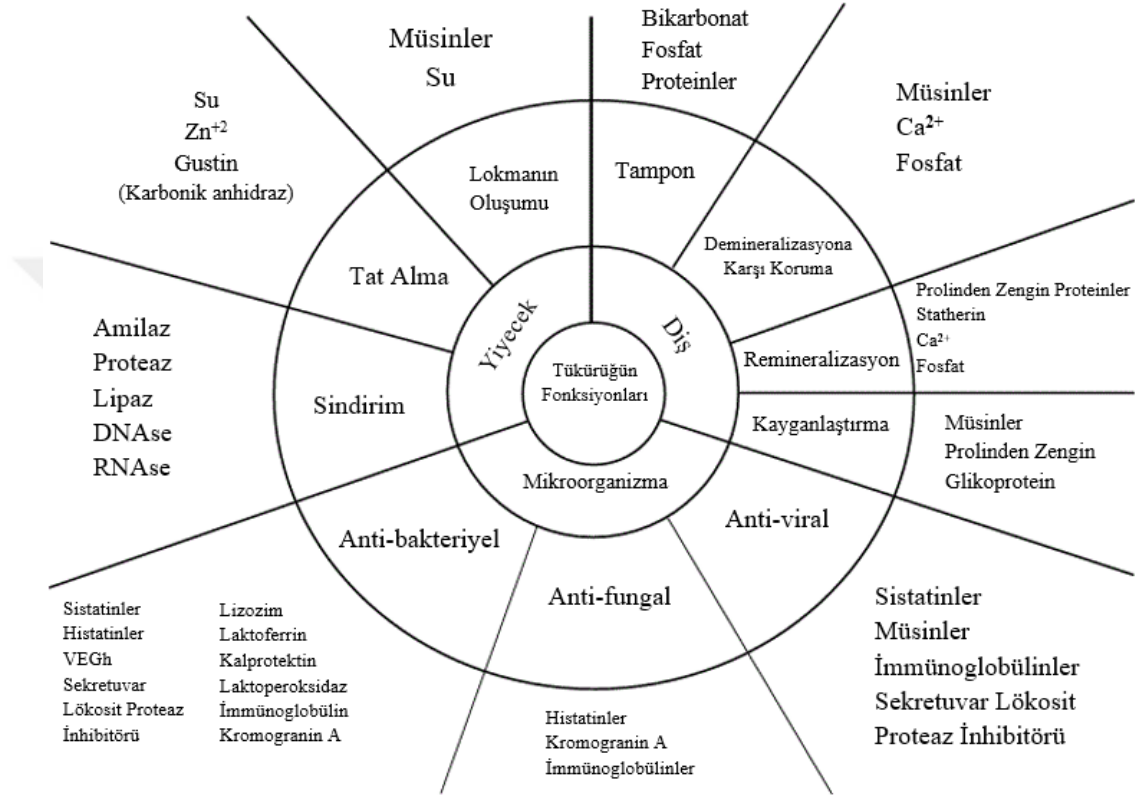
Deney hayvanlarındaki çalışmalar, IL-1 β 'nin enflamasyonu ve alveolar kemik yıkımını şiddetlendirdiğini göstermiştir.⁽⁹⁹⁾ Ayrıca IL-1 β kemik yıkımını uyarmak için diğer proenflamatuvar sitokinler ve Prostaglandin E₂ (PGE₂) ile sinerji oluşturur.⁽⁴⁸⁾

Gingivitis ve periodontitisten etkilenen bölgelerde IL-1 β 'nin dişeti oluğu sıvısındaki konsantrasyonları artar ve IL-1 β 'nin doku seviyeleri periodontal hastalık şiddeti ile ilişkilidir.^(97,100,101) Yapılan çalışmalar sonucu IL-1 β 'nin periodontal hastalık patogeneğinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir.⁽⁹⁶⁾

2.8 Tükürük

Tükürük, büyük tükürük bezlerinden olan parotis, submandibular, sublingual bezlerin salgıları ile ağız mukozasında farklı bölgesel dağılımlar gösteren küçük tükürük bezlerinin salgılarını, dişeti oluğu sıvısını, mikroorganizmaları, mikroorganizma bileşenlerini ve ürünlerini, besin kalıntılarını, kan bileşenlerini içeren heterojen bir sıvıdır.^(102,103) Tükürük içeriğinin yaklaşık %99'unu su, %1'ini ise organik, inorganik yapılar ve eser elementler oluşturur. Ayrıca tükürükte bakterilere ve periodontal hastalıklara karşı oluşan immünoglobülinler, histatinler, çeşitli enzimler, glikoproteinler ve sitokinler gibi konak cevabında görev alan bileşenler bulunur.⁽²⁰⁾

Tükürüğün ağız sağlığının korunması ve ekolojik dengenin sağlanması amacıyla pek çok fonksiyonu bulunmaktadır.⁽¹⁰⁴⁾ Tükürük miktarının azalması sonucu hastalarda, ağız kuruluğu, yutma güçlüğü, fırsatçı enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık izlenir. Fırsatçı enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık, normal koşullarda tükürüğün, ağız sağlığının korunmasındaki önemli rolünü gösterir. Tükürüğün fonksiyonları şekil 2.3.'de gösterilmiştir.^(105,106)



Şekil 2.3. Tükürüğün Fonksiyonları⁽¹⁰⁵⁾

Yapılan çalışmalarda tıpkı serumda olduğu gibi tükürük içeriğinde de oral ve sistemik hastalıkların teşhisinde yararlı olabilecek proteinler, enzimler, hormonlar ve enflamatuvar biyobelirteçlerin bulunduğu gösterilmiştir.⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾ Bu sebeple tükürük, hastalıkların erken teşhisinde önemli bir biyolojik sıvıdır.⁽²¹⁾

Periodontitiste IL-1 β , tükürük biyobelirteç değerlendirmelerinde en fazla kullanılan ve en detaylı çalışılan sitokinler arasındadır.⁽¹¹⁰⁾ Tükürük IL-1 β seviyelerinin incelendiği çalışmalarda, sağlıklı hastalarla karşılaştırıldığında, periodontal hastalığa sahip hastaların IL-1 β seviyelerinin anlamlı bir artış gösterdiği rapor edilmiştir.^(111,112) Ayrıca tükürük proteom analizlerinde bakterisidal geçirgenlik artırıcı protein (BPI) ve BPI benzeri proteinler gösterilmiştir.⁽¹¹³⁾

Tükürük örneklerinin kolay toplanabilmesi, hacim olarak yeterli miktarlarda elde edilebilmesi, toplanması için özel beceri ve karmaşık malzemeler gerektirmemesi, spesifik hastalıklar için pek çok biyobelirteç içermesi gibi avantajları vardır. Ayrıca invaziv bir yöntem olmadığı için hastalarda endişe ve rahatsızlık oluşturmaz.⁽²¹⁾

Periodontal hastalığın belirlenmesinde plak indeksi, gingival indeks, periodontal cep derinliğinin ölçülmesi, klinik ataşman seviyesi, sondlamada kanama gibi klinik ölçümlerle birlikte radyografik analizler kullanılmaktadır. Bu parametreler kolay uygulanabilen, invaziv olmayan ve güvenilir parametrelerdir.⁽²²⁾ Ancak bu tanı yöntemleri, uygulandığı zaman dilimi hakkında bilgi verir. Bu nedenle periodontal hastalığın başlangıcı, aktivitesi ve risk taşıyan bireylerin belirlenmesi amacıyla tükürük biyobelirteçleri incelenebilir. Son yıllarda tükürük örnekleri, periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.^(23,24)

2.9 Antimikrobiyal Protein ve Peptitler

Ağız içerisinde temelde epitel hücreleri, nötrofiller ve tükürük bezleri tarafından salgılanan antimikrobiyal protein ve peptitler (AMP'ler), doğuştan gelen bağışıklığın önemli yapı taşlarından biridir. Antibakteriyel, antifungal ve sinyal iletmeye özelliklerine sahip olan bu moleküller konak ve kommensal mikroorganizmalar arasındaki homeostazın korunması ve devamlılığının sağlanmasına katkıda bulunurlar.⁽¹⁰⁾ Kromozomlar üzerinde lokalize olarak bulunan genler ile kodlanmış savunma molekülleri olan AMP'ler, doğal immünitadaki önemli rollerinin yanı sıra yeni tedavi edici ilaçların geliştirilmesine temel sağlayabilecek olan doğal antibiyotiklerdir.⁽¹²⁾

AMP'lerin temel fonksiyonu; bakterileri, mantarları ve bazı virüsleri (HIV, herpes simpleks ve influenza gibi bazı zarflı virüsler) içerisine alan geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarıdır.⁽¹⁰⁾ AMP'ler bakteri hücre membranını hedef alarak lipit, iki katmanlı yapının parçalanmasına ve hücre içi biyosentezlerin inhibe edilmesine neden olurlar.^(114,115) Bu peptitlerin pozitif yüklü ve hidrofobik olması, herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın direkt olarak negatif yüklü olan bakteri yüzeyine bağlanmasını sağlar. Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan LPS'ler ve gram pozitif bakterilerde bulunan lipoteikoik asit tabakası AMP'lerin bağlanabilmesi için gerekli olan negatif yükü sağlar. Dış membrandan hızlıca geçen

AMP'ler negatif yüklü, fosfolipit yapıdaki sitoplazma membranına ulaşarak çok düşük konsantrasyonlarda dahi antimikrobiyal etkilerini gösterirler.^(116,117)

AMP'ler antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra endotoksin nötralizasyonu (antiendotoksik) kemotaksis, mast hücrelerinden histamin salınımı, homeostaz, adezyon moleküllerinin salınımı, apoptoz ve yara iyileşmesi gibi immünomodülatör fonksiyonlara da sahiptirler.⁽⁴⁸⁾

Tükürük ve DOS içeriği yapısal (boyut ve aminoasit dizilimlerine göre) ve fonksiyonel olarak birçok farklı gruba ayrılan AMP'yi içermektedir. AMP'ler fonksiyonel olarak katyonik peptitler, metal iyon şelatörleri, bakteriyel aglütinasyon ve adezyon, proteaz inhibitörleri, peroksidazlar ve bakteri hücre duvarına karşı etkili AMP'ler olmak üzere altı alt gruba ayrılır.⁽¹⁰⁾ AMP'lerin fonksiyonlarındaki bu çeşitlilik, ağız içine giren çok sayıda farklı mikroorganizmaya karşı doğal immün sistemin etkili bir savunma yapmasını sağlamaktadır.⁽¹¹⁸⁾

2.9.1 Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein (BPI)

1975'te Weiss ve arkadaşları tarafından tanımlanan bakterisidal geçirgenlik arttırıcı protein (BPI);⁽¹¹⁹⁾ güçlü antimikrobiyal ve endotoksin nötralize edici fonksiyonları sayesinde gram negatif bakteri (GNB) ve endotoksinlerine karşı konak savunmasında önemli rol oynayan pluripotent bir proteindir. BPI başta nötrofiller olmak üzere ayrıca daha az oranda monositler, eozinofiller, fibroblastlar ve epitelyal hücrelerden salgılanmaktadır.^(14,120-122)

BPI, çeşitli lipit substratlarına bağlama yeteneğinde olan, fosfolipit transfer proteinleri ailesinin bir üyesidir. Genler ile kodlanan bu aile içerisindeki diğer üyeler, lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP) ve PLUNC (damak, akciğer ve nazal epitel klonu) gibi doğal immün yanıt açısından önemli olan proteinleri ve kolesterol ester transfer proteini (CETP) ve fosfolipit transfer proteini (PLTP) gibi kanda lipit taşıyıcılar olarak görev yapan proteinleri içerir.⁽¹²³⁻¹²⁶⁾

Bir akut faz plazma proteini olan LBP'nin görevi, LPS monomerlerini, temelde monositler ve makrofajların yüzeyinde bulunan CD14, MD2 ve TLR4 içeren bir reseptör kompleksine ileterek, konak hücrelerinde LPS kaynaklı proenflamatuvar cevabı arttırmaktır. Birbirlerine homolog olarak benzer olan LBP ve BPI'nin her ikisi

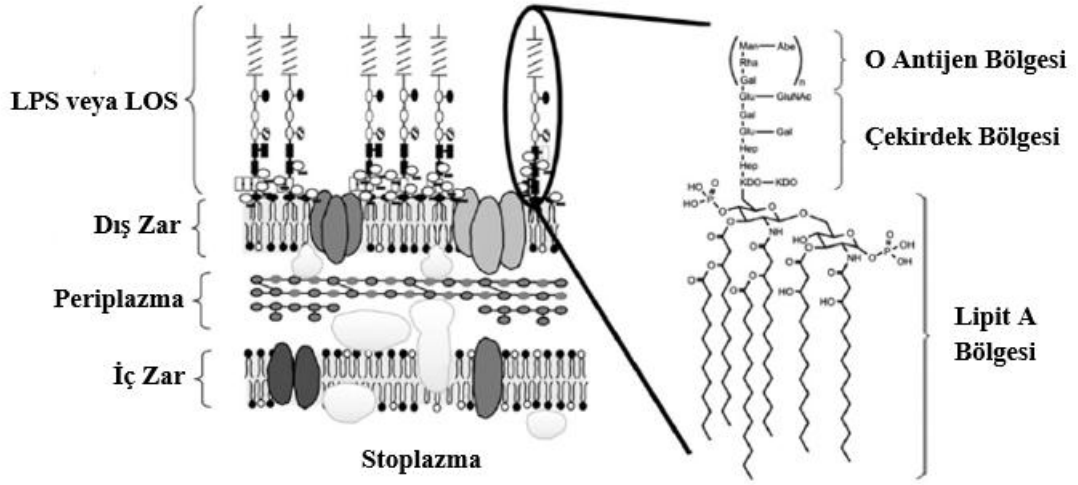
de LPS'lere bağlanır, ancak bu iki molekül birbirlerine zıt biyolojik etkilere sahiptirler. BPI, hücrel cevabı azaltarak yani antienflamatuvar etki gösterirken, LBP enflamatuvar yanıtı neden olur. Bu durum normal fizyolojik koşullarda, bakteriler ve konak arasındaki kritik dengenin (homeostaz) korunmasında önemli rol oynayarak sadece patojenlerin nötralize edilmesinde değil, aynı zamanda zararsız kommensal mikroorganizmalara verilen yanıtların modüle edilmesi açısından da bir denge sağlar.⁽¹⁵⁾

BPI esas olarak nötrofillerin miyeloid öncüllerinde, kemik iliğinde eksprese edilir ve primer (azurofilik) granüllerinde depolanır.⁽¹²⁷⁾ BPI'nin, GNB'lerin tüm LPS'leri için ortak olan lipit A bölgesine yüksek afinitesi dikkat çekicidir. Bu etkileşim, anti-enfektif aktivitelerini (i) doğrudan antimikrobiyal aktivite, (ii) LPS'yi bağlayarak, böylece endotoksik aktiviteyi nötralize ederek ve (iii) opsonik aktivite olarak 3 şekilde gerçekleştirir.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

Oral mukoza epitel hücreleri, sağlık ve hastalık arasındaki dengeyi sağlamaktan sorumlu birçok mekanizma geliştirerek mikroplar ve mikrobiyal ürünlerle birlikte var olmaya adapte olmuştur. Yapılan çalışmalar, epitel hücrelerinin kommensal mikroorganizmalarla etkileşimlerden yararlandığını göstermektedir.⁽¹³⁾ Konfokal mikroskopu ve immünopresipitasyon teknikleri ile yapılan çalışmalarda epitel hücre yüzeyinde lokalize BPI varlığı gösterilmiştir. Epitel hücrelerinden eksprese edilen BPI'nin, GNB türlerine karşı olan güçlü ve seçici antibakteriyel ve endotoksin nötralize edici aktiviteleri ile doğal homeostazın korunmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.⁽¹²⁸⁾

GNB kaynaklı enfeksiyondaki kritik başlangıç olayı, mikroorganizmalar tarafından epitelyal bariyerlerin aşılması ve altındaki dokuların mikroorganizma ve ürünlerine maruz kalmasıdır.⁽¹²⁹⁾ Gram negatif bakterilerin glikoprotein yapıdaki endotoksinleri (örn. LPS veya lipooligosakkaritler (LOS)) enflamasyonun ana belirleyicisidir. Bakterinin dış hücre duvarının dış zarının temel yapı taşı olan LPS'ler yüksek oranda korunmuş bir lipit A bölgesinden, bir çekirdek polisakkarit bölgesinden ve O antijen bölgesinden oluşur (Şekil 2.4.).⁽¹⁴⁾ Endotoksinler bakteri hücresinden dışarı salınmayan, hücre duvarının yıkımı ve bakterinin ölümü sonucu açığa çıkan ürünlerdir. Endotoksinler; hücrel biyosentezi ve diğer biyoaktif metabolitler gibi

proenflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak, kompleman sistemi, pıhtılaşma ve fibrinolitik yolları hızla aktive ederek konak savunma sistemini etkilerler. (15,129,130)



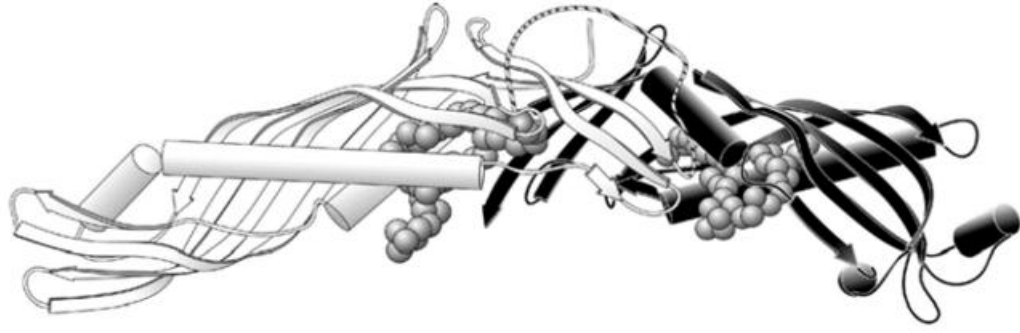
Şekil 2.4. Gram Negatif Bakterilerin LPS veya LOS Yapısı⁽¹⁴⁾

GNB kaynaklı akut enflamasyonun etkileri arasında, antimikrobiyal plazma faktörlerinin lokal olarak dokuya nüfuz etmesi, nötrofillerin daha sonra mononükleer kan hücrelerinin ve lenfositlerin enfeksiyon bölgesine göçünü uyaran biyoaktif maddelerin (örn. sitokinler ve kemokinler) salınması bulunur. Vasküler permeabilite artışına bağlı olarak damarlardan diapedezis ve kemotaksis ile enflamasyon bölgesine ulaşan nötrofiller enfeksiyöz ajanlara karşı doğal savunmanın ilk hattını oluşturur. Nötrofiller fagositoz, degranülasyon ve hücre dışı tuzaklar (NET oluşumu) olmak üzere üç ana antimikrobiyal fonksiyona sahiptir. Nötrofil yüzeyindeki çok sayıda reseptöre (toll-benzeri reseptörler, antikorların Fc bölgeleri için reseptörler) bağlanan patojen hücre içerisine alınarak (fagositozis) oksidatif öldürme mekanizması (reaktif oksijen ürünlerinin üretimi yoluyla) ve non-oksidatif mekanizma (nötrofilik granüller içerisindeki antimikrobiyal peptit ve enzimlerin boşaltılması) ile yok edilir. Ayrıca uyarılan nötrofiller, granül içeriklerinin bir kısmını çevre enflamatuvar sıvıya bırakarak nötrofillerin fagositik kapasitesini aşan, fagositoza direnen ve fagositozdan kaçan bakterilerin kontrol altına alınmasını ve öldürülmesini sağlar. (49,51,131-136)

Nötrofillerin primer (azurofilik) granüllerinden GNB'lere yanıt olarak salınan BPI, hücre içi ve hücre dışı bakteri öldürme, endotoksin nötralizasyonu ve temizlenmesi, GNB dış zar antijenlerinin dendritik hücrelere sunulmasında rol oynar.⁽¹³⁷⁾ LPS'deki

lipit A kısmına bağlanan BPI, molekülün zamana bağlı bakteriyel iç membranı etkilemesi, membran bütünlüğünün kaybına, elektrokimyasal sistemlerin dağılmasına ve bakterinin ölümüne yol açar (antimikrobiyal aktivite).⁽¹³⁸⁾ BPI ayrıca LPS'deki lipit A kısmına bağlanarak LPS'nin etkilerini nötralize ederek, LPS aracılı nötrofil uyarımını ve LPS ile indüklenen TNF- α üretimini de azaltır.^(139,140) Rekombinant BPI proteinleri (rBPI) ile ilgili invitro çalışmalarda, monositlerin BPI ile profilaktik tedavisinin, LPS'nin monositlere LBP aracılı iletimini inhibe ettiğini göstermiştir.⁽¹⁴¹⁾ BPI'nin diğer etkili bir rolü ise opsonizasyon yapmasıdır.⁽¹⁴²⁾ BPI, GNB'lerin dış zarından türetilen mikroveziküllerin (bleb) dendritik hücelere (DC) iletimini artırır. Bu durum DC tarafından LPS alımı ve dış zar kaynaklı antijen sunumunu kolaylaştırarak kazanılmış immün cevabın artırılmasına da yardımcı olur.⁽¹⁴³⁾ Ayrıca BPI'nin DC'lerin olgunlaşmasını da bloke ettiği gösterilmiştir.⁽¹⁴⁴⁾ BPI'nin bu etkileri, enflamatuvar sıvılarda bulunan diğer nötrofil granül proteinleri (AMP'ler), fosfolipaz A2 ve kompleman sistemi ile sinerjistik olarak artırılabilir.^(145,146) Anti-enfektif özelliklerine ek olarak BPI'nin endotelial hücelerin büyümesini engellediği, hücre dışı matristen ayrılmasına yol açtığı ve apoptozu indükleyerek anti-anjiyojenik etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir.^(147,148)

BPI, moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olan tek zincirli katyonik bir proteindir.⁽¹⁸⁾ BPI'nin kristalografisinde, yapı ve fonksiyonlarında belirgin farklar bulunan benzer uzunlukta iki bölge içeren, 3 boyutlu organizasyonlarında ise neredeyse üst üste binen benzersiz bir bumerang şekli izlenir (Şekil 2.5.).^(14,149) BPI, antibakteriyel ve LPS (endotoksin) nötralize edici aktivitelerini içeren katyonik, lizin açısından zengin bir N terminalini (amino terminal kısmı) ve opsonik aktivitesine katkıda bulunan bir C terminalini (karboksi terminal kısmı) içerir.^(142,149,150) BPI'nin opsonik aktivitesi, N terminalinin GNB'ye bağlanması ve C terminalinin nötrofillere ve monositlere bağlanmasıyla gerçekleşir.⁽¹⁴²⁾ Ayrıca BPI'nin iç bükey tarafında muhtemelen molekülün suda çözünür katlanmış yapısını stabilize etmek amacıyla ve konak kaynaklı fosfolipitlerin bağlanabildiği apolar cepler de gösterilmiştir.^(149,151)



N Terminali (Amino Terminal Kısım)

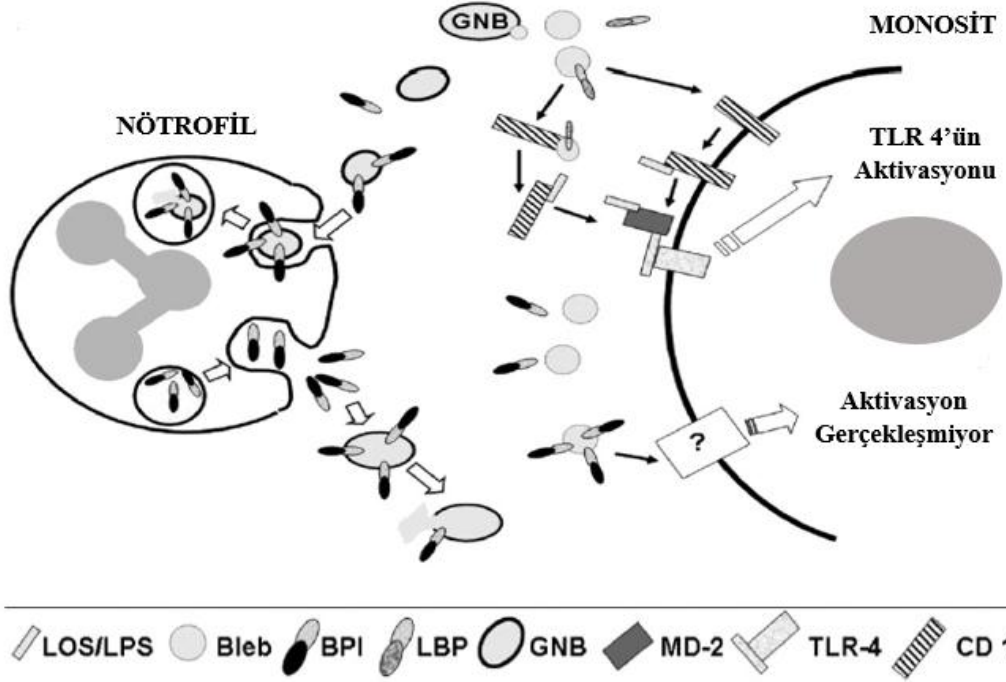
Antimikrobiyal Etki
Endotoksin Nötralize Edici Aktivite
Anti-anjiyojenik Etki

C Terminali (Karboksi Terminal Kısım)

Opsonik Aktivite

Şekil 2.5. BPI'nin Yapı ve Fonksiyonları⁽¹⁴⁾

Akut enflamasyon uyarılmadan önce, doku içinde nötrofil ve dolayısıyla nötrofil kaynaklı BPI bulunmamaktadır.⁽¹⁴⁾ GNB istilası sonucu, dinlenme koşullarında bulunan hücreler arası sıvıdaki LBP, LPS monomerlerini CD14, MD2 ve TLR 4 içeren bir reseptör kompleksine ileterek, LPS'ye karşı doğal bağışıklıkta rol oynayan hücrel yanıtı artırır (Şekil 2.6.).^(152,153) Hücrel aktivasyona bağlı olarak TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinler ve nitrik oksit (NO) salınımı gerçekleşir. Endotoksin ve TLR 4'ün MD2 ile eş zamanlı bağlanması daha sonra güçlü proenflamatuvar yanıtı tetikler.^(14,154,155) LBP, CD14'e gönderilmek üzere LPS monomerlerini toplarken, BPI LPS agregatlarını stabilize eder.⁽¹⁵⁶⁾ LBP ve BPI'nin LPS'ye bağlanan amino terminal kısımları benzerdir ancak BPI'nin LPS'lere afinitesi LPS'ye oranla 50-70 kat daha fazladır. BPI'nin, LPS'nin lipit A bölgesine yüksek bağlanma afinitesi LBP ve CD14 dahil olmak üzere diğer LPS bağlayıcı moleküller ile etkileşimini önler.⁽¹⁵⁷⁾ Bu fonksiyonel farklılık ise LPS aracılı bir enflamatuvar yanıtta BPI işlevinde antienflamatuvar etki gösterirken, LBP enflamatuvar bir yanıtı neden olur.⁽¹⁵⁾ BPI'nin GNB ve LPS'lerine karşı seçici ve güçlü aktiviteleri plazma, serum ve tam kan da dahil olmak üzere biyolojik sıvılarda kendini göstermektedir.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾



Şekil 2.6. BPI ve LBP'nin Etki Mekanizması⁽¹⁴⁾

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, periodontal açıdan sağlıklı ve periodontitisli hastalarda tükürük IL-1 β ve BPI seviyelerinin değerlendirilmesi, bu biyokimyasal parametreler ile klinik periodontal indeksler arasındaki ilişkinin incelenmesi ve böylece BPI'nin periodontal hastalıklardaki rolünün belirlenmesidir.

Çalışmamızın hipotezi, periodontal açıdan sağlıklı bireyler ile periodontal hastalığa sahip bireyler arasında tükürük BPI düzeyleri arasında bir fark olmayacağıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, 31.12.18 tarih ve 70904504/601 sayılı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Ek-1) ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TDH-2019-4869).

3.1 Hasta Seçimi

Çalışmamıza 2020 Ocak – 2020 Temmuz tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvuran, periodontitis tanısı konulmuş 50 birey (Periodontitis Grup) ve periodontal açıdan sağlıklı rutin kontrole gelen 50 birey (Sağlıklı Grup) dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden kişilere, çalışmanın amacı ve yapılacak işlemler anlatıldıktan sonra, gönüllü olarak çalışmaya katıldıklarına dair asgari bilgilendirilmiş olur formu imzalatılmıştır (Ek-2).

3.2 Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

Bireylerin çalışmaya dahil edilmelerinde aşağıda belirtilen kriterler göz önünde tutulmuştur.

- Bireylerin 18 yaşını doldurmuş olması
- Periodontal durumu etkileyen herhangi bir sistemik hastalığa sahip olmaması
- Periodontal dokuları etkileyen ilaç kullanıyor olmaması
- Kadın gönüllülerin hamilelik veya emzirme döneminde olmaması
- Bireylerin sigara ve alkol kullanmaması
- Bireylerin 3. molar dişleri dışında ≥ 18 dişe sahip olması
- Bireylerin son 6 aylık dönem içerisinde herhangi bir antibiyotik, antienflamatuvar veya kortikosteroid tedavisi görmemiş olması
- Bireylerin son 6 ay içerisinde cerrahi ve/veya cerrahisiz periodontal tedavi görmemiş olması

Çalışmaya katılan bireylerin periodontal sağlığı ve klinik periodontal tanısında Amerikan Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federeasyonu tarafından 2017 yılında yapılan yeni periodontal hastalık sınıflaması ve kriterleri kullanılmıştır.

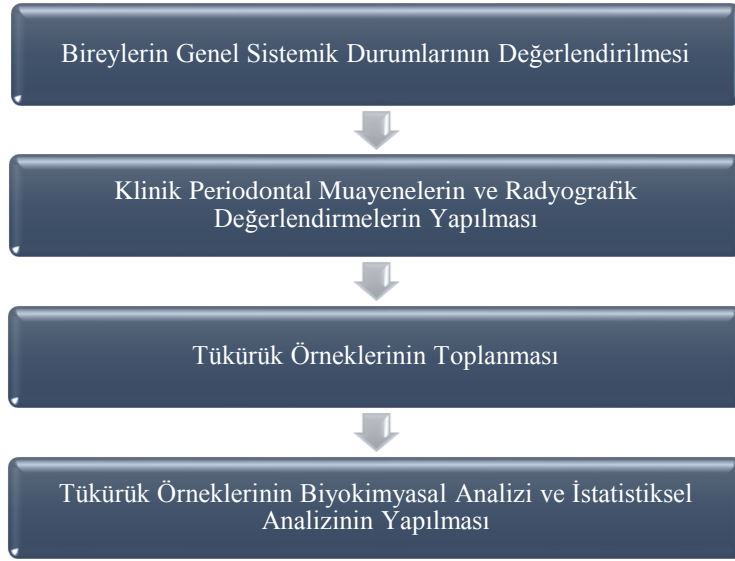
Çalışmamızın periodontitis grubu evre 2 (3-4mm ataşman kaybı ve sondlama derinliği ≤ 5 mm, periodontitis sebebiyle diş kaybı bulunmayan hastalar) ve evre 3 (Diş kaybı potansiyeli bulunan ≥ 5 mm ataşman kaybı ve sondlama derinliği ≥ 6 mm, periodontitis sebebiyle diş kaybı ≤ 4 olan hastalar) ile uyumlu hastalar tarafından oluşturuldu.

Çalışmaya dahil edilen periodontal açıdan sağlıklı grupta ise, tüm ağız diş yüzeylerinde ölçülen sondlanabilir cep derinliğinin ≤ 3 mm ve sondlamada kanamanın $\leq 10\%$ 'un olması tanı kriteri olarak kabul edildi.

3.3 Araştırma Planı

Araştırmamıza ait işleyiş planı şekil 3.1.'de sunulmuştur. Buna göre;

1. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerin genel sistemik durumu detaylı olarak sorgulandı.
2. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerde detaylı klinik periodontal muayene ve radyografik değerlendirmeleri yapıldı (Ek-3 Hasta anamnez ve periodontal indeks formu).
3. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden biyokimyasal analizlerin yapılması amacıyla tükürük örnekleri alındı ve uygun koşullarda muhafaza edildi.
4. Tükürük örneklerinin biyokimyasal analizi yapıldı.
5. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi ve yorumlandı.



Şekil 3.1. Çalışma Şeması

Çalışmaya ait ölçümlerin kalibrasyonu için tüm klinik periodontal ölçümler tek bir araştırmacı tarafından (MBD) yapılmıştır.

3.4 Klinik Periodontal Değerlendirmeler

Uygun kriterleri sağlayan gönüllülerin, periodontal durumlarının belirlenmesi amacıyla ağızda bulunan tüm dişlerden Plak İndeksi (Pİ), Gingival İndeks (Gİ), Sondlanabilir Cep Derinliği (SCD), Klinik Ataşman Seviyesi (KAS), Sondlamada Kanama (SK) değerleri kaydedildi. Bu değerler milimetrik olarak kalibre edilmiş Williams periodontal sondu (Hu Friedy, Chicago, IL, USA) ile her bir dişin 6 bölgesinden (meziobukkal, midbukkal, distobukkal, meziopalatinal, midpalatinal, distopalatinal) olmak üzere ölçümler yapıldı. Ayrıca hastaların radyografik değerlendirilmeleri yapıldı.

3.4.1 Plak İndeksi (Pİ)

Ağız içindeki mevcut plak birikim derecesinin değerlendirilmesi ve hastanın oral hijyeninin belirlenmesi amacıyla Silness-Löe Pİ skorları⁽¹⁵⁸⁾ kullanıldı. Mevcut dişler pamuk rulolar ile izole edilip, hava ile kurutulduktan sonra dişlerin bukkal, lingual, mezial ve distal olmak üzere 4 bölgesinden skorlar elde edildi. Skorların aritmetik ortalaması alınarak 0-3 arasında indeks değerleri verildi.

Pİ değerlendirme kriterleri:

0: Diş yüzeyi ve dişeti bölgesinde hiç bakteri plağı yok.

1: Serbest dişeti kenarında ve dişin komşu bölgesinde ince bir plak birikimi mevcuttur. Bu oluşum ancak bir çözelti solüsyonu ya da sond kullanılarak belirlenebilir.

2: Dişeti kenarında, cebinde ve/veya komşu diş yüzeyinde gözle görülebilen orta derecede yumuşak eklenti birikimi mevcuttur.

3: Dişeti cebi içinde ve/veya diş ve dişeti kenarı üzerinde yoğun miktarda yumuşak eklenti birikimi mevcuttur.

3.4.2 Gingival İndeks (Gİ)

Dişetindeki mevcut enflamasyon düzeyinin klinik olarak teşhisi için Loe-Silness Gİ skorları⁽¹⁵⁹⁾ kullanıldı. Williams periodontal sondu dişlerin uzun aksına paralel olarak dişeti kenarında gezdirilerek 0-3 arasında indeks değerleri ile değerlendirme yapıldı.

Gİ değerlendirme kriterleri:

0: Sağlıklı dişeti, enflamasyon izlenmemektedir.

1: Dişetlerinde hafif düzeyde enflamasyon, renk değişikliği ve hafif ödem bulunmaktadır. Sondlamada kanama izlenmemektedir.

2: Dişetlerinde orta düzeyde enflamasyon mevcuttur, dişeti parlak, kızarık ve ödemlidir. Sondlama sonrası kanama izlenir.

3: Dişetlerinde ileri derecede enflamasyon mevcuttur, belirgin kızarıklık ve ödem izlenir. Spontan kanamaya eğilim ve ülserasyonlar görülür.

3.4.3 Sondlanabilir Cep Derinliği (SCD)

Sondlanabilir cep derinliği, mevcut dişlerin 6 bölgesinden (meziobukkal, midbukkal, distobukkal, meziopalatinal, midpalatinal, distopalatinal), Williams sondu ile dişlerin uzun aksına paralel olacak şekilde, serbest dişeti kenarı ile cep tabanı arasındaki mesafe milimetre cinsinden ölçüldü. Sondun uygulanması esnasında yaklaşık 20-25 g (0.20–0.25 N) kuvvet uygulanmasına dikkat edildi. Yapılan ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak hastalara ait ölçüm değerleri belirlendi.

3.4.4 Sondlamada Kanama (SK)

Sondlanabilir cep derinliği ölçümünden 10-15 saniye sonrasında, her bir dişin 6 bölgesi kanama var ise pozitif (+), kanama yok ise negatif (-) şeklinde değerlendirildi. Her bir birey için pozitif değerlerin yüzdesi hesaplanarak sondlamada kanama skoru belirlendi.⁽¹⁶⁰⁾

3.4.5 Klinik Ataşman Seviyesi (KAS)

Mevcut dişlerin 6 bölgesinden (meziobukkal, midbukkal, distobukkal, meziopalatinal, midpalatinal, distopalatinal) Williams sondu ile dişlerin uzun aksına paralel olacak şekilde, mine-sement sınırı ile cep tabanı arasındaki mesafe milimetre cinsinden ölçüldü.

3.5 Biyokimyasal Analizler

Çalışmamızda hastaların tükürük örneklerinde; IL-1 β ve BPI seviyeleri değerlendirildi.

3.5.1 Tükürük Örneklerinin Toplanması

Araştırmamıza katılan bireylerin tükürük örnekleri uyarılmamış tükürük tekniği ile sabah saatlerinde alınmıştır. Uyarılmamış tükürük örneklerinin elde edilmesi için, hastaların örnek toplanmasından en az 1 saat önce yemek yememiş, sıvı tüketmemiş, dişlerini fırçalamamış, ağız gargarası kullanmamış ve sakız çiğnememiş olmaları istendi. Daha sonra ağız tabanında biriken tükürük, en az 5 dakika boyunca, steril bir kaba en az 5 ml olacak şekilde toplandı.⁽¹⁶¹⁾ Toplanan tükürük örnekleri pasteur pipetler yardımıyla falkon tüplerine aktararak 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edildi ve tabanda oluşan çökeltiye dokunulmadan yüzeydeki berrak sıvı (süpernatant) pasteur pipetlerle 1,5 ml alınarak eppendorf tüplerine aktarıldı. Tükürük örneklerinde kan ve besin artığı gibi yabancı maddelerin bulunduğu durumlarda örnekler yenilendi. Toplanan tükürük örnekleri analiz gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.5.2 Tükürük Örneklerinin Hazırlanması

Analiz günü, -20°C’de saklanan tükürük örnekleri oda sıcaklığında tamamen çözülünceye kadar bekletildi. Daha sonra tükürük örnekleri enzim bağılı immün absorban yöntem (ELISA) için direkt olarak kullanıldı.

3.5.3 Tükürük Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

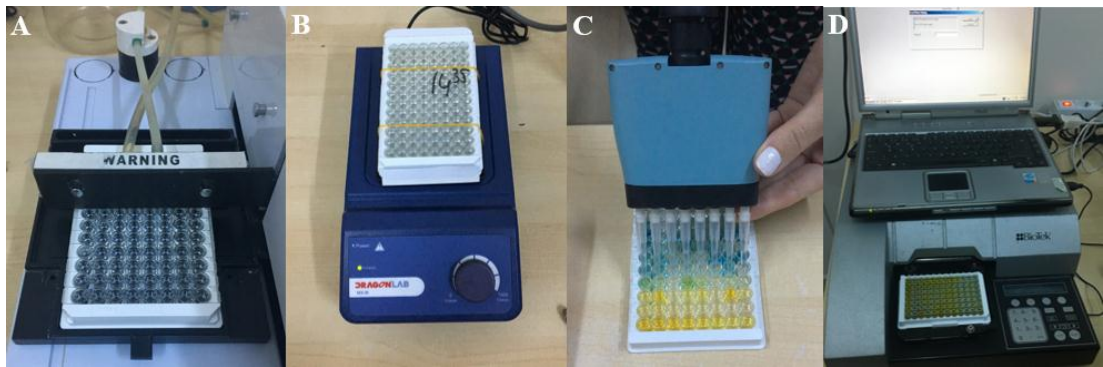
Tükürük örneklerinin IL-1 β ve BPI seviyeleri ölçümü, FARMASİNA Tıbbi ve Kimyevi Ürünler San. Tic. Ltd. Şti.’nin laboratuvarları tarafından IL-1 β (INVITROGEN IL-1 β Human ELİSA KİT 96T, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria) ve BPI (ABBEXA Human Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI) ELİSA Kit 96T, Abbexa Ltd, Cambridge, UK) için ELISA kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

IL-1 β Seviyelerinin Belirlenmesi

Tükürük IL-1 β seviyelerinin belirlenmesi için üretici firma tarafından belirlenen prosedürlere uyularak analiz gerçekleştirilmiştir. İşlem öncesinde kitler ve örnekler, oda sıcaklığında 30 dakika beklenerek, kitlerin ve örneklerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra aşağıda belirtilen test protokolü aşamaları sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

1. Test protokolüne başlamadan önce reaktifler hazırlandı ve gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
2. Plaka, pipetlenmeye başlamadan önce, 2 kez mikropilaka yıkayıcıda, 400 μ l yıkama solüsyonu ile kullanım klavuzunda belirtilen yönergeler doğrultusunda yıkandı (Şekil 3.2.A).
3. Standart kuyucuklarına, harici standart seyreltme yöntemiyle hazırlanan standartlardan 100 μ l eklendi.
4. Örnekler için belirlenen kuyucuklara 50 μ l örnek eklendi. Daha sonra örnek kuyucuklarına 50 μ l örnek seyreltici eklendi.

5. Tüm kuyucuklara 50 µl Biotin – Konjugat eklendi.
6. Plaka yapışkan bir film ile kapatılarak, 2 saat süreyle oda sıcaklığında (18°C ile 25°C arasında) mikrolaka çalkalayıcıda inkübe edildi (Şekil 3.2.B).
7. 3 kez mikrolaka yıkayıcı ile plaka yıkaması gerçekleştirildi (Şekil 3.2.A).
8. Tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş Streptavidin – HRP eklendi ve plaka yapışkan bir film ile kapatılarak , 1 saat süreyle oda sıcaklığında (18°C ile 25°C arasında) mikrolaka çalkalayıcıda inkübe edildi (Şekil 3.2.B).
9. 3 kez mikrolaka yıkayıcı ile plaka yıkaması gerçekleştirildi (Şekil 3.2.A).
10. Tüm kuyucuklara 100 µl TMB Substrat Solüsyonu eklendi.
11. Plaka, renklenme için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında (18°C ile 25°C arasında) ve karanlıkta inkübe edildi.
12. Tüm kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu eklendi. Kuyucuklardaki mavi renklenme sarı renklenmeye döndü (Şekil 3.2.C).
13. ELX – 800 (ELx-800, µQuant, BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, ABD) mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 nm’de Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçüldü (Şekil 3.2.D).
14. Cihaza ait GEN5 yazılımı ile elde edilen standart grafiği yardımıyla örnek konsantrasyonları hesaplandı(Şekil 3.2.D).



Şekil 3.2. A) Plakanın, Mikrolaka Yıkayıcıda Yıkınması B) Plakanın Çalkalayıcıda İnkübe Edilmesi C) Durdurma Solüsyonu Eklenmesiyle Mavi Rengin Sarı Renge Dönüşümü D) Mikrolaka Okuyucu Kullanılarak 450 nm’de Optik Yoğunluğun Belirlenmesi

BPI Seviyelerinin Belirlenmesi

Tükürük BPI seviyelerinin belirlenmesi için üretici firma tarafından belirlenen prosedürlere uyularak analiz gerçekleştirilmiştir. İşlem öncesinde kitler ve örnekler,

oda sıcaklığında 30 dakika beklenerek, kitlerin ve örneklerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra aşağıda belirtilen test protokolü aşamaları sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

1. Test protokolüne başlamadan önce reaktifler hazırlandı ve gerekli kuyucuk sayısı belirlendi.
2. Hazırlanan standartlar, 100 µl olarak standart kuyucuklarına eklendi.
3. Kontrol (sıfır) kuyucuğuna 100 µl örnek/standart seyreltici solüsyon eklendi.
4. Test örneği kuyucuklarına 100 µl uygun şekilde seyreltilen test örnekleri eklendi.
5. Plaka bir kapak ile kapatılarak 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
6. Kapak çıkarıldı, sıvı atıldı ve yıkama işlemi yapılmadı.
7. Tüm kuyucuklara 100 µl hazırlanmış Biotin – Konjugat antikor çalışma solüsyonu eklendi. Çözeltinin yan duvarlara temas edilmeden kuyucuklara eklenmesine özen gösterildi.
8. Plaka bir kapak ile kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
9. Kapak çıkarılarak solüsyon uzaklaştırıldı. Plaka 3 kez mikropilaka yıkayıcıda yıkandı.
10. Tüm kuyucuklara 100 µl HRP çalışma solüsyonu eklendi. Plaka bir kapak ile kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
11. Kapak çıkarılarak solüsyon uzaklaştırıldı. Plaka 5 kez mikropilaka yıkayıcıda yıkandı.
12. Tüm kuyucuklara 90 µl TMB Substratı eklendi. Plaka bir kapakla kapatılarak 37°C'de, 10 ile 20 dakika arasında, karanlıkta inkübe edildi.
13. Enzim reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Enzimin tamamen etkisiz hale getirilmesi amacıyla durdurma solüsyonu hızlı ve homojen bir şekilde karıştırıldı.
14. Durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra mavi rengin sarı renge dönüşü gözlemlendi.

15. ELX – 800 (ELx-800, μ Quant, BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, ABD) mikropilaka okuyucu kullanılarak 450 nm’de Optik Yoğunluğu (O.D.) ölçüldü.

16. Cihaza ait GEN5 yazılımı ile elde edilen standart grafiği yardımıyla örnek konsantrasyonları hesaplandı.

3.6 İstatiksel Analizler

3.6.1 Güç Analizi (Power Analizi)

Chen ve arkadaşlarının yayınından elde edilen, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOA) hastalarıyla kontrol grubunun BPI (Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein) ölçümlerindeki değişime ait yapılan bağımsız örneklem t testinin sonuçları kullanılarak hesaplanan güç analizinde; etki büyüklüğü ($d=5,95$) olarak hesaplandığında, 0,05 hata payı, 0,95 güç ile çalışmaya dahil edilmesi gereken minimum örneklem sayısı toplam $n=6$ olarak bulunmuştur. $n=100$ olarak alındığında çalışmanın gücü %99,99 olarak hesaplanmıştır. G Power 3.1 programı ile yapılmıştır.⁽¹⁶²⁾

3.6.2 Verilerin İstatistiksel Analizi

Analizler SPSS 23.0 (IBM, New York, ABD) programı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama ve standart sapma değerleri ile sunuldu. Kategorik verilerin analizinde Pearson Ki-Kare Testi kullanılmıştır. Normallik varsayımı Shapiro-Wilks testi ve bunlarla beraber histogram, çarpıklık-basıklık değerleri ve q-q plot grafikleri ile değerlendirildi. Grupların sayısal değerleri arasındaki farkların analizinde normal dağılım varsayımı sağlandığında Bağımsız Örneklem t Test, sağlanmadığı durumda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ordinal ve/veya sayısal veriler arasındaki ilişkiler, non-parametrik Spearman Testi ile belirlendi. 0,05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Demografik Bulgular

Çalışmaya katılan periodontitis hastaları ve periodontal açıdan sağlıklı bireylerin demografik verilerine ilişkin tanımlayıcı istatistikleri tablo 4.1.'de verilmiştir. Çalışmamız toplam 100 birey üzerinde tamamlanmıştır. Sağlıklı grubu oluşturan bireylerin yaş aralığı 18 ile 42 arasında değişmekte olup ortalaması $26,62 \pm 6,02$ 'dir. Periodontitis grubunu oluşturan hastaların yaş aralığı 22 ile 63 arasında değişmekte olup ortalaması $43,36 \pm 10,13$ 'tür. Sağlıklı grubu oluşturan 50 hastanın 36'sı (%72) kadın, 14'ü (%28) erkek bireylerden oluşmaktadır. Periodontitis grubunu oluşturan 50 hastanın 29'u (%58) kadın, 21'i (%42) erkek hastalardan oluşmaktadır.

Tablo 4.1. Demografik Verilerin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

	Sağlıklı Grup n=50	Periodontitis Grubu n=50	Tüm Hastalar n=100	p
Yaş (Yıl) (Ort±Ss)	26,62±6,02	43,36±10,13	34,99±11,81	<0,001 ^a
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	36 / 14	29 / 21	65 / 35	0,142 ^b

a: Bağımsız İki Örneklem t Testi, b: Pearson Ki Kare Testi

Gruplar arasında yaş ortalaması açısından karşılaştırmada periodontitis grubunda belirlenen ortalamaların sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu ($p < 0,001$) ancak cinsiyet açısından gruplar arasında herhangi bir fark olmadığı tespit edilmemiştir ($p > 0,05$).

4.2 Klinik Bulgular

Çalışmada yer alan periodontitis hastaları ve periodontal açıdan sağlıklı bireylere ait periodontal klinik parametrelerin (Pİ, Gİ, SCD, SK, KAS) ortalaması ve standart sapma değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırılması tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Gruplara ait Pİ, Gİ, SCD, SK ve KAS verileri karşılaştırıldığında tüm değerlerin periodontitis grubunda sağlıklı gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). Buna göre plak indeksi ortalamaları ve standart sapma değerleri, sağlıklı grupta $0,45 \pm 0,13$, periodontitis grubunda $1,64 \pm 0,22$

olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). Gingival indeks ve sondlamada kanama yüzdelerinin ortalamaları ve standart sapma değerlerinin, sırasıyla, sağlıklı grupta ($0,50\pm0,18$; $8,02\pm2,71$) periodontitis grubuna ($1,68\pm0,22$; $72,98\pm11,54$) oranla istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Sondlanabilir cep derinliği ve klinik ataşman seviyesi ortalamaları ve standart sapma değerlerinin ise, sırasıyla, periodontitis grubunda ($3,66\pm0,58$ mm, $3,76\pm0,63$ mm) sağlıklı gruba ($2,00\pm0,21$ mm, $2,00\pm0,21$ mm) oranla istatistiksel olarak daha yüksek oldukları tespit edildi ($p<0,001$).

Tablo 4.2. Çalışma Grupları Arasında Periodontal Klinik Parametrelerin Karşılaştırılması

	Sağlıklı Grup n=50 Ort±Ss	Periodontitis Grubu n=50 Ort±Ss	p
Plak İndeksi	0,45±0,13	1,64±0,22	<0,001 ^a
Gingival İndeks	0,50±0,18	1,68±0,22	<0,001 ^a
Sondlanabilir Cep Derinliği (mm)	2,00±0,21	3,66±0,58	<0,001 ^a
Sondlamada Kanama (%)	8,02±2,71	72,98±11,54	<0,001 ^b
Klinik Ataşman Seviyesi (mm)	2,00±0,21	3,76±0,63	<0,001 ^a

a: Bağımsız İki Örneklem t Testi, b: Mann-Whitney U Testi

4.3 Biyokimyasal Bulgular

Çalışmaya katılan periodontitis hastaları ve periodontal açıdan sağlıklı bireylerin ELİSA yöntemi ile değerlendirilen tükürük İnterlökin 1 β (IL-1 β) ve Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein (BPI) seviyelerinin ortalamaları, standart sapma değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırılması tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

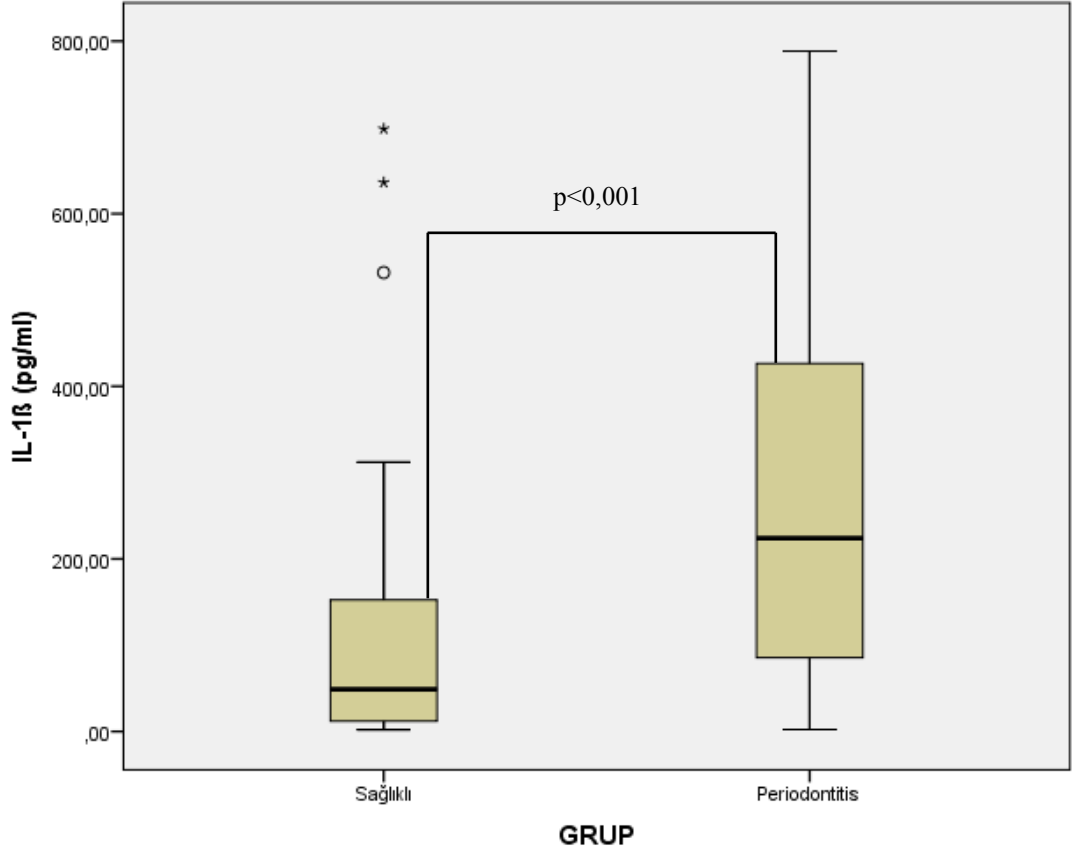
Tablo 4.3. Çalışma Grupları Arasında Tükürük IL-1 β ve BPI Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Sağlıklı Grup n=50 Ort±Ss	Periodontitis Grubu n=50 Ort±Ss	p
IL-1β (pg/ml)	111,23±153,64	275,09±224,28	<0,001 ^a
BPI (pg/ml)	125,43±116,35	689,48±605,79	<0,001 ^a

a: Mann-Whitney U Testi

4.3.1 Tükürük IL-1 β Seviyeleri

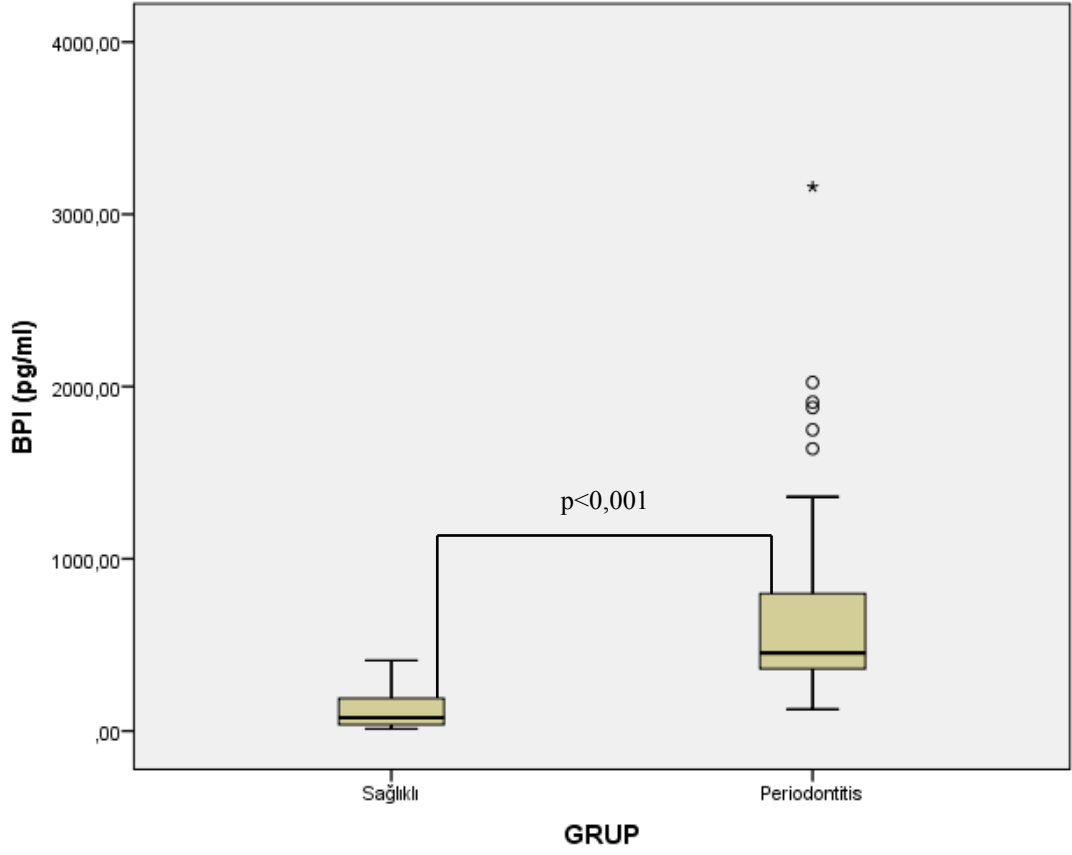
Periodontal açıdan sağlıklı grup ve periodontitis grubunun tükürük IL-1 β seviyelerinin istatistiksel karşılaştırılması şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Tükürük IL-1 β seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri sağlıklı grupta 111,23 \pm 153,64 pg/ml, periodontitis grubunda 275,09 \pm 224,28 pg/ml olup, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak güçlü bir anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,001).



Şekil 4.1. Çalışma Grupları Arasında Tükürük IL-1 β Seviyesinin Karşılaştırma Grafikleri

4.3.2 Tükürük BPI Seviyeleri

Periodontal açıdan sağlıklı grup ve periodontitis grubunun tükürük BPI seviyelerinin istatistiksel karşılaştırılması şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Tükürük BPI seviyelerinin ortalama ve standart sapma değerleri sağlıklı grupta 125,43 \pm 116,35 pg/ml, periodontitis grubunda 689,48 \pm 605,79 pg/ml olup, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak güçlü bir anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,001).



Şekil 4.2. Çalışma Grupları Arasında Tükürük BPI Seviyelerinin Karşılaştırılma Grafikleri

4.4 Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Korelasyon Analizleri

Çalışmamıza katılan periodontitis hastaları (periodontitis grubu) ve periodontal açıdan sağlıklı bireylerin (sağlıklı grup) klinik parametre verileri (Pİ, Gİ, SCD, SK, KAS), tükürük IL-1 β ve BPI seviyelerine ilişkin Spearman's rho korelasyon analizi kullanılarak elde edilen korelasyon verileri tablo 4.4'de sunulmuştur.

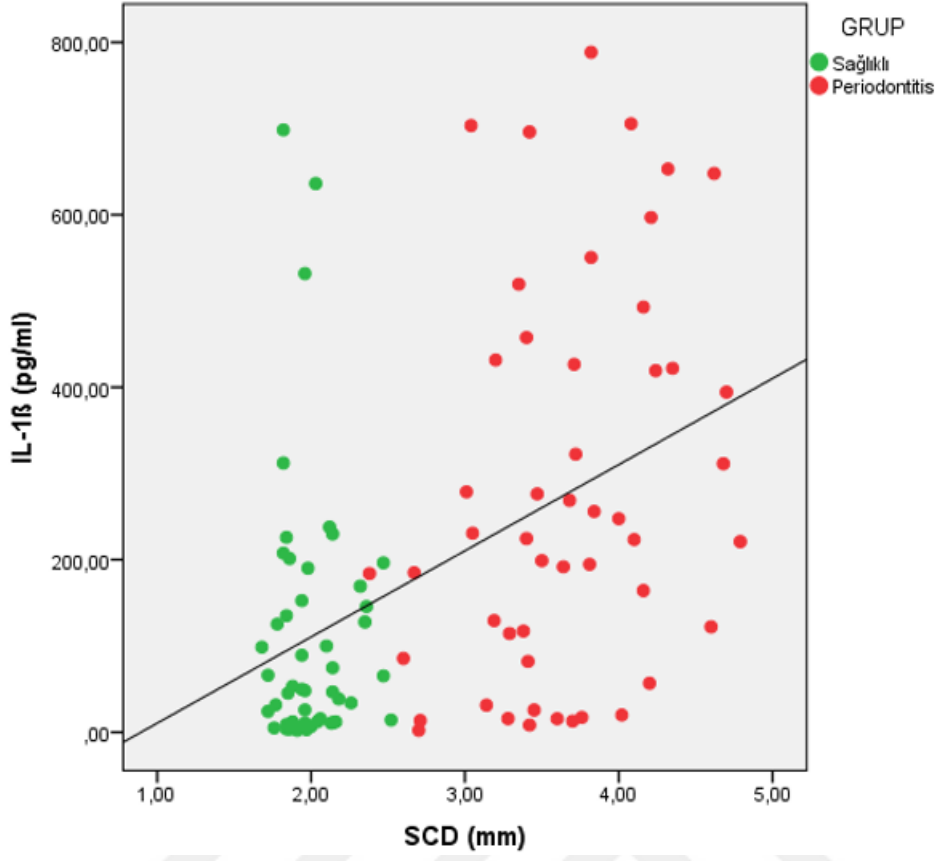
Tablo 4.4. Klinik ve Biyokimyasal Verilerin Korelasyonları

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	SK (%)	KAS (mm)	IL-1β (pg/ml)	BPI (pg/ml)
Pİ	1						
Gİ	,877**	1					
SCD (mm)	,848**	,847**	1				
SK (%)	,836**	,909**	,847**	1			
KAS (mm)	,850**	,849**	,998**	,847**	1		
IL-1β (pg/ml)	,397**	,342**	,449**	,301**	,451**	1	
BPI (pg/ml)	,614**	,608**	,615**	,606**	,619**	,421**	1

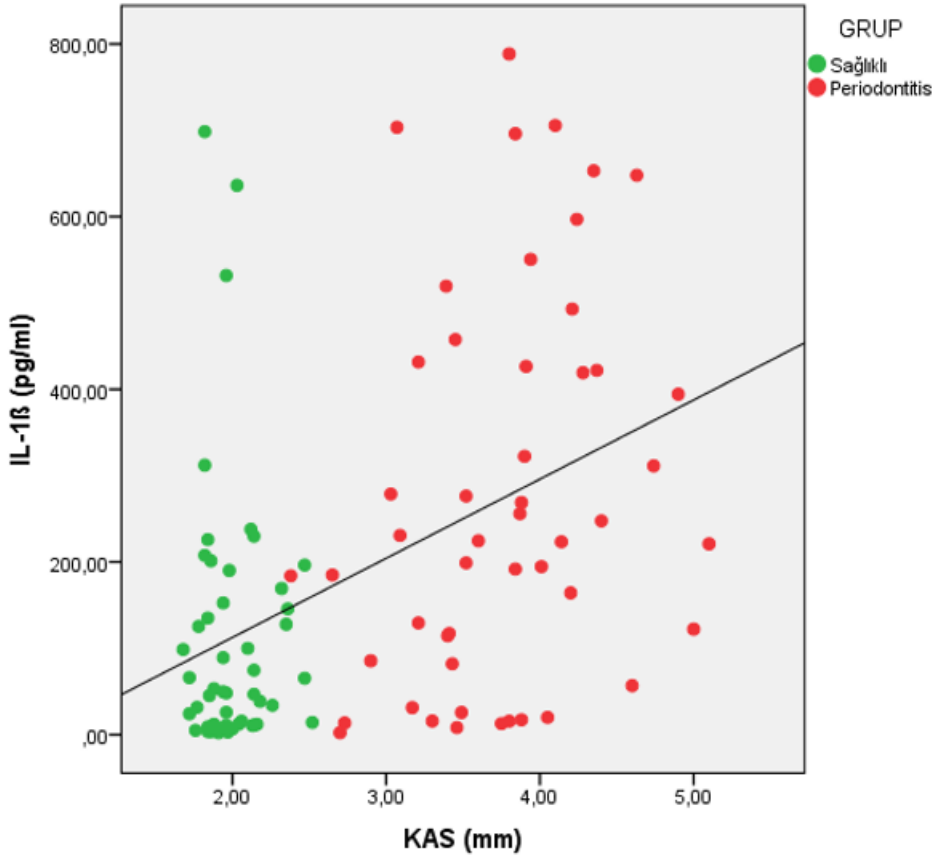
** : p<0,01, Spearman's Korelasyon Testi

Klinik parametre ortalamaları değerlendirildiğinde; Pİ ile Gİ (r=0,877), SCD (r=0,848), SK (r=0,836) ve KAS (r=0,850); Gİ ile SCD (r=0,847), SK (r=0,909) ve KAS (r=0,849); SCD ile SK (r=0,847) ve KAS (r=0,998); SK ile KAS (r=0,847) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon saptandı (p<0,01).

Biyokimyasal bulgular ile klinik parametreler arasındaki korelasyon verileri incelendiğinde, tükürük IL-1β düzeyleri ile Pİ (r=0,397), Gİ (r=0,342), SCD (r=0,449), SK (r=0,301) ve KAS (r=0,451) arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulundu (p<0,01). Tükürük IL-1β ile SCD ve KAS arasındaki ilişki Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.

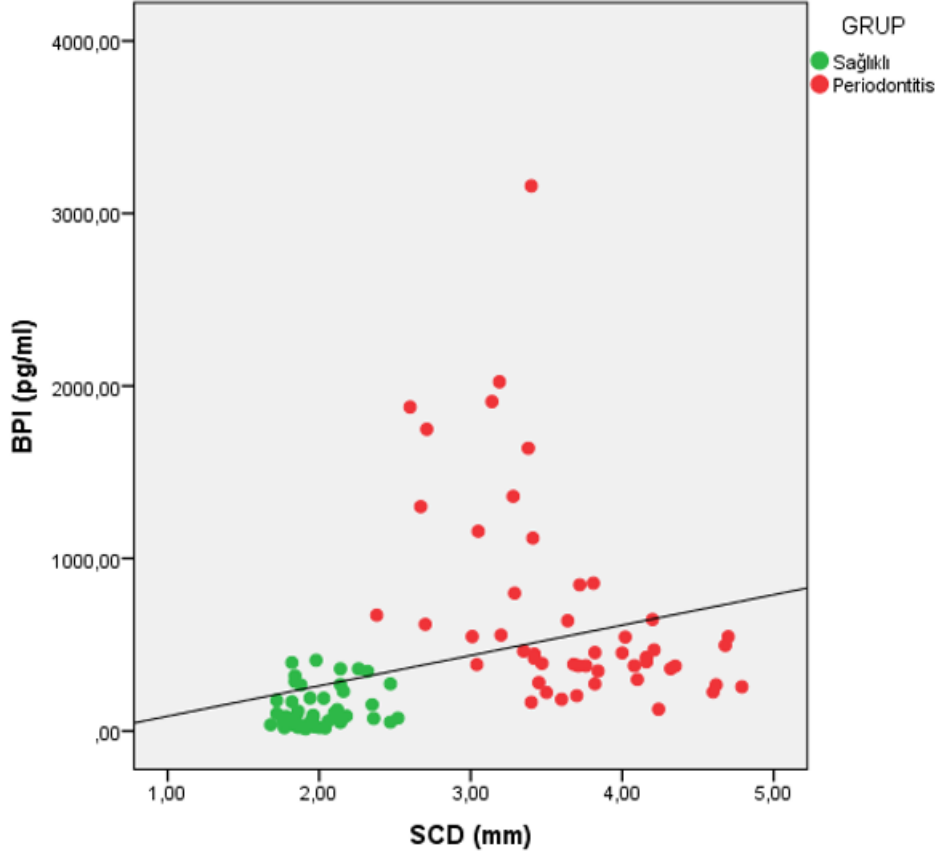


Şekil 4.3. Tükürük IL-1 β ile SCD Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

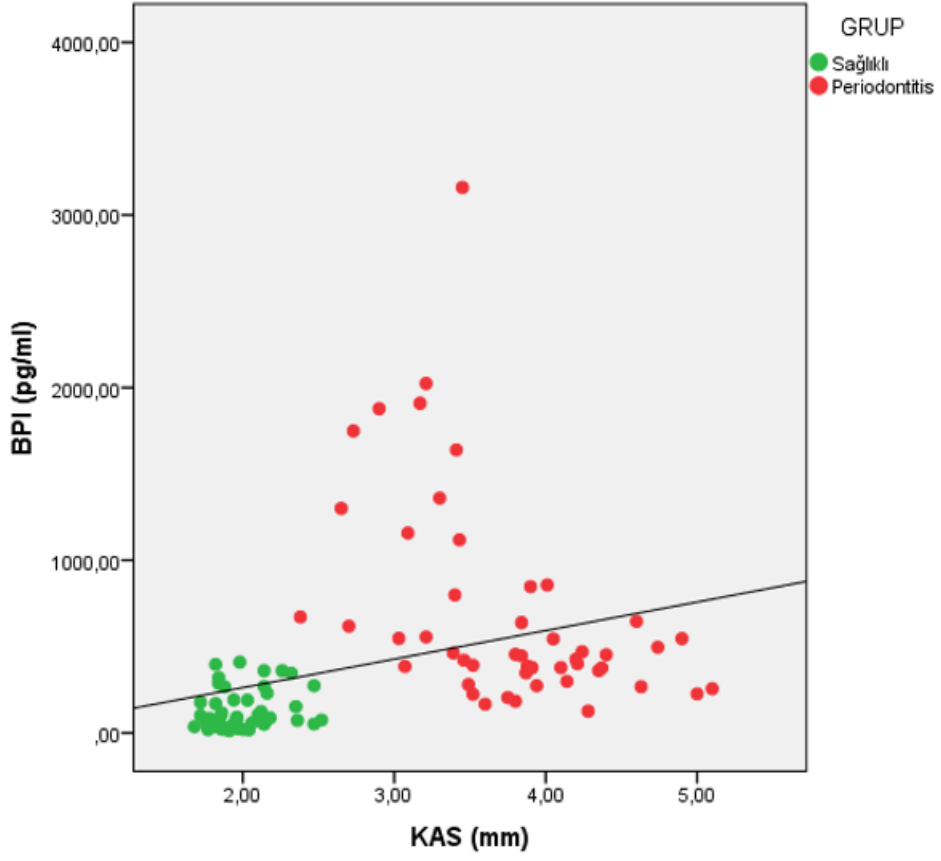


Şekil 4.4. Tükürük IL-1 β ile KAS Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

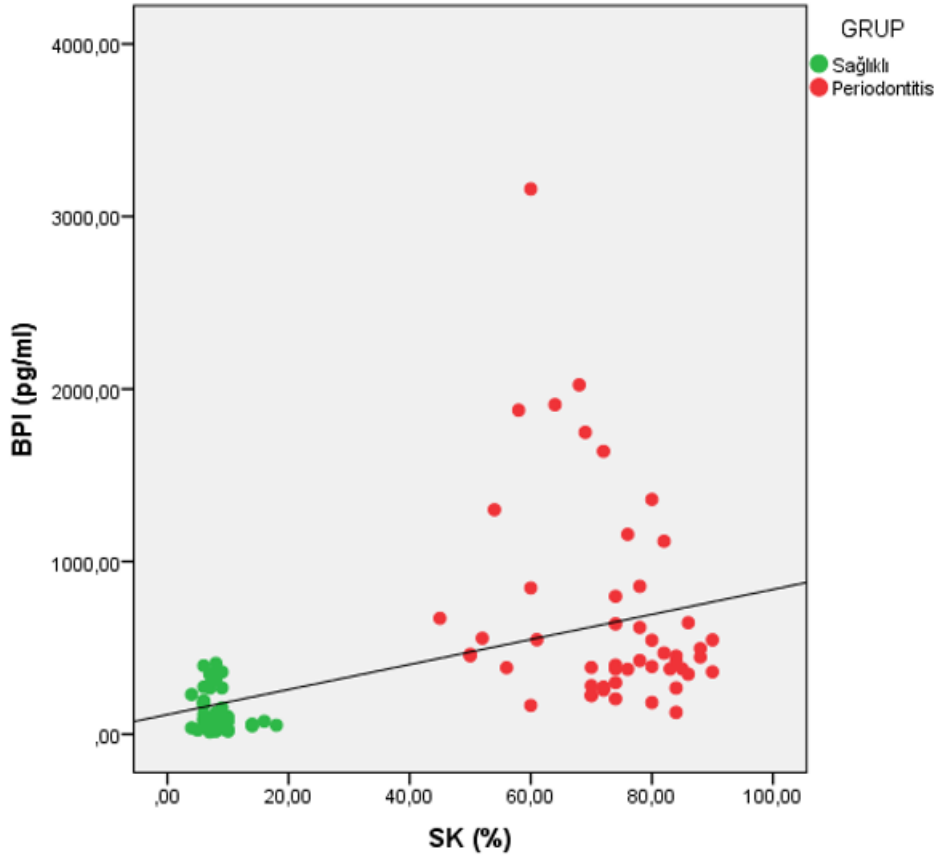
Tükürük BPI düzeyleri ile Pİ ($r=0,614$), Gİ ($r=0,608$), SCD ($r=0,615$), SK ($r=0,606$), KAS ($r=0,619$) ve arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulundu ($p<0,01$). Tükürük BPI ile SCD, KAS ve SK arasındaki ilişki ise Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Tükürük BPI ile SCD Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

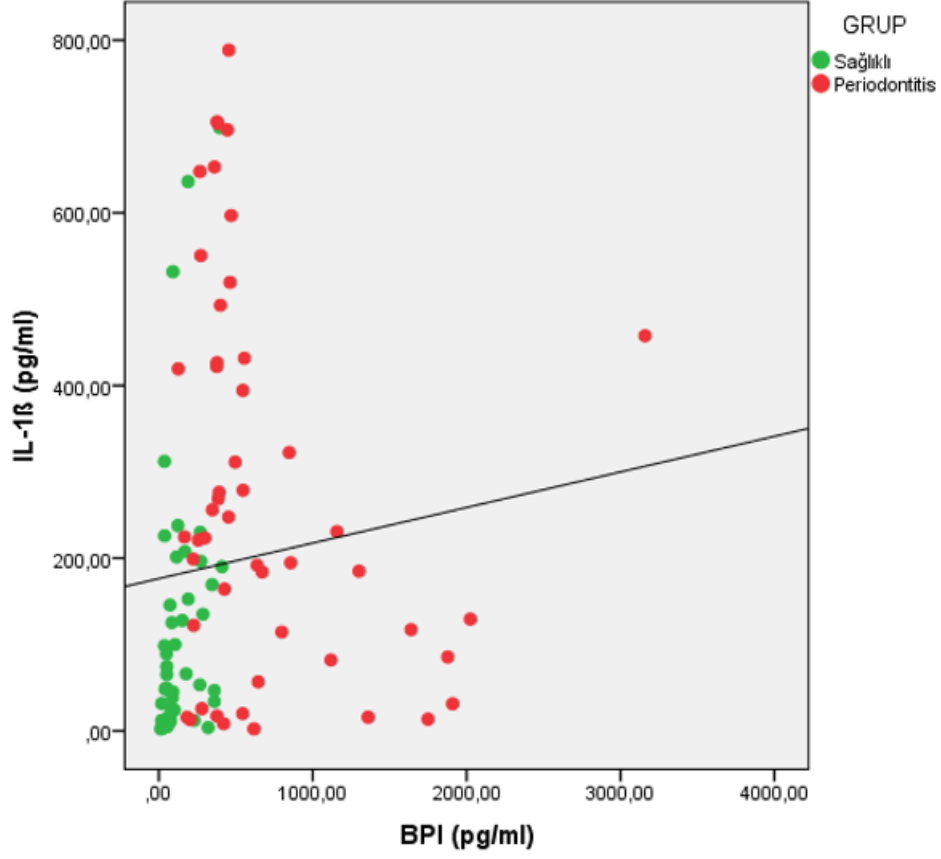


Şekil 4.6. Tükürük BPI ile KAS Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)



Şekil 4.7. Tükürük BPI ile SK Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

Biyokimyasal verilerinin arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, tükürük IL-1 β ile tükürük BPI ($r=0,421$) düzeyleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulundu ($p<0,01$). Tükürük IL-1 β ve tükürük BPI arasındaki ilişki Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Tükürük IL-1 β ile BPI Korelasyon Grafiği (Spearman's rho Korelasyon)

5. TARTIŞMA

Periodontitis temelde mikrobiyal dental plağa bağlı olarak gelişen dişeti iltihabı (gingivitis) ile başlayıp tedavi edilmediğinde bağ dokusu yıkımı ve alveolar kemik kaybı ile karakterize ve ilerleyen süreçlerde dişlerin kaybına neden olabilen kronik enflamatuvar bir hastalıktır.⁽¹⁶³⁾ Hastalığın etiopatogenezinde biyofilm içerisinde bulunan spesifik periodontal patojenler ile birlikte bu patojenlere karşı gelişen immüno-enflamatuvar konak cevabı rol oynar.⁽¹⁶⁴⁾

Oral mikrobiyota tükürük, epitel ve DOS'un doğal immünitesi tarafından kontrol edilmektedir. Tükürükte hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminde antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve immüno-modülatör olarak görev yapan pek çok savunma proteini bulunmaktadır.⁽¹¹³⁾ Mikroorganizma ürünleri ve proenflamatuvar mediatörler tarafından konak hücrelerinin çeşitli sinyal yolları ile uyarılması sonucu üretilen bu AMP'ler tükürük ve DOS'ta oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen kümülatif ve / veya sinerjik etkileri sayesinde ağız boşluğunda etkili bir savunma ağını oluştururlar. Son yıllarda periodontoloji alanında AMP'ler ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, AMP'lerin periodontal hastalıklar üzerindeki spesifik rolleri hala tam olarak aydınlatılamamıştır.^(116,117) Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı, periodontal açıdan sağlıklı ve periodontitisli hastalarda tükürük IL-1 β ve BPI seviyelerinin değerlendirilmesi, bu biyokimyasal parametreler ile klinik periodontal indeksler arasındaki ilişkinin incelenmesi ve böylece BPI'nin periodontal hastalıklardaki rolünün belirlenmesidir.

Çalışmamız periodontal açıdan sağlıklı ve periodontitis grubu olmak üzere, 50 sağlıklı ve 50 periodontitis hastası, toplam 100 birey ile tamamlanmıştır. Çalışmamıza dahil edeceğimiz hastaların seçiminde belirli kriterlere dikkat edildi. Periodontal hastalığı etkilediğı bilinen sistemik hastalıkların (diyabet, romatoid artrit, kardiyovasküler sistem hastalıkları, vb.) olduğı durumlarda, konak immün sistemindeki değişikliklere bağlı olarak, periodontal dokulardaki yıkımın daha da şiddetlendiğı bilinmektedir.⁽¹⁶⁵⁾ Bu sistemik hastalıklara sahip bireylerden salgılanan sitokin ve enzim seviyelerinin de farklılık gösterebileceğı bildirilmiştir.⁽¹⁶⁶⁾ Ayrıca sigara kullanımı da periodontal hastalığın prevalansını ve şiddetini etkileyen önemli bir risk faktörüdür.^(167,168) Sigara kullanan kişilerde ataşman kaybı ve dişeti

çekilmelerinin daha hızlı ilerlediği⁽¹⁶⁹⁾ ve sigara kullanmayan kişilere göre 4 kat daha fazla periodontitis riski bulunduğu tespit edilmiştir.^(170,171) Bu nedenle çalışmamıza dahil edilen bireylerin sistemik olarak sağlıklı olmalarına ve sigara kullanmıyor olmalarına dikkat edilerek tükürükte araştırılacak olan parametrelerin bu faktörlerden etkilenebilme olasılığı elimine edilmiştir.

Çalışma gruplarımızın demografik verileri değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark yoktur ($p>0,05$). Ancak gruplar arasında yaş parametreleri değerlendirildiğinde periodontitisli grubun yaş ortalamasının ($43,36\pm 10,13$) periodontal açıdan sağlıklı grubun yaş ortalamasından ($26,62\pm 6,02$) istatistiksel olarak daha yüksektir. Bu durum her ne kadar periodontal hastalıkların ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıktığını ve ileri yaşlarda hastalığın şiddeti ve prevalansının arttığını bildiren diğer çalışmalar ile uyumlu olsa da⁽¹⁷²⁾ çalışmamıza ait bir limitasyondur. Bu durumun nedeni ise Covid-19 pandemisi sebebiyle fakültemize başvuran hasta sayısındaki azalma ve hasta seçim kriterlerimizin oldukça kısıtlayıcı olmasıdır.

Çalışmamıza dahil edilen bireylerin periodontal durumlarının belirlenebilmesi amacıyla klinik periodontal indeksler (Pİ, Gİ, SCD, SK, KAS) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda rutin olarak kullanılan bu klinik parametre ölçümleri, çalışmamızın ölçüm sonuçlarını karşılaştırmamıza imkân sağlamasından dolayı tercih edilmiştir.⁽²⁸⁾ Klinik periodontal parametre verileri değerlendirildiğinde, periodontitis grubunda, beklenildiği şekilde, tüm veriler sağlıklı gruba oranla istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0,001$). Ayrıca çalışmaya ait klinik ölçümlerin standardizasyonu amacıyla tüm klinik ölçümler ve tükürük örneklerinin toplanması tek bir araştırmacı (MBD) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Periodontal hastalıklarda erken tanı ve teşhis son derece önemlidir. Periodontal hastalıklarda, hastalığın aktivitesinin ve periodontal hastalık açısından risk taşıyan hastaların belirlenmesi günümüzde karşılaştığımız zorlukların başında gelir. Bu nedenle günümüzde tükürük gibi biyolojik sıvıların periodontal hastalıkların erken teşhis edilmesi ve risk taşıyan hastaların belirlenmesinde tanı amacıyla kullanımı söz konusu olmuştur.^(173,174) Periodontal hastalıkların immüno-patogenezine yönelik çalışmaların büyük bir kısmında dişeti dokusu ve DOS örneklerine odaklanılmıştır.⁽¹⁷⁵⁾ Ancak tükürük DOS'a göre, girişimsel olmayan yöntemlerle

toplanabilen, özel ekipman gerektirmeyen, ekonomik, elde edilmesi kolay bir sıvıdır.⁽¹⁷⁶⁾ Ayrıca DOS içeriğinin lokal olarak ilgili bölgedeki enflamatuvar durumu yansıtırken, tükürük içeriğinin tüm ağzın enflamatuvar durumunu yansıttığı gösterilmiştir.⁽²⁴⁾ Tükürük, periodontal hastalıklar sonucu doku yıkım ürünlerini ve birçok biyobelirteci içermesi sebebiyle de tanı aracı olarak kullanılabilir bir sıvıdır.^(24,177,178)

Tükürük örnekleri tüm ağızdan tam tükürük veya belirli tükürük bezlerinden bölgesel olarak toplanabilir.⁽¹⁶¹⁾ Tam tükürüğün bölgesel olarak toplanan tükürük örneklerine avantajı, DOS'ta bulunan sitokin ve doku yıkım ürünlerini içermesinden dolayı analizlerinin daha anlamlı olmasıdır.⁽¹⁷⁶⁾ Tükürük örnekleri ayrıca uyarılmış tükürük ya da uyarılmamış tükürük olarak toplanabilir. Uyarılma ile tükürüğün akış miktarı artarak tükürük içeriğinin konsantrasyonu değişebileceği gösterilmiştir.⁽¹⁷⁹⁾ Ayrıca uyarılmamış tükürük içeriği ve kompozisyonu, uyarılmış tükürüğe göre plazmaya daha fazla benzerlik göstermektedir.^(161,179) Bu sebeple uyarılmamış tükürük örneklerinin, biyobelirteç analizleri için daha uygun bir sıvı olarak kabul edilmektedir.⁽¹⁸⁰⁾ Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, bizde çalışmamızda uyarılmamış tam tükürük örnekleri toplamayı tercih ettik.

Vücuttaki biyolojik sıvıların ve dokuların analizi için diagnostik laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu testler değişik patolojik proseslerle direkt ilişkili spesifik biyokimyasal mediatörlerin, mikrobiyolojik ajanların ve hücrel değişikliklerin tanımlanmasına yöneliktir. ELISA, antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. ELISA yöntemi, tükürük gibi vücut sıvılarının biyokimyasal analizinde periodontolojide sıklıkla kullanılan hem teşhis hem de araştırmalarda hızlı, yeterli ve güvenilir sonuçlar veren, yüksek verimliliğe ve tekrarlanabilirliğe sahip bir yöntemdir.^(90,181) Yaptığımız çalışmada tükürük örneklerinin biyokimyasal analizi birçok avantajı bulunan ELISA yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Enflamatuvar ve immünolojik reaksiyonların temel yapı taşlarından biri olan IL-1 β 'nin periodontal hastalık aktivitesinde önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁽¹⁸²⁾ IL-1 β 'nin proenflamatuvar ve katabolik etkilerinin; B lenfosit proliferasyonu, T lenfosit aktivasyonu ve antikor üretiminin stimülasyonu, monosit

ve fibroblastlardan prostaglandin salınımı, matriks metalloproteinaz salınımı ve PMN lökositlerin kemotaksisinin aktivasyonu olduğu bilinmektedir.⁽¹⁷⁵⁾

Kemik formasyonunu inhibe edici ve kemik rezorpsiyonunu arttırıcı etkileri nedeni ile IL-1 β periodontal hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Stanshenko ve arkadaşları periodontitisli ve sağlıklı bireylerden elde ettikleri dişeti dokularında IL-1 α , IL-1 β ve TNF- α seviyelerini immünofloresan ve ELISA ile değerlendirdikleri çalışmalarında IL-1 β içeren hücre sayısının IL-1 α 'ya oranla 40 kat ve TNF- α 'ya oranla 5 kat daha fazla olduğunu tespit ederek, IL-1 β 'nin periodontal hastalıkların patogeneğinde önemli bir mediatör olduğu sonucuna varmışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada periodontitisli hastaların aktif ve pasif hastalıklı bölgeleri ve klinik olarak sağlıklı bölgelerden elde edilen dişeti dokularında IL-1 β seviyesi ELİSA yöntemi ile değerlendirildiğinde hastalığın aktif olduğu bölgelerde tespit edilen IL-1 β seviyesinin inaktif bölgelere oranla 2.5 kat, sağlıklı bölgelere oranla 4.6 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.^(97,183) Dagmar ve arkadaşları da periodontitisli ve sağlıklı bireylerin DOS IL-1 β seviyelerinin sağlıklılara oranla 6 kat daha fazla olduğunu ve akut enflamasyonun olduğu bölgelerde daha yüksek IL-1 β seviyeleri olduğunu bildirmişlerdir.⁽¹⁸⁴⁾ IL-1 β 'nin periodontal hastalıklar üzerindeki bu önemli etkilerinden dolayı biz de çalışmamızda IL-1 β seviyelerinin değerlendirmesini uygun bulduk.

Çalışmamızda, periodontal açıdan sağlıklı grup ile periodontitis grubu arasında tükürük IL-1 β seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. ($p < 0,001$). Periodontitis grubunda tükürük IL-1 β seviyeleri ($275,09 \pm 224,28$ pg/ml), periodontal açıdan sağlıklı gruba ($111,23 \pm 153,64$ pg/ml) göre istatistiksel olarak daha yüksektir. Bu sonuç periodontal doku yıkımının değerlendirilmesinde, bir alternatif olarak tam tükürük örneklerinde IL-1 β seviyelerinin de bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca klinik sağlık durumunda dahi periodontal dokularda mikroorganizma ve ürünlerine karşı sürekli düşük derecede bir enflamasyonun var olduğu bilindiğinden⁽¹⁸³⁾ periodontal açıdan sağlıklı grupta düşük seviyelerde de olsa tükürük IL-1 β seviyelerinin tespit edilmiş olması, dişeti sulkusundan tükürüğe doğru az miktarda da olsa bir sitokin göçünün olduğunu göstermektedir.⁽¹⁸⁵⁾

Çalışmamızda tükürük IL-1 β seviyesi ile SCD ($r=0,449$, $p<0,01$) ve KAS ($r=0,451$, $p<0,01$) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar tespit edilmiştir. Benzer şekilde Tobon-Aroyave ve arkadaşları 30 kronik periodontitis, 18 agresif periodontitis ve 18 sağlıklı kontrol gruplarında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, sağlıklı grup ile periodontitisli gruplar arasında tükürük IL-1 β seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca periodontal parametreler ve tükürük IL-1 β konsantrasyonları arasında da pozitif yönde bir ilişki olduğunu tespit ederek tükürükte tespit edilen IL-1 β seviyesinin, periodontal hastalık aktivitesi ile ilişkili bir konak cevabı ürünü olabileceği sonucuna varmışlardır.⁽¹⁷⁵⁾

Periodontal enflamasyon durumunda ortamdaki yoğun endotoksin varlığı düzensiz bir enflamatuvar konak yanıtını tetikler. Gram pozitif bakteriler, hücre membran duvarlarındaki peptidoglikanlar, lipoteikoik asit veya çözünür hücre dışı toksinlerin direkt konak hücreleri ile TLR ile etkileşimi sonucu konak tarafından tanınır.⁽¹⁸⁶⁻¹⁸⁸⁾ GNB'lerin konak tarafından algılanması ise, LPS / LBP / CD14 yolağı ve bu üçlü yapının konak hücrelerinden bir dizi proenflamatuvar sitokin ve enflamatuvar mediatörü salgılaması ile gerçekleşir. LBP endotoksinlere bağlanarak enflamatuvar yanıtta rol alan makrofaj ve nötrofilleri aktive ederek TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve interferon gama gibi sitokinlerin salınımına yol açar.^(189,190)

Endotoksinlere karşı konak cevabını düzenleyen endotoksin bağlayıcı proteinler ailesinin bir üyesi olan BPI, GNB ve endotoksinlerine karşı seçici ve güçlü antimikrobiyal ve endotoksin nötralize edici fonksiyonu nedeni ile konak savunmasında önemli rol oynayan ve tükürükte bulunan bir AMP'dir.⁽¹⁹¹⁾ BPI, LPB oranla LPS olan daha yüksek afinitesi sayesinde, endotoksinlere bağlanarak, nötrofil ve makrofajların endotoksin aracılı aktivasyonunu ve buna bağlı proenflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe eder.^(17,139,140,150)

BPI'nin endotoksinlere karşı güçlü nötralize edici fonksiyonu invitro ve invivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Marian ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, dişi CD1 farelerine 25 mg/kg S. Abortus endotoksini (% 60 öldürücü endotoksin dozu) enjeksiyonu sonrası farklı dozlarda (1, 2, 5 ve 10 mg) enjekte edilen BPI'nin, tüm dozlarında ≥ 90 koruyucu olduğu ve septisemiye bağlı mortaliteyi önlediği tespit edilmiştir.⁽¹⁹²⁾

Güncel literatür taraması sonucunda çalışmamız, periodontal sağlık ve hastalık durumlarında BPI seviyelerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışma gruplarımızdaki tükürük BPI seviyeleri karşılaştırıldığında, periodontitis grubu BPI konsantrasyonlarının ($689,48 \pm 605,79$ pg/ml), periodontal açıdan sağlıklı gruba ($125,43 \pm 116,35$ pg/ml) oranla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0,001$). Ayrıca tükürük BPI değerleri ile SCD ($r=0,615$, $p < 0,01$) ve KAS ($r=0,619$, $p < 0,01$) seviyeleri arasında da pozitif yönde güçlü korelasyonlar vardır. Bu sonuçlar periodontal hastalıkta tükürük BPI seviyelerinin de anlamlı olarak yükseldiğini göstermektedir. Periodontitiste gelişen enflamasyona bağlı olarak periodontal cebin yumuşak doku duvarı ve cep içerisinde nötrofil miktarının arttığı bilinmektedir.⁽⁴⁸⁾ GNB'nin LPS'leri de, nötrofillerden BPI salgılamasında güçlü bir uyarıcı olduğundan, periodontitisli hastalarımızdaki yüksek tükürük BPI seviyelerinin, periodontal patojenlere karşı artmış akut enflamatuvar yanıtın bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışma sonuçlarımızı periodontal açıdan karşılaştırabileceğimiz benzer çalışmalar bulunmaması sebebiyle, çalışmamızı farklı kronik enflamatuvar hastalıklardaki BPI seviyeleri ve farklı ancak benzer özellikler taşıyan AMP'ler ile karşılaştırmanın yol gösterici olabileceğini düşündük.

Eroğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 17 aktif, 17 remisyon döneminde bulunan ülseratif kolit hastaları ve 17 sağlıklı kontrol grubunda serum BPI seviyelerini değerlendirdiklerinde, aktif ve remisyon dönemindeki ülseratif kolit hastalarında, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek serum BPI seviyeleri tespit etmiştir.⁽¹⁹³⁾ Benzer şekilde Xingyuan ve Chen'in astımlı hastalar ve sağlıklı kontroller üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, serum BPI seviyelerinin astımlı hastalarda istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar BPI seviyesinin astım için yeni bir potansiyel biyobelirteç olabileceğini ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.⁽¹⁹⁴⁾ Bülow ve arkadaşları ise menenjitli hastalar ve sağlıklı bireylerin beyin omurilik sıvısında BPI seviyelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, menenjitli grupta beyin omurilik sıvısı BPI seviyelerinin sağlıklılara oranla daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.⁽¹⁹⁵⁾

Nötrofillerin azurofilik granüllerinde depolanan ve periodontal patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal etki gösteren diğer bir AMP olan alfa defensinlerden⁽¹⁹⁶⁻¹⁹⁹⁾ 1-3'ün DOS seviyelerinin periodontitis hastalarında, sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁽²⁰⁰⁻²⁰²⁾ Türkoğlu ve arkadaşları DOS LL-37 ve adrenomedullin seviyelerini değerlendirdikleri iki ayrı çalışmada da, periodontitisli hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek DOS AMP seviyelerinin bulunduğunu ve klinik periodontal parametreler ile DOS AMP seviyeleri arasında pozitif korelasyonlar olduğunu bildirmişlerdir.^(203,204) Pereira ve arkadaşları ise 2012 yılında yaptıkları çalışmada tükürük hBD-2 düzeyinin kronik periodontitisli bireylerde periodontal olarak sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.⁽²⁰⁵⁾

Çalışmamızda ayrıca tükürük BPI seviyeleri ile tükürük IL-1 β seviyeleri arasında da pozitif yönde güçlü bir korelasyon vardır ($p < 0,01$). Yapılan invitro bir çalışmada, nötrofil ve makrofajların LPS ve proenflamatuvar sitokinler ile uyarılmaları sonucu, daha fazla BPI salınımı gerçekleştirdiği gösterilmiştir.⁽¹³⁹⁾ BPI'nin nötrofil ve makrofajların endotoksin aracılı aktivasyonunu ve buna bağlı proenflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe edici özelliği göz önüne alındığında, mevcut çalışma sonucumuz, tıpkı Marra ve arkadaşlarının da belirttiği şekilde^(139,140), BPI'nin periodontal enflamasyona bağlı olarak gelişen akut enflamatuvar yanıtta dengeleyici veya baskılayıcı bir rolünün de olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızın tüm sonuçlarını değerlendirdiğimizde; periodontitisli hastalarda, sağlıklı bireylere göre tükürük BPI seviyelerinin anlamlı düzeyde yüksek olması ve klinik periodontal parametreler ve IL-1 β seviyeleri ile arasında pozitif korelasyonların da bulunması, BPI'nin periodontal hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceğini ve tükürük BPI seviyelerinin bir biyobelirteç olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Ancak periodontal hastalıkların günümüzde tam anlamıyla aydınlatılamamış karmaşık bir patogeneze sahip olması nedeniyle, bireysel farklılıkların en aza indirildiği, daha fazla alt gruplar içeren ve bu grupların birbirlerine göre kıyaslandığı, histolojik ve mikrobiyolojik değerlendirmeleri de içeren daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada periodontal olarak sağlıklı ve periodontitisli bireydeki tükürük BPI ve IL-1 β seviyelerinin tespiti ve bu moleküllerin birbirleriyle ve klinik periodontal parametrelerle olan ilişkilerinin incelenmesi sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Klinik periodontal parametre verileri (Pİ, Gİ, SCD, SK, KAS) değerlendirildiğinde, periodontitis grubunda, beklenildiği şekilde, tüm veriler sağlıklı gruba oranla istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0,001$).
2. Çalışmamıza katılan tüm bireylerin klinik parametre verileri (Pİ, Gİ, SCD, SK, KAS), tükürük IL-1 β ve BPI seviyeleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar saptandı ($p<0,01$).
3. Çalışmamızın periodontitisli grubu ile periodontal açıdan sağlıklı grubu karşılaştırıldığında, periodontitisli grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tükürük IL-1 β seviyeleri tespit edildi ($p<0,001$). Bu sonuç periodontal doku yıkımının değerlendirilmesinde, bir alternatif olarak tam tükürük örneklerinde IL-1 β seviyelerinin de bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca klinik sağlık durumunda dahi periodontal dokularda mikroorganizma ve ürünlerine karşı sürekli düşük derecede bir enflamasyonun var olduğu bilindiğinden periodontal açıdan sağlıklı grupta düşük seviyelerde de olsa tükürük IL-1 β seviyelerinin tespit edilmiş olması, dişeti sulkusundan tükürüğe doğru az miktarda da olsa bir sitokin göçünün olduğunu göstermektedir.
4. Çalışmamızda tükürük IL-1 β seviyesi ile SCD ($r=0,449$, $p<0,01$) ve KAS ($r=0,451$, $p<0,01$) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar tespit edilmiştir.

Tükürük IL-1 β seviyelerinin, periodontal hastalık aktivitesi ile ilişkili bir konak cevap ürünü olabileceğini düşünmekteyiz.

5. Çalışma gruplarımızdaki tükürük BPI seviyeleri karşılaştırıldığında, periodontitis grubu BPI konsantrasyonlarının, periodontal açıdan sağlıklı gruba oranla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). Ayrıca tükürük BPI değerleri ile SCD ($r=0,615$, $p<0,01$) ve KAS ($r=0,619$, $p<0,01$) seviyeleri arasında da pozitif yönde güçlü korelasyonlar vardır. Bu sonuçlar periodontal hastalıkta tükürük BPI seviyelerinin de anlamlı olarak yükseldiğini göstermektedir. Periodontitiste gelişen enflamasyona bağlı olarak periodontal cebin yumuşak doku duvarı ve cep içerisinde nötrofil miktarının arttığı bilinmektedir. GNB'nin LPS'leri de nötrofillerden BPI salgılamasının güçlü bir uyarıcısı olduğundan, periodontitisli hastalarımızdaki yüksek tükürük BPI seviyelerinin, periodontal patojenlere karşı artmış akut enflamatuvar yanıtın bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz.
6. Çalışmamızda ayrıca tükürük BPI seviyeleri ile tükürük IL-1 β seviyeleri arasında da pozitif yönde güçlü bir korelasyon vardır ($p<0,01$). Mevcut çalışma sonucumuz, BPI'nin periodontal enflamasyona bağlı olarak gelişen akut enflamatuvar yanıtta dengeleyici veya baskılayıcı bir rolünün de olabileceğini göstermektedir.
7. Çalışmamızın tüm sonuçlarını değerlendirdiğimizde; periodontitisli hastalarda, sağlıklı bireylere göre tükürük BPI seviyelerinin anlamlı düzeyde yüksek olması ve klinik periodontal parametreler ve IL-1 β seviyeleri ile arasında pozitif korelasyonların da bulunması, BPI'nin periodontal hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceğini ve tükürük BPI seviyelerinin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak periodontal hastalıkların günümüzde tam anlamıyla aydınlatılamamış karmaşık bir patogeneze sahip olması nedeniyle, bireysel farklılıkların en aza indirildiği, daha fazla alt gruplar içeren ve bu grupların birbirlerine göre kıyaslandığı, histolojik ve mikrobiyolojik değerlendirmeleri de içeren daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89:S173-S82.
2. Van Dyke T, Serhan C. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of dental research*. 2003;82(2):82-90.
3. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*. 2018;89:S159-S72.
4. Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2006;40(1):107-19.
5. Sahingur SE, Cohen RE. Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):57-83.
6. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontology 2000*. 2008;48(1):92-110.
7. Socransky S, Haffajee A. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *Journal of periodontal research*. 1991;26(3):195-212.
8. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000*. 1997;13(1):91-120.
9. Bosshardt D, Lang N. The junctional epithelium: from health to disease. *Journal of dental research*. 2005;84(1):9-20.
10. Gorr S-U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology 2000*. 2009;51(1):152-80.
11. Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl_1):D933-D7.
12. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(21):2377-92.
13. Canny G, Levy O. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and BPI homologs at mucosal sites. *Trends in immunology*. 2008;29(11):541-7.
14. Schultz H, Weiss JP. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica Chimica Acta*. 2007;384(1-2):12-23.
15. Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, Chakravorty D. Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate immunity*. 2013;19(4):339-47.

16. Levy O, Sisson RB, Kenyon J, Eichenwald E, Maccone AB, Goldmann D. Enhancement of neonatal innate defense: effects of adding an N-terminal recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein on growth and tumor necrosis factor-inducing activity of gram-negative bacteria tested in neonatal cord blood ex vivo. *Infection and immunity*. 2000;68(9):5120-5.
17. Weiss J, Elsbach P, Shu C, Castillo J, Grinna L, Horwitz A, et al. Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(3):1122-30.
18. Weiss J, Elsbach P, Olsson I, Odeberg H. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(8):2664-72.
19. Nakamura M, Slots J. Salivary enzymes: origin and relationship to periodontal disease. *Journal of periodontal research*. 1983;18(6):559-69.
20. Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology 2000*. 2009;50(1):52-64.
21. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *American journal of dentistry*. 2009;22(4):241.
22. Giannobile W, McDevitt J, Niedbala R, Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Advances in dental research*. 2011;23(4):375-80.
23. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31(1):32-42.
24. Miller CS, King Jr CP, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *The Journal of the American Dental Association*. 2006;137(3):322-9.
25. Needleman I, McGrath C, Floyd P, Biddle A. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(6):454-7.
26. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018;89:S1-S8.
27. Chapple IL, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018;89:S74-S84.
28. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *Journal of periodontology*. 2018;89:S9-S16.
29. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple IL. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45:S17-S27.
30. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of clinical periodontology*. 2018;45:S44-S67.
31. Ramseier CA, Mirra D, Schütz C, Sculean A, Lang NP, Walter C, et al. Bleeding on probing as it relates to smoking status in patients enrolled in supportive periodontal therapy for at least 5 years. *Journal of clinical periodontology*. 2015;42(2):150-9.
32. Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *Journal of clinical periodontology*. 2015;42:S1-S4.

33. Suzuki J. Diagnosis and classification of the periodontal diseases. *Dental clinics of North America*. 1988;32(2):195-216.
34. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, Dye BA, Eaton KA, Eke PI, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *Journal of clinical periodontology*. 2015;42(5):407-12.
35. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of Periodontology*. 1999;4(1):32-7.
36. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
37. Listgarten M. Formation of dental plaque and other oral biofilms. *Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease* Boline, Cardiff, Wales. 1999:187-210.
38. Moore W, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994;5(1):66-77.
39. Socransky SS. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.
40. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):36.
41. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Periodontologia clinica e implantologia odontologica/Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Ed. Médica Panamericana; 2009.
42. Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011;15(2):111.
43. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *The Journal of periodontology*. 1965;36(3):177-87.
44. Schultz-Haudt S, Bruce M, Bibby B. Bacterial factors in nonspecific gingivitis. *Journal of dental research*. 1954;33(4):454-8.
45. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *Journal of Dental Research*. 1979;58(12):2404-12.
46. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*. 1994;8(2):263-71.
47. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2014;4:92.
48. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Newman and Carranza's Clinical Periodontology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2018.
49. Ebersole JL, Dawson III D, Emecen-Huja P, Nagarajan R, Howard K, Grady ME, et al. The periodontal war: microbes and immunity. *Periodontology 2000*. 2017;75(1):52-115.
50. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson III D, Morford LA, Huja PE, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2016;72(1):54-75.
51. Ebersole JL, Dawson III DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontology 2000*. 2013;62(1):163-202.
52. Garlet G. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. 2010;89(12):1349-63.
53. Kinane DF, Podmore M, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontology 2000*. 2001;26(1):54-91.
54. Cullinan M, Ford P, Seymour G. Periodontal disease and systemic health: current status. *Australian dental journal*. 2009;54:S62-S9.
55. Van Dyke TE, Kornman KS. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *Journal of periodontology*. 2008;79:1503-7.

56. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology* 2000. 2018;76(1):131-49.
57. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontology* 2000. 2013;62(1):203-17.
58. Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontology* 2000. 2009;50:52.
59. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology: Mini-review*. 2000;15(6):341-9.
60. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontology* 2000. 2013;61(1):16-53.
61. Dommisch H, Jepsen S. Diverse functions of defensins and other antimicrobial peptides in periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2015;69(1):96-110.
62. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's clinical periodontology: Elsevier health sciences*; 2011.
63. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006;40(1):29-49.
64. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2001;25(1):8-20.
65. Cullinan M, Hamlet S, Westerman B, Palmer J, Faddy M, Seymour G. Acquisition and loss of *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* over a 5-year period: effect of a triclosan/copolymer dentifrice. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(6):532-41.
66. Listgarten M. Microbiological diagnosis of periodontitis. *Journal de parodontologie*. 1985;4(5):367-9.
67. Kornman KS. Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clinical infectious diseases*. 1999;28(3):520-6.
68. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976;34(3):235.
69. Payne W, Page RC, Ogilvie A, Hall W. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *Journal of periodontal research*. 1975;10(2):51-64.
70. Zachrisson BU. A histological study of experimental gingivitis in man. *Journal of periodontal research*. 1968;3(4):293-302.
71. Schroeder H, Graf-de Beer M, Attström R. Initial gingivitis in dogs. *Journal of periodontal research*. 1975;10(3):128-42.
72. Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of Periodontal Research*. 1973;8(1):1-10.
73. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2008;79:1601-8.
74. Saygun I, Yapar M, Özdemir A, Kubar A, Slots J. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type 1 in periodontal abscesses. *Oral microbiology and immunology*. 2004;19(2):83-7.
75. Vidal F, Figueredo CMS, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arterial hypertension. *Journal of periodontology*. 2009;80(5):786-91.
76. Lindhe J, Parodi R, Liljenberg B, Fornell J. Clinical and structural alterations characterizing healing gingiva. *Journal of periodontal Research*. 1978;13(5):410-24.
77. Listgarten M, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *Journal of clinical periodontology*. 1978;5(2):115-32.

78. Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontology* 2000. 2018;76(1):51-67.
79. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*. 2004;4(7):499-511.
80. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000. 2007;43(1):41-55.
81. Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan Z-Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*. 2002;91(4):281-91.
82. Nichols TC, Fischer TH, Deliargyris EN, Baldwin Jr AS. Role of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Annals of Periodontology*. 2001;6(1):20-9.
83. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
84. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
85. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*. 2011;38:60-84.
86. Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, Kolls JK. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2013;8:477-512.
87. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *Journal of periodontology*. 2007;78(6):1083-93.
88. Gaffen S, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of dental research*. 2008;87(9):817-28.
89. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(3):248-66.
90. Jaedicke KM, Preshaw PM, Taylor JJ. Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2016;70(1):164-83.
91. Balkwill F, Burke F. The cytokine network. *Immunology today*. 1989;10(9):299-304.
92. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 1997;14(1):112-43.
93. Guner I, Ozmen D, Bayındır OS. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1997.
94. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
95. Delaleu N, Bickel M. Interleukin-1 β and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontology* 2000. 2004;35(1):42-52.
96. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000. 1997;14(1):33-53.
97. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Probst L, Haffajee A, Socransky S. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(7):548-54.
98. Oduncuoğlu B, Kayar N, Halilolu S, Serpek B, Ataoglu T, Alptekin N. Effects of a Cyclic NSAID Regimen on Levels of Gingival Crevicular Fluid Prostaglandin E₂ and Interleukin-1 β : A 6-month Randomized Controlled Clinical Trial. *Nigerian journal of clinical practice*. 2018;21(5):658-66.
99. Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, et al. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *Journal of oral pathology & medicine*. 1995;24(9):420-34.

100. Heasman P, Collins J, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor α in experimental gingivitis in humans. *Journal of periodontal research*. 1993;28(4):241-7.
101. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 1995;22(11):885-90.
102. Baum B, Yates III J, Srivastava S, Wong D, Melvin J. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Advances in dental research*. 2011;23(4):360-8.
103. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*. 2003;31(1):43-54.
104. Bulkacz J, Carranza F. Defense mechanisms of the gingiva. *Carranza's clinical periodontology* St Louis, MO: Elsevier Saunders. 2011:69-70.
105. Amerongen AN, Veerman E. Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral diseases*. 2002;8(1):12-22.
106. SLAVKIN HC. Protecting the mouth against microbial infections. *The Journal of the American Dental Association*. 1998;129(7):1025-30.
107. Javed F, Klingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström P-E. Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health*. 2009;9(1):12.
108. Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PloS one*. 2013;8(4).
109. Yoon AJ, Cheng B, Philipone E, Turner R, Lamster IB. Inflammatory biomarkers in saliva: assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(5):434-40.
110. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*. 2007;37(S1):S34-S45.
111. Christodoulides N, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Mohanty S, Dharshan P, et al. Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098(1):411-28.
112. Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D, Kryscio RJ, Lin Y, et al. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):271-9.
113. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology 2000*. 2009;51(1):152-80.
114. Zhang L, Rozek A, Hancock RE. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(38):35714-22.
115. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*. 2002;66(4):236-48.
116. Komatsuzawa H, Ouhara K, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Shiba H, et al. Susceptibility of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(30):3084-95.
117. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature immunology*. 2005;6(6):551-7.
118. Gorr S-U. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Periodontal Disease*. 15: Karger Publishers; 2012. p. 84-98.
119. WEIS J, Franson RC, Beckerdite S, Schmeidler K, Elsbach P. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*. 1975;55(1):33-42.
120. Calafat J, Janssen H, Tool A, Dentener MA, Knol EF, Rosenberg HF, et al. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is present in specific granules of human eosinophils. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;91(12):4770-5.

121. Reichel PH, Seemann C, Csernok E, Schröder J-M, Müller A, Gross WL, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein is expressed by human dermal fibroblasts and upregulated by interleukin 4. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(3):473-5.
122. Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN, et al. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(6):3902-7.
123. Bingle CD, Craven CJ. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Human molecular genetics.* 2002;11(8):937-43.
124. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, et al. Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics.* 1997;46(3):416-25.
125. Gray PW, Corcorran AE, Eddy Jr RL, Byers MG, Shows TB. The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics.* 1993;15(1):188-90.
126. Agellon LB, Quinet EM, Gillette TG, Drayna DT, Brown ML, Tall AR. Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene. *Biochemistry.* 1990;29(6):1372-6.
127. Gullberg U, Andersson E, Garwicz D, Lindmark A, Olsson I. Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. *European journal of haematology.* 1997;58(3):137-53.
128. Levy O, Canny G, Serhan C, Colgan S. Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. Portland Press Ltd.; 2003.
129. Munford RS. Invited review: detoxifying endotoxin: time, place and person. *Journal of endotoxin research.* 2005;11(2):69-84.
130. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3(2):169-76.
131. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation research.* 1997;46(10):382-91.
132. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Current opinion in microbiology.* 1999;2(1):99-103.
133. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Reviews of infectious diseases.* 1985;7(3):404-18.
134. Weinrauch Y, Foreman A, Shu C, Zarembek K, Levy O, Elsbach P, et al. Extracellular accumulation of potentially microbicidal bactericidal/permeability-increasing protein and p15s in an evolving sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate. *The Journal of clinical investigation.* 1995;95(4):1916-24.
135. Weinrauch Y, Katz SS, Munford RS, Elsbach P, Weiss J. Deacylation of purified lipopolysaccharides by cellular and extracellular components of a sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate. *Infection and immunity.* 1999;67(7):3376-82.
136. Katz SS, Weinrauch Y, Munford RS, Elsbach P, Weiss J. Deacylation of lipopolysaccharide in whole *Escherichia coli* during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(51):36579-84.
137. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology.* 2001;2(4):361-7.
138. Mannion BA, Weiss J, Elsbach P. Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation.* 1990;85(3):853-60.

139. Marra MN, Wilde C, Collins M, Snable J, Thornton M, Scott R. The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *The Journal of Immunology*. 1992;148(2):532-7.
140. Marra MN, Wilde C, Griffith J, Snable J, Scott R. Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *The Journal of Immunology*. 1990;144(2):662-6.
141. Heumann D, Gallay P, Betz-Corradin S, Barras C, Baumgartner J-D, Glauser MP. Competition between bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide-binding protein for lipopolysaccharide binding to monocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;167(6):1351-7.
142. Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N-and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(20):10973-8.
143. Schultz H, Hume J, Gioannini TL, Weiss JP. A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2007;179(4):2477-84.
144. Eckert M, Wittmann I, Röllinghoff M, Gessner A, Schnare M. Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β -dependent pathways. *The Journal of Immunology*. 2006;176(1):522-8.
145. Elsbach P, Weiss J, Levy O. Integration of antimicrobial host defenses: role of the bactericidal/permeability-increasing protein. *Trends in microbiology*. 1994;2(9):324-8.
146. Levy O, Ooi CE, Weiss J, Lehrer RI, Elsbach P. Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *Escherichia coli*. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(2):672-82.
147. Van Der Schaft DW, Toebes EA, Haseman JR, Mayo KH, Griffioen AW. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000;96(1):176-81.
148. WJ van der Schaft D, Wagstaff J, Mayo KH, Griffioen AW. The antiangiogenic properties of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). *Annals of medicine*. 2002;34(1):19-27.
149. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science*. 1997;276(5320):1861-4.
150. Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(3):649-55.
151. Abrahamson SL, Wu H-M, Williams RE, Der K, Ottah N, Little R, et al. Biochemical characterization of recombinant fusions of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein Implications in biological activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(4):2149-55.
152. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *Journal of leukocyte biology*. 1998;64(1):25-32.
153. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current opinion in immunology*. 1999;11(1):19-22.
154. Gioannini T, Teghanemt A, Zhang D, Levis E, Weiss J. Monomeric endotoxin: protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. *Journal of endotoxin research*. 2005;11(2):117-23.
155. Prohinar P, Re F, Widstrom R, Zhang D, Teghanemt A, Weiss JP, et al. Specific high affinity interactions of monomeric endotoxin- protein complexes with Toll-like receptor 4 ectodomain. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(2):1010-7.

156. Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(30):18682-5.
157. Gazzano-Santoro H, Mészáros K, Birr C, Carroll SF, Theofan G, Horwitz AH, et al. Competition between rBPI23, a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and gram-negative bacteria. *Infection and immunity*. 1994;62(4):1185-91.
158. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta odontologica scandinavica*. 1964;22(1):121-35.
159. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta odontologica scandinavica*. 1963;21(6):533-51.
160. Joss A, Adler R, Lang NP. Bleeding on probing. A parameter for monitoring periodontal conditions in clinical practice. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(6):402-8.
161. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;694(1):72-7.
162. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods*. 2007;39(2):175-91.
163. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997;14(1):9-11.
164. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of dentistry*. 2004;32(7):511-20.
165. Cullinan MP, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontology 2000*. 2013;62(1):271-86.
166. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008;79:1527-34.
167. Burt B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2005;76(8):1406-19.
168. Luzzi LIT, Greggi SLA, Passanezi E, Sant'Ana ACP, Lauris JRP, Cestari TM. Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers. *Journal of Applied Oral Science*. 2007;15(6):512-7.
169. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *Journal of periodontology*. 2000;71(12):1874-81.
170. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. *Journal of periodontology*. 2000;71(5):743-51.
171. Carson SJ, Burns J. Impact of smoking on tooth loss in adults. *Evidence-based dentistry*. 2016;17(3):73-4.
172. Renvert S, Persson RE, Persson GR. Tooth loss and periodontitis in older individuals: results from the Swedish National Study on Aging and Care. *Journal of Periodontology*. 2013;84(8):1134-44.
173. Malamud D. Salivary diagnostics: the future is now. *The Journal of the American Dental Association*. 2006;137(3):284.
174. Ghallab NA. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*. 2018;87:115-24.
175. Tobón-Arroyave S, Jaramillo-González P, Isaza-Guzmán D. Correlation between salivary IL-1 β levels and periodontal clinical status. *Archives of oral biology*. 2008;53(4):346-52.

176. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Critical Reviews in oral biology & medicine*. 2002;13(2):197-212.
177. Ng PYB, Donley M, Hausmann E, Hutson AD, Rossomando EF, Scannapieco FA. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;49(2):252-60.
178. Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka M, Maeda K, Kataoka K, Nakayama K, et al. Association between passive smoking and salivary markers related to periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(10):717-23.
179. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, Elio F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica chimica acta*. 2007;383(1-2):30-40.
180. Principe S, Hui ABY, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: Implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1608-23.
181. Jaedicke KM, Taylor JJ, Preshaw PM. Validation and quality control of ELISAs for the use with human saliva samples. *Journal of immunological methods*. 2012;377(1-2):62-5.
182. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1535-45.
183. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1991;62(8):504-9.
184. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 β concentration of gingival crevicular fluid. *Journal of periodontology*. 1994;65(5):423-8.
185. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontology 2000*. 2002;30(1):70-8.
186. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of periodontal research*. 2006;41(5):361-73.
187. Tietze K, Dalpke A, Morath S, Mutters R, Heeg K, Nonnenmacher C. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of periodontal research*. 2006;41(5):447-54.
188. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(3):379-414.
189. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(24):21129-35.
190. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
191. Tobias PS, Mathison J, Ulevitch R. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(27):13479-81.
192. Marra MN, Thornton MB, Snable JL, Wilde CG, Scott RW. Endotoxin-binding and-neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. *Critical care medicine*. 1994;22(4):559-65.
193. Eroğlu K. İnflamatuar Barsak Hastalıklarında Aktif ve Remisyon Dönemlerinde Bakteriyel Permeabilite Artırıcı Protein (BPI) Düzeyinin Araştırılması [Uzmanlık Tezi]: Marmara Üniversitesi; 2015.
194. Xingyuan C, Chen Q. Serum BPI as a novel biomarker in asthma. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2020;16(1):1-7.
195. Bülow S, Zeller L, Werner M, Toelge M, Holzinger J, Entzian C, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein is an enhancer of bacterial lipoprotein recognition. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2768.

196. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *Journal of molecular medicine*. 2005;83(8):587-95.
197. Miyasaki KT, Lehrer RI. β -sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *International journal of antimicrobial agents*. 1998;9(4):269-80.
198. Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, et al. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α -defensins. *The Journal of Immunology*. 2009;183(3):2122-32.
199. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology*. 1993;11(1):105-28.
200. McKay M, Olson E, Hesla M, Panyutich A, Ganz T, Perkins S, et al. Immunomagnetic recovery of human neutrophil defensins from the human gingival crevice. *Oral microbiology and immunology*. 1999;14(3):190-3.
201. Dale B, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *Journal of oral pathology & medicine*. 2001;30(6):321-7.
202. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra P, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral microbiology and immunology*. 2008;23(4):328-35.
203. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2009;80(6):969-76.
204. Türkoğlu O, Emingil G, Kütükçüler N, Atilla G. Evaluation of gingival crevicular fluid adrenomedullin and human neutrophil peptide 1–3 levels of patients with different periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):284-91.
205. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GCN, Cortelli SC, Cortelli JR. Human β -defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Archives of oral biology*. 2012;57(12):1609-14.

EKLER

EK-1 Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu

EK-2 Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu



**ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:**a. Araştırmanın Adı:**

Periodontal açıdan sağlıklı ve periodontal hastalığa sahip bireylerde tükürük BPI (Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein) ve İnterlökin-1Beta (İL-1b) düzeylerinin değerlendirilmesi.

b. Araştırmanın İçeriği:

Çalışmaya katılan hastalara, kliniğimizde uygulanan rutin muayene yöntemleri uygulanacaktır. Herhangi bir invaziv işlem uygulanmayacaktır. Çalışmaya dahil edilen her bireyden toplam 4-5 mL tükürük boş bir tükürük toplama kabında biriktirilip, pasteur pipetler yardımıyla eppendorf tüplerine aktarılacaktır. Bireylerden tükürük toplanmasından önce son 1 saat içerisinde dişlerini fırçalamamaları ve herhangi bir şey yiyip içmemeleri istenecektir. Örnekler sabah 08:30-09:30 saatleri arasında toplanacaktır. Alınan tükürük örnekleri işlem görene kadar -80 °C'de muhafaza edilecektir. Tükürük örnekleri çözdürüldükten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilecektir. Tükürük BPI (Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein) ve İnterlökin-1Beta (İL-1b) miktarlarının tayini ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle yapılacaktır. Bu amaçla BPI ve İnterlökin-1Beta standart ELİSA kitleleri kullanılacaktır. Bunlar daha sonra laboratuvar ortamında değerlendirilecektir.

c. Araştırmanın Amacı:

BPI (Bakterisidal Geçirgenlik Arttırıcı Protein) ve İnterlökin-1Beta'nın (İL-1b) periodontal hastalıkların teşhisi ve tedavisi için bir öneme sahip olabileceğinin değerlendirilmesi.

d. Araştırmanın Nedeni:

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi:

18 AY

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı:

Araştırma 50 kişi çalışma grubu, 50 kişi kontrol grubu olmak üzere toplam 100 kişi ile gerçekleştirilecektir.

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

Araştırmada herhangi bir deneysel method ya da işlem kullanılmayacaktır.



6

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Araştırma hasta ile ilgili herhangi bir risk taşımamaktadır. Araştırmada hastalık teşhisi için Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne gelen her hastaya yapılan rutin muayene işlemleri uygulanacaktır. Buna ek olarak hastalardan tükürük örnekleri alınacaktır. Mevcut araştırma hastaya yönelik rutin teşhis yöntemleri ve tükürük örneği alma dışında başka bir tedavi ya da işlem içermemektedir.

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Gönüllüler, hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunacaklardır. Hastalığın etiolojisinin aydınlatılması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Mustafa Burak DEMİRCİ

5. Zararların Karşlanması:

Araştırma hasta ile ilgili herhangi bir risk taşımamaktadır. Araştırmada hastalık teşhisi için Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne gelen her hastaya yapılan rutin muayene işlemleri uygulanacaktır. Buna ek olarak hastalardan non invaziv olarak tükürük örnekleri alınacaktır. Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımın Özlem Daltaban tarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermesiz istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.
- Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.



6

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:



6

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: Mustafa Burak DEMİRÇİ

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

EK-3 Hasta Anamnez ve Periodontal İndeks Formu

Ad – Soyad:

Yaş:

Telefon:

Teşhis:

Sistemik hastalık:

Tedavi süresi:

Aile hikayesi:

Sigara:

Periodontal tedavi:

Fırçalama:

Arayüz temizliği:

ÜST	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
PI														
CD														
GI														
DÇ														

ALT	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
PI														
CD														
GI														
DÇ														