

**PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA TÜMÖR NEKROZ  
FAKTÖR ALFA (TNF- $\alpha$ ) VE LENFOTOKSİN ALFA (LT- $\alpha$ )  
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA  
(TNF- $\alpha$ ) AND LYMPHOTOXIN ALPHA (LT- $\alpha$ ) GENE  
POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS**

**SELİN ÖZKAN**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

:

Prof. Dr. Erol Aksöz

Üye (Danışman)

:

Prof. Dr. Sibel Sümer

Üye

:

Prof. Dr. Alev AKALIN

Üye

:

Prof. Dr. Ay Ögüş

Üye

:

Doç. Dr. Hatice Mergen

ONAY

Bu tez ...../...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil Denizli  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Sevgi ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen,  
hayattaki en değerli varlıklarım,*

*Canım anneme ve canım babama...*

# PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA TÜMÖR NEKRÖZ FAKTÖR ALFA (TNF- $\alpha$ ) VE LENFOTOKSİN ALFA (LT- $\alpha$ ) GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ

Selin Özkan

## ÖZ

Periodontal doku hasarı mekanizmalarında, çeşitli sitokinleri de içeren birçok düzenleyicinin rol aldığı bilinmektedir. Tümör nekroz faktör (TNF), en önemli mediyatörlerden biridir. Periodontitis patogeneziyle ilişkili olarak TNF, tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve lenfotoksin alfa (LT- $\alpha$ , eski adıyla TNF- $\beta$ ) olmak üzere iki ilişkili proteini ifade etmektedir. Bu çalışmada, LT- $\alpha$  +252 intron ve TNF- $\alpha$  -308 promotor polimorfizmlerine ait genotip frekansları Türk popülasyonunda değerlendirilmiştir.

Çalışma, 109 kronik periodontitis (KP), 115 agresif periodontitis (AP) olmak üzere toplam 224 periodontitis hastası ve 85 sağlıklı kontrol bireyi üzerinden yürütülmüştür. Bireylerden kan örnekleri alınmış ve +4°C' de saklanmıştır. Kan örneklerinden genomik DNA izole edilmiş ve özgül DNA bölgeleri PZR metodu kullanılarak çoğaltılmıştır. Ardından, TNF -308 G  $\rightarrow$ A ve LT +252 A $\rightarrow$ G gen polimorfizmleri RFLP ile tespit edilmiştir.

LT +252A/G gen polimorfizmi gözlenme sıklığı, kronik periodontitis hastalarında % 8.3, agresif periodontitis hastalarında % 4.3 ve sağlıklı örneklerde % 7.1 olarak belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  geninin polimorfik alleli sadece bir hastada tespit edilmiştir. Bu çalışmada, TNF- $\alpha$  -308AA genotipinin frekansı % 0.9' dur. Yapılan istatistiksel analizlere göre, Türk popülasyonunda LT +252 polimorfizmi açısından hasta ve kontrol gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken; TNF- $\alpha$  -308 GA genotipi ve periodontitis arasında önemli bir ilişki belirlenmiştir (p=0,001). Ayrıca kontrol, KP ve AP grupları arasında, A alleli frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tümör nekroz faktör alfa, lenfotoksin alfa, TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$ , periodontitis

**Danışman:** Prof.Dr. Sibel Sümer, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

# INVESTIGATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- $\alpha$ ) AND LYMPHOTOXIN ALPHA (LT- $\alpha$ ) GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS

Selin Özkan

## ABSTRACT

It is known that a number of mediators are involved in periodontal tissue destruction mechanisms, including a variety of cytokines. Tumor necrosis factor (TNF) is one of the most important mediators. TNF indicates two related proteins in the pathogenesis of periodontitis, which are tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , formerly TNF- $\beta$ ). In the present study, the individual frequency of LT- $\alpha$  +252 intron and TNF- $\alpha$  -308 promoter polymorphisms associated with periodontitis were evaluated in Turkish population.

This research was carried out with 109 chronic periodontitis (CP), 115 aggressive periodontitis (AP) totally 224 periodontitis patients and 85 healthy controls. Blood samples were collected from individuals and stored at +4°C. Genomic DNA was isolated from samples and specific DNA regions were amplified by using PCR method. Then TNF -308 G  $\rightarrow$ A and LT +252 A $\rightarrow$ G gene polymorphisms were determined by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

LT- $\alpha$  +252A/G gene polymorphism has been determined as 8.3 % in chronic periodontitis patients, 4.3 % in aggressive periodontitis patients and 7.1 % in healthy subjects. Polymorphic allele of TNF- $\alpha$  gene was detected in only one patient. In this study, the frequency of TNF- $\alpha$  -308AA genotype was 0.9 %. By the statistical analysis, while there was no statistically significant difference in LT +252 polymorphism between patients and control subjects in Turkish population, a significant association between TNF- $\alpha$  -308 GA genotype and periodontitis was determined. It has been observed that the differences of allele A frequency between control, CP and AP groups are statistically significant.

**Key words:** Tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin alpha, TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$ , periodontitis

**Advisor:** Prof.Dr. Sibel Sümer, Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Molecular Biology Section

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sibel Sümer' e,

Projenin hazırlanması ve hastaların bulunmasında emeği geçen, ayrıca kan örneklerinin temin edilmesini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Alev Akalın' a ve Sayın Öğr.Gör.Dr. Güliz N. Güncü'ye, Karadeniz Teknik Üniversitesi Periodontoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Esra Baltacıoğlu' na,

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma ve başta Arş.Gör. Ayşegül Güzel olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmam süresince, her ihtiyacım olduğunda gerek bilgi ve tecrübeleriyle, gerek yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili hocam Sibel Ünlü' ye ve yardımlarından dolayı Arş.Gör.Dr. Çağatay Karaaslan' a ve Arş.Gör. Emel Sağlar' a,

Laboratuar olanaklarından faydalanmamı sağlayan ve bana her konuda yardımcı olan Arş.Gör.Dilek Kaya, Arş.Gör.Emine Korkmaz ve Arş.Gör. Hanife Tanır' a,

Tez çalışmamda ve hayatımın her aşamasında desteğini bir an olsun benden esirgemeyen dostum Gözde Işık' a ve her zaman yanımda olan sevgili dostlarıma,

Ve her şeyden önemlisi çalışmalarım süresince büyük bir özveri ile beni destekleyen ve her zaman yanımda olan çok sevgili aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Periodontitis .....	3
2.2. Periodontitis'in Sınıflandırılması .....	5
2.2.1. Agresif Periodontitis .....	5
2.2.2. Kronik Periodontitis .....	6
2.3. Periodontitis ve Bakteriyel Etmenler.....	6
2.4. Periodontitis ve Sitokinlerin İlişkisi.....	9
2.4.1. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- $\alpha$ ) ve Lenfotoksin Alfa (LT- $\alpha$ ).....	12
2.4.1.1. Periodontitis ve TNF- $\alpha$ İlişkisi.....	17
2.4.1.2. Periodontitis ve LT- $\alpha$ İlişkisi.....	18
2.5. Periodontitis ve Genetik .....	20
2.5.1. Tümör Nekroz Faktör ve Lenfotoksin Gen Polimorfizmlerinin Periodontitis ile İlişkisi.....	26
2.6. Çalışmanın Amacı .....	31
3. MATERYAL VE METOT .....	33
3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi .....	33
3.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu .....	33
3.3. İzole Edilen DNA' nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü.....	34
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	35
3.4.1. TNF- $\alpha$ -308 Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması .....	36

3.4.2. LT- $\alpha$ +252 Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması.....	38
3.4.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	40
3.4.3.1. TNF- $\alpha$ PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	40
3.4.3.2. LT- $\alpha$ PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü .....	40
3.5. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) ile Belirlenmesi .....	40
3.5.1. TNF- $\alpha$ -308 G/A Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi ..	41
3.5.2. LT- $\alpha$ +252 A/G Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi ....	41
3.6. İstatistiksel Analizler .....	42
4. SONUÇLAR.....	43
4.1. PCR Sonuçları.....	43
4.1.1. TNF- $\alpha$ Geni PZR Sonuçları .....	43
4.1.2. LT- $\alpha$ Geni PZR Sonuçları.....	43
4.2. RFLP Sonuçları .....	44
4.2.1. TNF- $\alpha$ (-308) Promotor Bölgesinin <i>NcoI</i> Enzimi ile Kesim Sonuçları ....	44
4.2.2. LT- $\alpha$ (+252) İntron Bölgesinin <i>NcoI</i> Enzimi ile Kesim Sonuçları .....	47
4.3. Sonuçların İstatistiksel Analizi .....	49
5. TARTIŞMA .....	55
6. KAYNAKLAR .....	60
EK 1 ETİK KURUL İZİNİ .....	73
ÖZGEÇMİŞ .....	75

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Sağlıklı dişetleri ve periodontitisli dişetlerinin görünümü.....	3
Şekil 2.2. Sağlıklı ve periodontitisli dişin genel görünümü .....	4
Şekil 2.3. LPS'nin CD14 yolu ile makrofaj aktivasyonu .....	7
Şekil 2.4. Bağışıklık cevabı ile aktive olan sitokinlerin açığa çıkması sonucu bağ dokusu degradasyonu ve kemik kaybının şema olarak gösterilmesi .....	11
Şekil 2.5. LT- $\alpha$ ile TNF reseptörünün oluşturduğu kompleks yapının ve rezidular arasındaki iletişimin şematik gösterimi .....	14
Şekil 2.6. TNF proteininin genel yapısı .....	15
Şekil 2.7. Lenfotoksin ve tümör nekroz faktör proteinlerinin trimer yapıları .....	16
Şekil 2.8. Periodontal hastalığın başlıca etmenleri .....	22
Şekil 2.9. TNF geni üzerindeki polimorfik bölgeler.....	26
Şekil 2.10. İnsana ait TNF $\alpha$ genin dizisi. ....	27
Şekil 2.11. İnsana ait LT $\alpha$ genin dizisi. ....	28
Şekil 2.12. TNF ve LTA genlerinin HLA lokusu üzerindeki genel yerleşimi, TNF- $\alpha$ geni üzerinde yer alan polimorfizmlerin ve LT- $\alpha$ genine ait polimorfik bölgelerin gösterimi .....	30
Şekil 2.13. TNF- $\alpha$ ve TNF- $\beta$ genlerinin promotor bölgelerinin karşılaştırılması. ....	31
Şekil 3.1. TNF- $\alpha$ gen dizisi üzerinde ileri - geri primerlerin ve çoğaltılan 117 baz çiftlik bölgenin gösterimi. ....	36
Şekil 3.2. LT- $\alpha$ geninin promotor bölgesini, ilk intronunu ve ekzonlarını içeren nükleotit sekansı.....	38
Şekil 4.1. TNF- $\alpha$ promotor -308 bölgesindeki polimorfizmi içeren 117 baz çiftlik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. ....	43
Şekil 4.2. LT- $\alpha$ intron +252 bölgesindeki polimorfizmi içeren 368 baz çiftlik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi. ....	43

Şekil 4.3. TNF- $\alpha$ (-308) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu 158-167 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. ....	44
Şekil 4.4. TNF- $\alpha$ (-308) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu 218-227 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. ....	45
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait 21-30 numaralı bireylerin TNF- $\alpha$ (-308) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. ....	45
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait 41-50 numaralı bireylerin TNF- $\alpha$ (-308) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. ....	46
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait K68-K77 numaralı bireylerin LT- $\alpha$ (+252) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. ....	47
Şekil 4.8. Hasta grubuna ait 14-32 numaralı bireylerin LT- $\alpha$ (+252) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü..	48
Şekil 4.9. Hasta grubuna ait 208-225 numaralı bireylerin LT- $\alpha$ (+252) bölgesinin <i>NcoI</i> enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü .....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Periodontitis olası risk faktörleri olarak araştırılan aday genlerin ve kodladıkları proteinlerin özeti .....	23
Çizelge 2.2. Farklı populasyonlarda TNF- $\alpha$ ve LT- $\alpha$ gen polimorfizmlerinin dağılımı .....	24
Çizelge 3.1. TNF- $\alpha$ (-308) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.....	37
Çizelge 3.2. LT- $\alpha$ (+252) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.....	39
Çizelge 4.1. TNF- $\alpha$ (-308) gen bölgesi RFLP sonuçlarının hasta ve kontrol gruplarındaki sayı ve yüzde dağılımı .....	46
Çizelge 4.2. LT- $\alpha$ (+252) gen bölgesi RFLP sonuçlarının kontrol, AP ve KP gruplarındaki sayı ve yüzdeleri .....	49
Çizelge 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması .....	49
Çizelge 4.4. Kontrol ve AP gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması .....	50
Çizelge 4.5. Kontrol ve KP gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması .....	50
Çizelge 4.6. Kontrol ve AP gruplarının yaşa göre değerlendirilmesi.....	51
Çizelge 4.7. Kontrol ve KP gruplarının yaşa göre değerlendirilmesi.....	51
Çizelge 4.8. TNF- $\alpha$ ve LT- $\alpha$ genotiplerinin ve alel frekanslarının kontrol ve AP grupları arasında değerlendirilmesi .....	52
Çizelge 4.9. TNF- $\alpha$ ve LT- $\alpha$ genotiplerinin ve alel frekanslarının kontrol ve KP grupları arasında değerlendirilmesi .....	53
Çizelge 4.10. TNF- $\alpha$ (-308) genotiplerinin ve alel frekanslarının KP ve AP hastalarında karşılaştırılması.....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AP	Agresif periodontitis
bç	Baz çifti
bp	Baz çifti (Base pair)
C	Sitozin
CD14	Farklılaşma kümeleri 14 (Cluster of differentiation 14)
CD4 Th1	T lenfositleri tarafından salgılanan CD4 hücreleri
COX	Siklooksijenaz (Cyclooxygenase)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
ECM	Hücre dışı matriks (Extracellular matrix)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim ilintili immün test (Enzyme linked immunosorbent assay)
FAM5C	Family with sequence similarity 5, member C
G	Guanin
Gram (-)	Gram negatif
Gram (+)	Gram pozitif
HLA	İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)
JIA	Juvenile Idiopathic Arthritis
IFN- $\gamma$	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin-1
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1-beta
IL-6	İnterlökin-6

kDa	Kilo dalton
KP	Kronik periodontitis
LBP	Lipopolisakkarit bağlayıcı protein
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lenfotoksin alfa geni
LT- $\alpha$	Lenfotoksin alfa
M	Belirteç (marker)
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	milimolar
MMP	Matriksmetalloproteinaz
mRNA	Elçi RNA (messenger RNA)
mTNF	Membrana bağlı tümör nekroz faktör
nm	Nanometre
PAF	Platelet aktivasyon faktörü
PDL	Periodontal ligament
PG-E2	Prostoglandin-E2
pmol	pikomol
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
p55	Tip-I tümör nekroz faktör reseptörü
p75	Tip-II tümör nekroz faktör reseptörü

RA	Rheumatoid arthritis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotit polymorphism)
sTNF	Çözünebilir tümör nekroz faktör (soluble tumor necrosis factor)
T	Timin
TACE	TNF dönüştürücü enzim (TNF- $\alpha$ converting enzyme)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- $\beta$	Dönüştürücü büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta)
TLR4	Toll benzeri reseptör-4 (Toll-like reseptör-4)
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFA	Tümör nekroz faktör alfa geni
TNFR1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TNFR2	Tümör nekroz faktör reseptörü-2
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör alfa
TNF- $\beta$	Tümör nekroz faktör beta
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
U	Ünite
u-PA	Serin proteaz urokinaz tipi plasminojen aktivatörü
V	Volt
$\mu$ l	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, risk taşıyan kişilerde ağızdaki patojenlere karşı geliştirilen geniş spektrumlu bağışıklık cevabı ve yıkıcı etkileri içermektedir (Galbraith et al., 1999). Çok yaygın olan ve ortaya çıkması yetersiz ağız temizliği ve diş plağı birikimi ile doğrudan bağlantılı olan gingivitisin aksine, periodontitis genetik kalıtım başta olmak üzere birçok faktörden etkilenen ve dişin destekleyici dokularının geri dönüşümsüz kaybı ile sonuçlanan ciddi bir hastalıktır (Hassel and Harris, 1995; Kinane,2001). Günümüzde dünya popülasyonunun yaklaşık %15' i, periodontitis açısından yüksek risk grubu içerisinde nitelendirilmektedir (Kinane et al., 1999).

Diş eti florasında patojenik bakteri varlığında, konakçının savunma mekanizması uyarılmakta ve bağışıklık cevabı ortaya çıkmaktadır. Periodontal hastalığın patojenezini anlayabilmek için sadece konakçı bağışıklık cevabı ve ağız bakterileri arasındaki dinamiğe ilişkin detaylı bilgiye sahip olmak yeterli olmamaktadır (Yoshie et al., 2007). Periodontal patojenler ürettikleri çeşitli enzimler ve toksinlerle yangıyı başlatabilmekte ve dolaylı olarak dokuya hasar verebilmektedirler (Darveau et al., 1997). Fakat tek başına bakteri bulunması periodontal yıkım için bir sebep değildir (Yoshie et al., 2007). Bakteriyel risk faktörleri dışında, yaş, sosyoekonomik durum, sigara kullanımı, sistemik hastalıklar ve genetik risk faktörleri de hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde etkili etmenlerdir (Albandar et al., 1999; Bergström, 1989; Genco, 1996; Michalowicz, 1994; Heitz-Mayfield, 2005; Van Dyke and Dave, 2005). Bu nedenle periodontitis, multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Offenbacher, 1996; Hart and Kornman, 1997).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve lenfotoksin alfa (LT- $\alpha$ , eski adıyla TNF- $\beta$ ), çeşitli hücrese cevaplara etkisi olan ve bağışıklık cevabında karmaşık roller üstlenen iki önemli sitokindir (Posch et al., 2003). TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  proteinleri yapısal olarak ve biyolojik işlevleri açısından benzerlik göstermekte ve sırasıyla makrofajlardan ve T hücrelerinden salınmaktadırlar (Vassalli, 1992). Bu iki protein 6. kromozom üzerinde birbiri ardına yerleşim göstermekte ve aynı reseptörlere bağlanarak biyolojik görevlerini gerçekleştirmektedirler (Nedwin et al., 1985).

TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  öncül yangısal sitokinlerin periodontitis ile ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar mevcuttur (Assuma et al., 1998; Galbraith et al., 1999; Fassmann et al., 2003). Bu sitokinlerin, doku yıkımını tetikleme ve kemik geri emilimine neden olma gibi önemli özellikleri olduğundan dolayı, periodontitis patojenezinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Fassmann et al., 2003). Periodontal hastalık varlığında, diş eti sıvısında ve periodontal dokularda bu sitokinlerin seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Roberts et al., 1997).

Genetik faktörlerin, periodontitise yatkınlık derecesini %50 oranında arttırdığı tahmin edilmektedir (Michalowicz et al., 1991). Son yıllarda yapılan çalışmalar, daha çok genetik belirteç olarak kullanılabilecek olan sitokinlerin kodlandığı genlere ait polimorfizmleri araştırma üzerine odaklanmıştır (Kornman&di Giovine, 1998; Kroeger et al., 2000). Gerek işlevleri gerekse genom üzerinde buldukları yüksek polimorfik özellik gösteren bölge açısından TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  gen polimorfizmlerinin periodontitis ile ilişkisinin açığa çıkarılması önem taşımaktadır.

Bu amaçla tez çalışmamızda, TNF- $\alpha$  geninin promotor -308 bölgesi ve LT- $\alpha$  geninin ilk intronunun +252 bölgesinde bulunduğu bilinen tek nükleotit polimorfizmleri ile periodontitis arasında bir ilişki olup olmadığı Türk popülasyonunu temsil eden bir örneklem üzerinden araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Periodontitis

Periodontitis, diş ve dişin destek dokularını etkileyen oldukça yaygın ve yıkıcı enfeksiyonel bir hastalıktır (Borch et al., 2010). Hastalık, dünya üzerindeki yetişkin popülasyonun %10-15'ini etkilemekte ve diş kayıplarının başlıca sebebi olarak nitelendirilmektedir (Albandar and Rams, 2002).

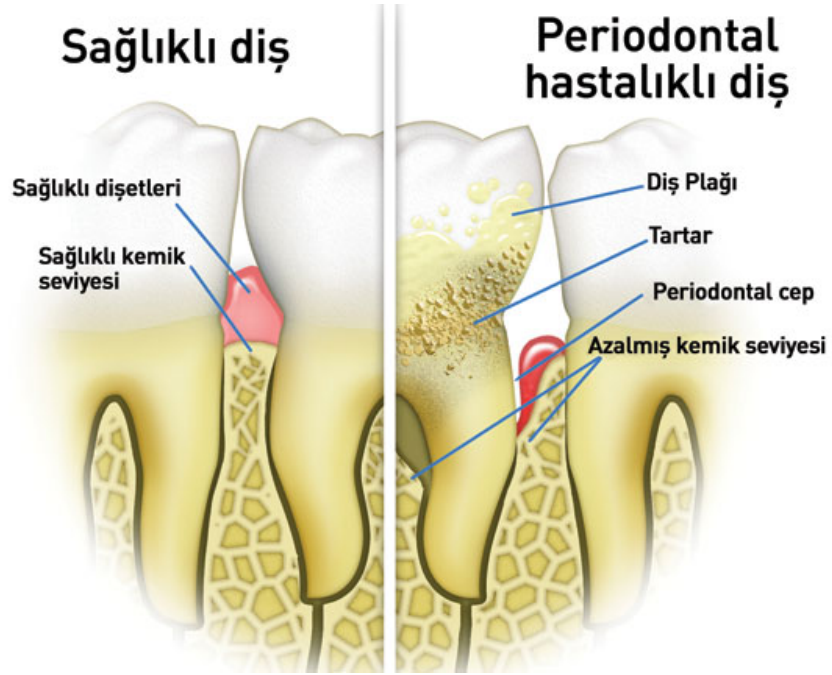
Periodontitis, doku yıkımını düzenleyen yangısal kaskadı (basamakları) indükleyen oral patojenler tarafından başlatılır (Graves and Cochran, 2003). Hastalığın etiolojisi biyofilmde bulunan anaerobik bakteriler, diş eti altında var olan diş plağı ve hastalığa yatkın bireylerde ortaya çıkan aşırı bağışıklık cevabından oluşur (D'Aiuto et al., 2004).

Diş eti hastalıkları genellikle diş etlerindeki kızarıklık ve kanama ile karakterize olan gingivitis (diş eti iltihabı) ile başlar. Gingivitis, çok yaygın olmasına rağmen, diş eti altındaki yapıları etkilemediği için periodontitis kadar ciddi bir hastalık değildir. Gingivitisin tetiklediği yangısal reaksiyon periodontal ligamentlere ve çene kemiğine kadar ilerler ve bu dokulara hasar verirse, hastalık periodontitis olarak adlandırılır. Bu süreçte, periodontal ligamentler zarar görür, çene kemiği yıkımı başlar ve diş etinin diş kökünden ayrılmaya başlamasıyla "periodontal cep" denilen oluşumlar gözlenir (Williams, 1990).



Şekil 2.1. Sağlıklı diş etleri ve periodontitisli diş etlerinin görünümü (www.totaldentistryonline.com)

Periodonsiyum, iki sert doku olan sement ve kemikten ve iki yumuşak doku olan periodontal ligament ve gingivadan (diş eti) oluşan bir organ sistemi olarak düşünülebilir. Bu yapıların her biri, özgül doku mimarileri ve karakteristik biyokimyasal bileşimleri olmasına rağmen, komşu yapıların hücresel aktivitelerini etkiler. Her periodontal yapının hücre dışı matriksi kollajen, elastin, fibronektin, laminin, büyüme faktörleri gibi fibröz ve proteoglikanlar, lipitler, mineraller, proteinler gibi fibröz olmayan elementler içerir (Bartold and Narayanan, 2006).



Şekil 2.2. Sağlıklı ve periodontitisli dişin genel görünümü (www.anadolusaglik.org).

Alveolar kemik kaybı, PDL (periodontal ligament) liflerinin tahribi, diş eti bağ dokusundaki kollajenin nicel ve nitel olarak değişime uğraması, epitel bağlantılarının yok olması, periodontal hastalığın ayırıcı özellikleridir (Delima et al., 2001).

## 2.2. Periodontitis'in Sınıflandırılması

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

Daha önceki sınıflamalar yaşa bağlı olarak gerçekleştirilmiş ve bugün "kronik periodontitis" olarak adlandırılan hastalık tipi yetişkin periodontitisi olarak; "agresif periodontitis" ise erken başlangıçlı periodontitis olarak nitelendirilmişti (Armitage, 1999). Bu sınıflamaya göre periodontitis çeşitleri üç ayrı klinik forma ayrılmıştır:

1. Agresif periodontitis
2. Kronik periodontitis
3. Sistemik hastalıklar ile birlikte gelişen periodontitis

### 2.2.1. Agresif Periodontitis

Daha çok otuz yaş altı bireylerde gözlenen ve hızlı tahribat ile karakterize olan periodontitis tipidir. Hastaların sistemik olarak sağlıklı bireyler olması, hızlı ataçman ve kemik kaybının gerçekleşmesi ve ailesel birikim göstermesi agresif periodontitisin ortak özellikleridir (Clerehugh, 2008).

Hastalığın seyrinde *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* bakterilerinin seviyesinde artış, fagositoz anomalileri ve prostaglandin E2 ve IL-1 $\beta$  üretiminde artış gözlenmiştir (Wiebe and Putnins, 2000).

Agresif periodontitisin, generalize ve lokalize olarak adlandırılan iki alt grubu mevcuttur. Lokalize agresif periodontitiste, hastalık belirtileri büyük azı ve kesici dişlerde ve puberte döneminde başlangıç gösterir. Generalize agresif periodontitis ise, lokalize tipte tutulan dişler dışında kalan daimi dişlerin en az üç tanesini etkileyen ve genelde 30 yaş altı bireylerde görülen agresif periodontitis tipidir (Novak, 2002).

### 2.2.2. Kronik Periodontitis

Genellikle erişkinlerde görülmesine rağmen, kronik plak ve diş taşı birikimine bağlı olarak çocuklarda ve adölesan dönemde bulunan gençlerde de görülebilen, bağ dokusu kaybı ile karakterize edilen ve yavaş ilerleyen periodontitis çeşididir (Clerehugh, 2008).

Hastalık, 1-2 mm ataçman kaybı mevcut ise hafif, 3-4 mm ataçman kaybı mevcut ise orta ve 5 mm'den fazla kayıp varsa şiddetli olarak nitelendirilir (Wiebe and Putnins, 2000).

Diş ve dişin destek dokularında bakteri tutunmasına imkan verebilecek bölgesel risk faktörlerinin ya da sigara kullanımı ve şeker hastalığı gibi sistemik risk faktörlerinin bulunması sonucu kronik periodontitisin ilerleme hızı değişmektedir. (Clerehugh, 2008).

Hamlet ve arkadaşlarının (2004) üç yıllık bir süreçte ergin bireyler üzerinde yaptığı çalışmada, subgingival plakta bulunan genel kabul görmüş bakteriyel patojenlerin yanı sıra *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) adlı türün de sağlıklı bölgeleri hastalıklıya dönüştürdüğü ve doku kaybı açısından hastalıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (Hamlet et al., 2004).

### 2.3. Periodontitis ve Bakteriyel Patojenler

Periodontal hastalıklar, bakteriyel plaktaki mikroorganizmalara ve onların ürünlerine oluşturulan immün cevap ile karakterize olan, bakteriyel kökenli kompleks bir enfeksiyonel hastalıktır (Bascones-Martinez et al., 2009). Periodontal hastalık ve endodontik kökenli lezyonlar, yumuşak doku hasarı ve kemik yıkımına neden olan oral patojenler tarafından başlatılır (Graves et al., 2001). Hastalığın başlaması için bakteriyel plak gerekli olmasına rağmen, plak miktarı ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki görülmemektedir (Yoshie et al., 2005).

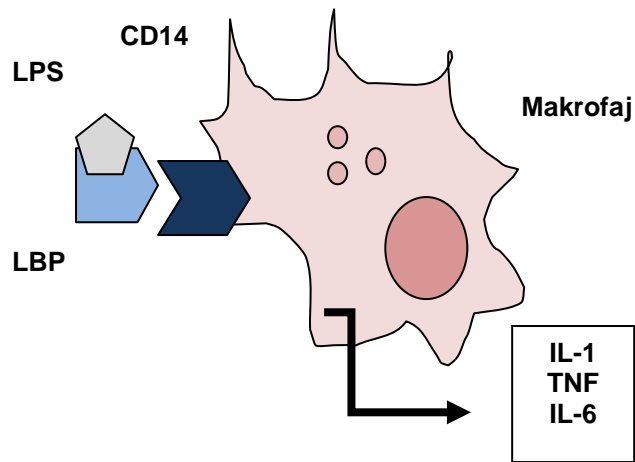
Ağız, vücudun diğer dış yüzeylerinde olduğu gibi konakla simbiyoz yaşayabilen temel bir mikrofloraya sahiptir. Ağız florasında çok çeşitli aerobik ve anaerobik bakteri türleri yaşamakta ve diş yüzeyinde bireysel ya da karışık koloniler oluşturmaktadırlar. Periodontal hastalıklar göz önüne alındığında ise, diş plağının

oluşumunda Gram (-) ve anaerobik bakterilerin varlığında bir artış gözlenmiştir (Pihlstrom et al., 2005).

Sağlıklı koşullar varlığında, bakteri yoğunluğu ve konağın direnci dengelenmiş durumdadır. Bu denge hali, bakteri sayısındaki artış ya da direnç düzeyindeki azalış nedeniyle bozulduğunda ise hastalık ortaya çıkar. İlk zamanlarda bu durum sadece tükürük salgısı ile sınırlıdır ve gingivitis olarak adlandırılır. Bozulan denge çevresel dokulara yayıldığında, bağ dokusuna zarar verdiğinde, cep formasyonu oluşumu, çene kemiği geri Emilimi, diş oynaması ve son olarak da kaybına neden olduğunda ise periodontitis olarak adlandırılır (Bascones-Martinez and Figureo-Ruiz, 2004).

Diş minesinde ya da sement duvarında kolonize olmuş mikroorganizmalar, doku hasarını üç farklı yol ile ortaya çıkarabilirler:

- i) konakçı hücreden bağımsız olarak, mikroorganizmaların otolizisi sonucu açığa çıkardıkları proteolitik enzimler nedeniyle degradasyon gerçekleşebilir,
- ii) LPS, toksinler ve enzimler gibi bazı mikrobiyal ürünler, yıkıcı enzimlerin ekspresyonundan sorumlu hücrelerin popülasyonunun artışına neden olabilir,
- iii) mikroorganizmalar, konakçı hücre tarafından geliştirilen immün cevap sonucu lenfosit ve makrofajlardan sitokinlerin salınmasına yol açabilirler (Birkedal-Hansen, 1993).



Şekil 2.3. LPS'nin CD14 yolu ile makrofaj aktivasyonu (Bascones-Martinez et al., 2009' dan esinlenerek şematize edilmiştir.)

Lipopolisakkarit (LPS), Gram (-) bakterilerin zarında bulunan ve lipit A, antijen O ve oligosakkaritin birbirine bağlanması sonucu oluşan bir virülans faktördür. LPS doğal immün cevabın güçlü bir aktivatörüdür. Bu işlevi bakteri ürünlerini tanıyan hücre yüzeyi proteinlerinden biri olan Toll-like reseptör 4 (TLR4) 'ü stimule ederek gerçekleştirir (Dixon et al., 2004).

Ağızda bulunan bakterilere ait LPS' nin, makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve osteoklastlar başta olmak üzere periodontal dokularda yer alan birçok hücre tipi üzerinde etkisi mevcuttur. Hepatositlerden sentezlenen LPS bağlayıcı protein (LBP), LPS' nin reseptörü olan makrofajlar üzerindeki ya da çözülmüş haldeki CD14'e bağlanmasını katalizler. Şekil 2.3' te şematize edildiği gibi, bağlanma sonucu aktive olan CD14 reseptörü, TLR4-bağımlı yolağı kullanarak monositleri ve endotel hücreleri öncül yangısal sitokinlerin salınmasını sağlamak üzere uyarır. İnterlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör (TNF), prostaglandin E2 (PG-E2) ve interlökin-6 (IL-6) gibi öncül sitokinlerin açığa çıkması sonucu, platelet aktivasyon faktörü (PAF) ve diğer prostaglandinler gibi ikincil yangısal sitokinlerin üretimi uyarılır (Bascones-Martinez et al., 2009).

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* ve *Tannerella forsythensis*, diş etinde bulunan en önemli ve en yaygın anaerobik Gram (-) bakterilerdir (Bascones-Martinez & Figureo-Ruiz, 2004).

Socransky (1998) ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *P. gingivalis* miktarının, periodontal doku kaybı görülen hastalarda ölçülebilir düzeyde olduğu ve hayvan modellerinde doku hasarına neden olduğu bulunmuştur (Socransky et al., 1998). Yapılan başka bir çalışmada ise, enfekte olmuş dişin kök kanallarından *P. gingivalis* izole edilmiştir (Baumgartner et al., 1999). Baker (1999) ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, varlığı periodontitise neden olduğu düşünülen siyah pigmentli Gram (-) ve anaerobik bir bakteri olan *P.gingivalis* tarafından üretilen indüklenen IL-1, TNF, IL-6, prostaglandin metabolitleri ve interferon gama gibi özgül düzenleyiciler sayesinde kemik kaybının gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Baker et al., 1999; Sandros et al., 2000).

*P.gingivalis* ile yapılan bir çalışmanın sonucunda, bu bakterinin *in vivo* şartlar altında fibroblast apoptozunu artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuç, TNF reseptörü eksikliği olan fareler üzerinde yapılan deneylerde, *P.gingivalis* nedenli fibroblast

apoptozunun önemli ölçüde azaldığı kanıtına dayandırılmış ve oluşan kemik kaybı ve doku hasarının bakterinin ürünlerinden ziyade konak kaynaklı bağışıklık cevap sayesinde olduğu bulunmuştur (Graves et al., 2001).

Polak ve arkadaşları (2009) tarafından hayvan modelleri üzerinde yapılan deneylerde, *Porphyromonas gingivalis*' in *Fusobacterium nucleatum* ile sinerjistik etkiye sahip olduğu ve *P.gingivalis* / *F.nucleatum* ile gerçekleşen çoklu mikrobiyal enfeksiyonun, tek başlarına gerçekleştirdiklerinden daha fazla miktarda çene kemiği (periodontal kemik) kaybına ve yangıya neden olduğu gösterilmiştir. (Polak et al., 2009; Kinane & Hajishengallis, 2009)

#### **2.4. Periodontitis ve Sitokinlerin İlişkisi**

Bağ dokusundaki lenfositler, yangısal hücreler ve diğer hücresel elemanlar arasındaki karmaşık iletişim sitokin adı verilen düşük moleküler ağırlıklı bir dizi molekül tarafından düzenlenmektedir (Carranza and Newman, 1996).

Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan çözülebilir proteinlerdir. Mikroplar ve diğer antijenlere karşı cevap olarak üretilirler ve farklı sitokin tipleri farklı tipte yangısal ve bağışık cevabın düzenlenmesini sağlarlar. (Abbas and Lichtman, 2005).

Sitokinler, haberci moleküller olarak rol oynar ve sinyalleri diğer hücrelere iletirler. Sitokinlerin, hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi, bağışıklık ve yangısal cevabın başlatılması ve sürdürülmesini de içeren birçok görevi vardır. Sitokinlerin salınımı ve fonksiyonlarının kontrolü oldukça karışıktır ve bu kontrol inhibitör ve reseptörler sayesinde gerçekleşir (Lindhe et al., 1998).

Sitokinler hücrede aktif halde depo edilmezler. Ancak hücresel bir aktivasyonla başlatılan gen transkripsiyonu sonucunda sentezlenirler. Sitokinlerin, diğer sitokinlerin sentez ve aktivitesini etkileme özellikleri mevcuttur. Bu özellik sonucu, bir sitokinin üretimi bir kaskada yol açar ve ikinci ve üçüncü sitokinlerin sentezi gerçekleşir. Öte yandan, sitokinin salınması ters etki yaratarak diğer sitokinin sentezini durdurabilir. Bu sayede içsel ve dışsal olarak sitokin sentezi kontrolü gerçekleşmiş olur (Abbas and Lichtman, 2005).

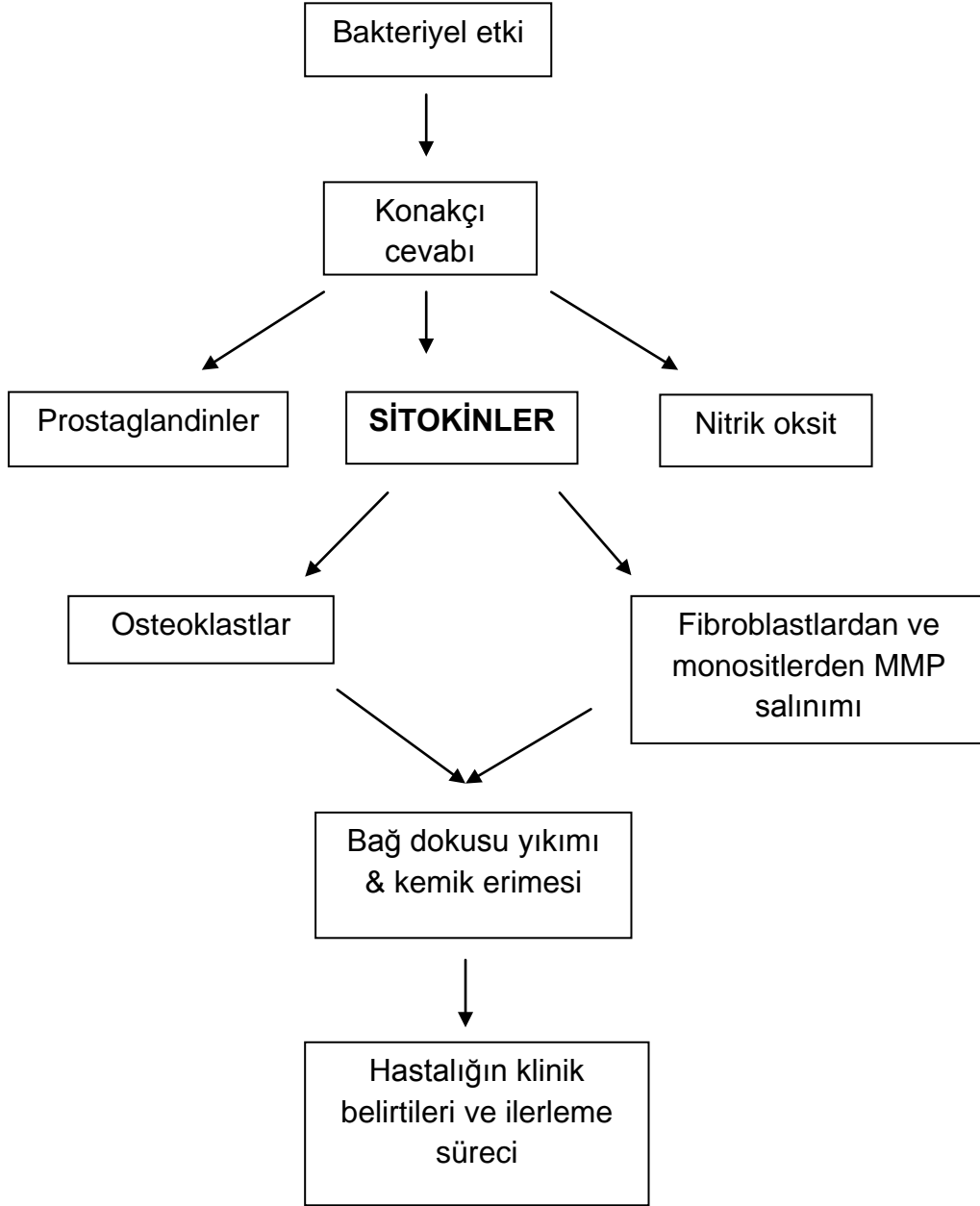
Sitokinler, birçok fizyolojik süreçte çok önemli görevlere sahip olmalarından ötürü, düzensiz bir şekilde ifade edildikleri durumlarda patolojiyi indüklerler. Hücre ölümü üzerine etkilerinden dolayı da aktiviteleri iyi kontrol edilmek zorundadır (Graves and Cochran, 2003).

İmmünolojik mekanizmaların periodontal hastalığın patojenezi üzerinde etkili olduğu, kabul edilmiş bir gerçektir (Seymour, 1987). Yapılan çeşitli çalışmalarda gingivitis ve periodontitis hastalarında, diş eti, diş eti oluşu sıvısı ve tükürkte, proinflamatuvar, antiinflamatuvar ve antifibrojenik sitokinlerin miktarında artış olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, bu moleküllerin bağışıklık fonksiyonunu düzenlediği ve ECM bileşenlerinin ve MMP'lerin üretimini regüle ederek doku hasarını etkilediğine inanılmaktadır. Bu etki direkt olarak ya da diğer sitokin ve büyüme faktörlerin üretimini indüklemeye yolu ile meydana gelebilir. Yangı meydana gelmiş bir diş etinde IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ , platelet kaynaklı büyüme faktörü ve prostoglandinlerin miktarları yangı hücrelerini, fibroblastları ve epitel hücrelerini etkiler (Bartold and Narayanan, 2006).

Doku hasarının oluşum mekanizmasına bakıldığında, farklı hücre tipleri tarafından üretilen çeşitli sitokinler dahil olmak üzere birçok düzenleyicinin ilgili olduğu görülmektedir. Bu sitokinler, lökositler ve endotel hücreler üzerindeki adezyon moleküllerini artırıcı yönde etki göstererek, lökositlerin damarların dışına çıkarak dokuya sızmalarına neden olur. İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi öncül sitokinlerin uyarılması, ikincil düzenleyicilerin üretilmesine yol açar. Bu sayede bağışıklık cevabı, bağ dokusu yıkımında ve kemik kaybında artış meydana gelir (Graves and Cochran, 2003).

Hastalıkta ismi geçen biyolojik moleküllerin çoğu, aslında temel olarak normal diş eti bağ dokusunda ve epitelde bulunmasına rağmen, ifade edilmeleri bakteriyel endotoksinlerle karşılaşmaları sonucunda artar. Bu durum yangısal süreçte neden fazla miktarda olduklarını açıklamaktadır (Bartold and Narayanan, 2006). Temel olarak görevleri konak cevabı korumaya yönelik olan bu moleküller, cevabın az ya da çok olmasına bağlı olarak doku hasarı meydana gelmesine neden olurlar (Pihlstrom et al., 2005).

Bakteriyel etkiye karşı oluşturulan bağışıklık cevabı ile başlayan ve sitokinlerin açığa çıkması sonucu ortaya çıkan doku hasarı mekanizmasının özeti Şekil 2.4' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Bağışıklık cevabı ile aktive olan sitokinlerin açığa çıkması sonucu bağ dokusu yıkımı ve kemik kaybının şematik olarak gösterilmesi (Bartold and Narayanan, 2006' dan esinlenerek şematize edilmiştir).

#### 2.4.1. Tümör Nekroz Faktör Alfa ve Lenfotoksin Alfa

Tümör nekroz faktör (TNF), bilim dünyasında birçok keşifte yaşandığı gibi şans eseri gözlemler sonucu bulunmuştur. Yaklaşık bir yüzyıl öncesinde, Bruner bazı kanser hastaları üzerinde yaptığı gözlemler sonucunda, akut bakteriyel enfeksiyon sonrasında tümörlerin kendiliğinden gerilediğini fark etmiş ve ilerleyen çalışmalar sonucu TNF keşfedilmiştir (Goodsell, 2006). İlk defa 1975 yılında E.A.Carswell ve arkadaşları tarafından endotoksine maruz kalan hayvanların makrofajlarında tümör nekroz faktör aktivitesi gösterilerek TNF tanımlanmıştır (Clark, 2007; Wolchok and Vilcek, 1991). Bundan 10 yıl sonra 1985'te Beutler ve arkadaşları, TNF olarak tanımlanmış olan bu faktörü izole ederek kaşeksiye neden olduğunu saptamışlar ve bu faktöre kaşektin adını vermişlerdir (Wolchok and Vilcek, 1991). Daha sonra kaşektin olarak isimlendirilen bu molekülün aslında daha önceden tarif edilmiş olan TNF olduğu belirlenmiştir (Beutler et al., 1985). Yaklaşık otuz yıl önce, makrofajlardan ve lenfositlerden salınan ve hücrelerin ölümüne neden olan ürün tanımlanmış ve tümör nekroz faktör ve lenfotoksin terimleri ortaya çıkmıştır. Bu iki protein birbiriyle ilişkilidir ve TNF ligand süper ailesine aittir (Goetz et al., 2004). Bu buluşların ardından yapılan çalışmalar sonucu TNF süper ailesinin 29 reseptöre sinyal ileten 19 üyeden meydana geldiği ve bağışıklık cevabından morfogenez kadar birçok fonksiyonu düzenlediği gösterilmiştir (Aggarwal, 2003).

Tümör nekroz faktör tanımı, TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  adı verilen bağlantılı iki proteini ifade etmektedir. Bu ailede ayrıca yapısal olarak benzer özellikler taşıyan ve TNFR1 ve TNFR2 olarak simgelenen iki adet hücre yüzeyi TNF reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler, birbirinden farklı sitoplazmik domeynlere sahip olmaları nedeniyle farklı sinyal yollarını aktive ederler. Bağışıklıkla ilgili olayların çoğundan TNFR1 reseptörü sorumludur (Graves and Cochran, 2003). TNF reseptörü eksikliği bulunan farelerde, patojenite duyarlılığının arttığı ve çevresel lenfoid organların anormal gelişim gösterdiği gözlemlenmiştir (Peschon et al., 1998).

TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) özgül genler tarafından kodlanır ve yaklaşık %30 amino asit homolojisi gösterirler. LT- $\alpha$ , indüklenen T-lenfositlerce salınan, 171 aminoasitlik glikozillenmiş bir proteindir. TNF- $\alpha$  ise aktive olmuş monositlerden köken alır ve 157 rezidülük büyüklüğe sahiptir. Bu iki protein, biyolojik aktiviteleri oldukça benzer olmasına karşın, farklı indüklenme kinetiğine sahiptir. TNF- $\alpha$ ,

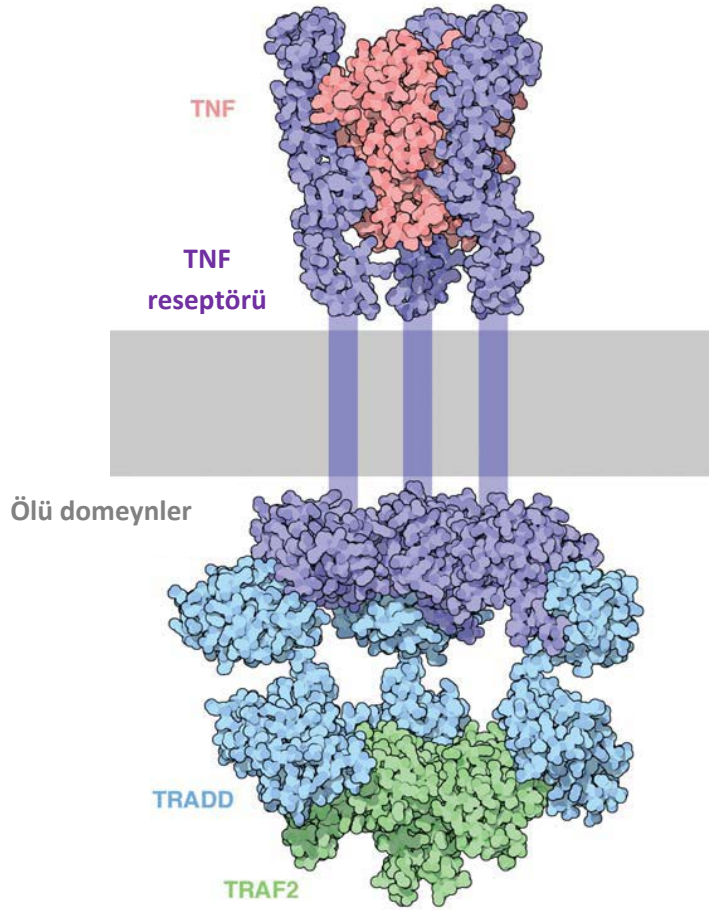
indüklenme ardından 4 – 24 saat içerisinde salgılanırken; LT- $\alpha$  için bu süre 24 – 48 saattir (Nedwin et al., 1985).

TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$ , bağışıklık cevabının başlatılması ve düzenlenmesinde merkezi rol oynarlar (Bouma et al., 1996). TNF' nin mikropsal patojenlere karşı koymada rol oynadığı birçok deneysel kanıt ile gösterilmiştir (Ferrante et al., 1993). TNF, Gram (-) bakterilere ve enfeksiyona yola açan diğer mikroplara karşı gerçekleştirilen akut yangısal cevabın ana düzenleyicisidir (Abbas and Lichtman, 2005). Yapılan çalışmalarda, TNF' nin sentezlenmesi ve salınmasını başlatan asıl uyarının gram-negatif bakteriler tarafından üretilen lipopolisakkaritler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Gram (+) bakterilerin hücre duvarı yapısal bileşenleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler, mantarların hücre duvarı antijenleri, viral ve paraziter antijenler de TNF sentezini başlatabilir (Abbas and Lichtman, 2005).

TNF, iki formda bulunur. İlk sentezlendiğinde kısa bir transmembran segment ile hücre zarına bağlı olan bu form, daha sonra membrana bağlı metalloproteinazlar tarafından açığa çıkarılır ve çözünür hale geçer (Goodsell, 2006). TNF salınmasına neden olan uyarı hücreye ulaştığında, TNF glikozillenmemiş tip II hücre zarı proteini olarak sentezlenir. Sentezlenen bu TNF monomeri pro-TNF olarak adlandırılır. Oluşan bu monomerlerin üçü bir araya gelerek hücre zarına bağlı TNF' yi meydana getirir ve bu yapıya membrana bağlı TNF anlamında mTNF adı verilir. Membrana bağlı olan bu molekül 233 aminoasitten oluşan ve 26 kDa' luk molekül ağırlığına sahip, aktif bir moleküldür. mTNF' nin hücre dışında kalan kısmı, makrofajlar ve monositlerin sahip oldukları TNF dönüştürücü enzim (TACE) tarafından kesilerek çözünür ve çözünebilir TNF (sTNF)' ye dönüşür. Kesilmiş mTNF' lerin üçü bir araya gelerek 157 aminoasitten oluşan ve 17 kDa molekül ağırlığındaki, hücre dışında aktif olan sTNF' yi oluştururlar. Ortama verilmiş olan aktif sTNF' ler, konakçı hücreye giderek hücre zarındaki 55 kDa moleküler ağırlığında olan tip I TNF reseptörü (TNF-RI), eski adıyla p55 reseptörleri ile birleşirler. Lenfositlerde TACE enzimi bulunmadığından salınan mTNF, sTNF' ye dönüşemez ve lenfosit zarında kalır. Bu mTNF' ler lenfositlerce taşınır ve konak hücre zarındaki 75 kDa molekül ağırlığında olan tip II TNF reseptörü (TNF-RII) veya diğer adıyla p75 reseptörleri ile birleşirler (Vilcek and Lee, 1991; Mocellin et al., 2005).



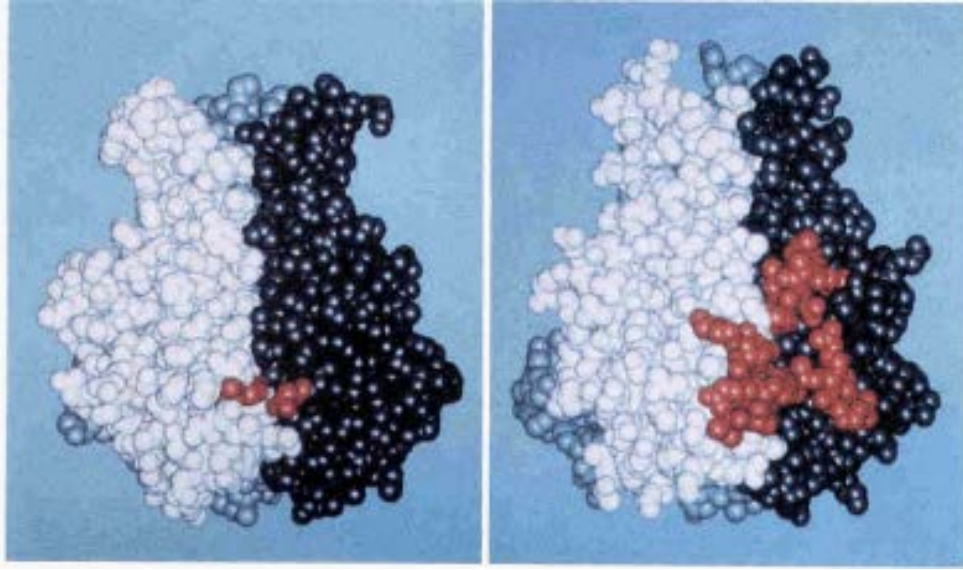
dışındaki bölgeler sistein amino asiti bakımından zengindirler. Sitoplazmik bölgede bulunan domeynler ise sinyal iletimini sağlarlar. Bu domeynler iki reseptörde birbirinden farklıdır ve bu sayede farklı sinyal yollarını indüklerler. Tip I TNF reseptörü sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu hızlandırırken, tip II TNF reseptörü T lenfositlerin proliferasyonunu hızlandırır (Mocellin et al., 2005). Şekil 2.5' te LT- $\alpha$  proteini ve reseptörünün gerçekleştirdiği bağlanma şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6. TNF proteininin genel yapısı (Goodsell, 2006).

Şekil 2.6' da kırmızı ile gösterilen TNF, lacivert ile gösterilen üç reseptör protein ile bir araya geldiğinde hücre içersindeki sinyal basamaklarını başlatır. Reseptörün hücre içinde bulunan kısmında ölü domeyni yer alır ve açık mavi ile gösterilen TRADD proteininin death domeyni ile ilişkili haldedir. Bu bağlanma sayesinde yeşil renk ile gösterilen TRAF2 gibi birçok protein bir araya gelir ve hücre ölümü ve yangı gibi fonksiyonlar gerçekleştirilir (Goodsell, 2006).

İnsan TNF- $\alpha$  proteininin aksine LT- $\alpha$  glikoproteindir ve yapısında disülfid bağı içermez. Ortamda bulunan asit, deterjanlar ve organik bileşenler nedeniyle kararsız hale gelir. Yapı olarak bakıldığında ise katlanmaları sonucu TNF- $\alpha$ ' da olduğu gibi "jellyroll  $\beta$  sheet sandwich" modeli oluşturmaktadır. LT- $\alpha$  alt üniteleri bir araya gelerek hidrofobik etkileşime sahip bir trimer meydana getirir. Yapısal özellikleri her ne kadar benzer de olsa, LT trimerinin tepe noktasında insersiyon ve delesyonların varlığında oluşan loop (kıvrım), molekülün şeklinde değişikliklere yol açar. Trimer yapının taban kısmı ise oldukça korunmuştur. Lenfotoksin ve tümör nekroz faktör trimerlerinin genel yapıları Şekil 2.7' de gösterilmiştir. Siyah, gri ve beyaz renk ile gösterilen üçlü protein reziduları iken; kırmızı ile gösterilen bölgeler, proteinlerin reseptör bağlanması ve sitotoksitesi ile ilgili mutajenik bölgeleridir (Eck et al., 1992).



Şekil 2.7. Lenfotoksin (solda) ve tümör nekroz faktör (sağda) proteinlerinin trimer yapıları. (Eck et al., 1992).

Lenfositlerden salınan LT sitokini, yangı, bağışıklık ve antiviral cevap gibi birçok mekanizmanın düzenleyicisidir (Noble et al., 2006). Ayrıca fare modelleri ile yapılan bir çalışmada lenfotoksinin, periferik lenfoid organların normal gelişimi için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir (Boraska et al., 2009).

#### 2.4.1.1. Periodontitis ve TNF- $\alpha$ İlişkisi

TNF- $\alpha$ , periodontitis ile ilişkisi en çok çalışılan sitokinlerdendir (Takashiba&Naruishi, 2006). Tümör nekroz faktör, yangısal reaksiyonlarda görevli önemli bir düzenleyicidir ve periodontitis patojenezinde önemli bir rol oynar (Beutler et al., 1999).

TNF, periodontitis patolojisinde birçok açıdan etkili bir proteindir. Kollajenazların, prostaglandin E2'nin, kemokinlerin, diğer sitokinlerin, hücre adezyon moleküllerinin ve kemik rezorpsiyonu ile ilişkili faktörlerin üretimini düzenlemeden sorumludur. Yangı ile ilgili olarak adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin ifadesini düzenler ve yangısal düzenleyicilerin üretimini uyarır (Pang et al., 2005).

TNF- $\alpha$ , kollajen sentezini azaltma ve MMP sentezini artırma özelliğine sahiptir (Bartold and Narayanan, 2006). MMP ekspresyonunu tetikleyerek bağ doku yıkımına ve apoptozu arttırarak geri dönüşümsüz hasar oluşumuna yol açar (Graves and Cochran, 2003). TNF reseptörü ifadesi olmayan fareler ile yapılan bir çalışmada, *in vivo P.gingivalis* enfeksiyonuna karşın farelerde TNF üretiminin çoğaldığı ve fibroblastlarda hücre ölümünün gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Graves et al., 2001).

Doğal bağışıklık cevabı ile ilişkili olan TNF, IL-1 ve IL-6 gibi diğer öncül yangısal sitokinler ile birlikte kemik resorpsiyonunu düzenlemektedir (Graves and Cochran, 2003; Lindhe et al., 1998; König et al., 1988). Ayrıca bu sitokinlerin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kemik yapımını engellediği de gösterilmiştir (Lindhe et al., 1998; König et al., 1988). Kemik kaybını, kemik yıkan hücreler olan osteoklastların oluşmasını ve aktivitelerini arttırarak sağlar. TNF, diğer osteoklast-düzenleyici moleküller gibi RANKL üretimini arttırır ve T-lenfositlerden, B-lenfositlerden ve endotel hücrelerinden salınmasını indükleyerek dolaylı olarak osteoklast oluşumunu sağlar (Van Dyke, 2007; Wajant et al., 1998; Boyce et al., 2005). Yapılan bir araştırmada TNF $\alpha$  ve LT $\alpha$  genlerinin *in vitro* şartlarda osteoklastik kemik kaybına neden olduğu ve kemik kollajen sentezini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Thomson et al., 1987; Bertolini et al., 1986). Kemik rezorpsiyonu açısından IL-1 $\beta$ 'nin, IL-1 $\alpha$  ve TNF- $\alpha$ ' dan daha etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Stashenko et al., 1987; 1989; 1991). Tüm bu çalışmalara ek olarak Assuma ve arkadaşları (1998) tarafından *Macaca fascicularis* üzerinde yapılan çalışmada,

deneysel periodontitis modelleri oluşturulmuş ve TNF-  $\alpha$  ve IL-1 inhibitörleri kullanılarak kemik kaybının %60 oranında azaldığı bulunmuştur (Assuma et al., 1998).

Periodontitis, JIA ve RA hastalarından alınan örneklerle yapılan ve hastalıklarla ilişkili sitokin profillerini oluşturmayı amaçlayan bir araştırmada, kan plazmasına ve hücre kültürüne ait sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş ve TNF- $\alpha$ 'nın her üç hastalıkta da yüksek seviyede olduğu bulunmuştur (Havemose-Poulsen et al., 2005).

Yapılan bir diğer çalışma ile, diş eti oluşu sıvısında yapılan ölçümlerde kronik periodontitis ve kontrol grubu ve agresif periodontitis ve kontrol grubu karşılaştırıldığında TNF- $\alpha$  seviyelerinin istatistiksel açıdan farklı olduğu ortaya konulmuştur (Kurtiş et al., 2005).

Agresif periodontitisli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda, ELISA ile TNF- $\alpha$  seviyeleri ölçülmüş ve hastalarda hem sağlıklı hem de hastalıklı bölgelerde yüksek miktarda TNF- $\alpha$  belirlenmiştir (Bastos et al., 2009).

#### **2.4.1.2. Periodontitis ve LT- $\alpha$ İlişkisi**

Lenfotoksin alfa (LT- $\alpha$ ) diğer adıyla tümör nekrozis faktör beta (TNF- $\beta$ ) geni, 6 numaralı kromozomun kısa kolunun 21. lokusunda bulunan HLA-B ve DR genlerinin arasında ve TNF- $\alpha$  geni ile bağlantılı şekilde yerleşim gösterir. Başlıca makrofajlar tarafından ifade edilen TNF- $\alpha$  proteininin aksine, LT- $\alpha$ , CD4(+) Th1 lenfositleri, doğal öldürücü hücreler ve aktive olmuş B hücreleri tarafından salınır (Holla et al., 2001). Yüksek yakınlıkta homoloji ve yerleşim göstermelerine dayanılarak yapılan evrimsel çalışmalar bu iki genin aynı atadan evrimleştiğini göstermiştir (Nedwin et al., 1985). Yapılan linkaj analizleri ve darbe-alanlı jel elektroforez çalışmaları da bu iki genin yakından bağlı olduğunu kanıtlamıştır (Nedwin et al., 1985; Spies et al., 1986; Muller et al., 1987).

Lenfotoksin, tümör nekroz faktör- $\alpha$  ile benzer şekilde yangısal ve immunolojik olaylarda rol alan bir sitokindir (Jacob et al., 1990). IL-1 ve TNF- $\alpha$  ile birlikte, öncül kollajenaz ve öncül stromelisin gibi nötral metalloproteinazları, metalloproteinazların doku inhibitörlerini (TIMP) ve plazminojeni plazmine çevirerek nötral metalloproteinaz öncül enzimlerini aktive ederler. Bu sayede ECM

bileşenlerinin tahrip olmasına yol açan serin proteaz urokinaz tipi plasminojen aktivatörünü (u-PA) ve prostoglandinleri üretmek üzere fibroblast ve makrofaj indüksiyonunu gerçekleştirir (Page, 1991). Ayrıca bağışıklık cevabı söz konusu olduğunda lenfotoksinin, *in vitro* koşullarda TNF- $\alpha$  aktivitesini ikiye katladığı bilinmektedir (Körner and Sedgwick, 1996).

Lenfotoksin alfa geninin ilk intron bölgesinde bulunan ve bi-alelik *NcoI* uzunluk polimorfizminin insülin bağımlı diabetes mellitus-I ve lupus eritematozus gibi birçok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pociot et al., 1993). LT- $\alpha$  polimorfik aleli *in vitro* koşullarda TNF- $\alpha$ 'nın yüksek oranda üretilmesine neden olmakta ve bu nedenle yangısal hastalıklar için yatkınlık sağlamaktadır (Pociot et al., 1993; Stuber et al., 1996). TNF- $\beta$  geninin birinci intronundaki A'dan G'ye baz dönüşümü sonucu oluşan alelik varyant, proteinin yüksek seviyede ifade edilmesine neden olur ve yavaş olan bağışıklık cevabı tetikler (Messer et al., 1991).

Holla ve arkadaşları (2001) tarafından 63 Çek kronik periodontitis hastası ve 95 sağlıklı birey üzerinde yapılan çalışmada, LT- $\alpha$  gen frekansları hasta ve sağlıklı bireylerde istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunmuş ve LT- $\alpha$  geninin kendi başına periodontitisten sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Holla et al., 2001).

Periodontitis ile ilişkili anaerobik Gram (-) bir patojen olan *P. gingivalis*'in farklı kapsül özelliklerine sahip suşları ile yapılan bir çalışmada, en çok antijen sunan hücreler olarak bilinen dendritik hücrelerdeki sitokin mRNA ifadesi ölçülmüş ve LT- $\alpha$  ekspresyonunun bazı suşlarda yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir (Vernal et al., 2009).

## 2.5. Periodontitis ve Genetik

Bireylerin genetik altyapısı, hastalıklara olan yatkınlığını veya direncini etkilemektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 1.42 milyon tek nükleotit polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır (Sachidanandam et al., 2001). Bu rakamın %10'u konakçı cevabının niceliğini değişmesine yol açan tek nükleotit polimorfizmleridir (Yoshie et al., 2005).

Genetik polimorfizmler uzun yıllardır hastalık ve nedensel gen ilişkisi için linkaj çalışmalarında kullanılmıştır. Karmaşık yaygın hastalıklarda, polimorfizmin genin işlevine olan doğrudan etkisinin araştırılması çalışmalara yeni ve heyecan verici bir bakış açısı getirmiştir.

Bir genin farklı kromozomal bölgelerine yerleşmiş varyant formlarına alel adı verilmektedir. Polimorfik bölgenin yaygın olarak bulunan haline normal varyant alel (*N-allele*) denir ve toplumda sıklığı %99' dur. Toplumda %1 gibi bir oranda nadir görülen diğer varyant ise seyrek alel (*R-allele*) olarak adlandırılır. Bir gene ait her iki alel de toplumda görüldüğü takdirde genetik polimorfizm kavramı ortaya çıkar. Eğer bu varyasyon gendeki tek bir nükleotit değişikliğini barındırıyorsa tek nükleotit polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP) olarak tanımlanır. SNP' lerin gen ürünü üzerine hiçbir etkisi olmayacağı gibi, bazen de çok önemli biyolojik etkileri olabilir. Genin kodlama bölgesinde oluşan bir polimorfizm nedeniyle farklı bir protein ortaya çıkabilir ve fonksiyonel bir değişiklik görülebilir. Promotor bölgelerindeki polimorfizmler sonucu ise gen ifadesi azalabilir veya genin aşırı ifadesi görülebilir. SNP' ler diğer gen polimorfizmlerine göre daha sık görülen tipte polimorfizmlerdir ve sıklığının insan genomunda her 0,3-1 kilo bazda bir tekrarladığı tahmin edilmektedir (Schork et al., 2000).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki periodontitise yakalanma riski her bireyde farklılık göstermekte ve nedeni sadece ağız hijyeni ile açıklanamamaktadır (Löe et al., 1986; Baelum et al., 1986; van der Velden et al., 2006). Genetik risk faktörlerinin periodontitis üzerinde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür. Genetik risk faktörünün varlığı periodontal hastalığın ortaya çıkma olasılığını artırırken, yokluğunda bu olasılık düşmektedir (Loos et al., 2005). Bireyde doğuştan var olan bakteriyel ve diğer çevresel faktörlerin, periodontitisi başlattığına ve ilerlemesini düzenlediğine inanılır.

Periodontitis, Kinane ve Hart tarafından kompleks bir genetik hastalık olarak tanımlanmıştır. Karmaşık genetik hastalıkların ortaya çıkması için tek bir gen polimorfizmi yeterli değildir. Ancak çoklu gen lokuslarındaki genetik varyasyonlar hastalık eğilimini tetikler (Kinane and Hart, 2003). Periodontitis gibi kompleks hastalıklarda klasik Mendel kalıtımı prensipleri geçerli değildir. Genin homozigot ya da heterozigot olması hastalık üzerinde tek başına etki gösteremez. Genler arası ilişkiler ve genler ile çevresel faktörlerin ilişkileri de hastalığın ortaya çıkmasında rol alan faktörlerdir (Loos et al., 2005).

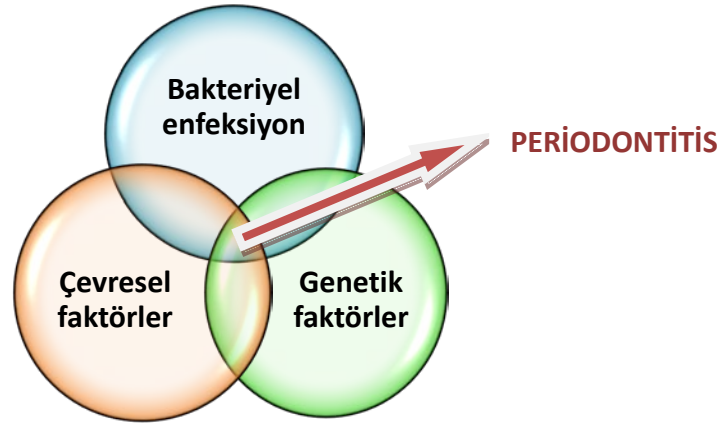
Son zamanlarda yapılan birçok bilimsel yayın hastalığın başlaması ve ilerlemesinde genlerin kaçınılmaz rolü olduğunu savunmaktadır (Yoshie et al., 2005). Farklı alelik varyasyonlar doku yapıları, antikor cevap ve bağışıklık düzenleyiciler üzerinde değişime yol açar (Kinane and Hart, 2003). Genetik farklılıkların hastalıklar üzerinde koruyucu ya da risk faktörü olma gibi özellikleri de mevcuttur (Nares, 2003). Bu nedenle periodontitis, fenotipi hem genetik hem de çevresel faktörler tarafından belirlenen karmaşık bir genetik hastalık olarak düşünülebilir (Yoshie et al., 2005). Multifaktöriyel olarak tanımlanan hastalıklar grubunun içerisinde yer alır.

TNF üretimi oranlarındaki farklar ve sitokin seviyelerinin düşük ya da yüksek olmasının ailesel özelliklerden etkilendiği gösterilmiştir (Pociot et al., 1993). Daha sonra birçok araştırmacı tarafından TNF sentezinin gen polimorfizmleri varlığından etkilenebileceği ileri sürülmüştür (Wilson et al., 1993; 1997).

Genetik etkinin periodontitis ile ilişkisi ailesel kalıtım çalışmaları (Boughman et al., 1992; Marazita et al., 1994) ve ikizlerle yapılan araştırmalar ile tanımlanmıştır (Michalowicz et al., 1991; Corey et al., 1993; Michalowicz et al., 2000). Bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından ikizler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda periodontitis ve genetik ilişkisinin kanıtlanmasına ek olarak, Mucci ve arkadaşları (2005) genetik ve çevresel etmenlerin periodontal hastalık ve diş kaybı üzerine etkilerini incelemiş ve gen-çevre etkileşiminin hastalık üzerine etkisini ölçmüştür (Mucci et al., 2005).

Sigara kullanımı gibi yaşam tarzı da periodontitisi etkileyen önemli faktörler arasında yer alır. Çevresel faktörlerin hem hastalığın şiddetini hem de tedavisini etkileyen önemli bir bileşen olduğuna inanılır (Palmer et al., 2005).

Şekil 2.8' de gösterildiği gibi, periodontitise olan yatkınlık periodontal bakteriler kadar çevresel ve genetik faktörler tarafından da etkilenmektedir (Pihlstrom et al., 2005).



Şekil 2.8. Periodontal hastalığın başlıca etmenleri.

Takashiba ve Naruishi (2006) tarafından yapılan bir çalışmada periodontitis ve genetik ilişkisi üzerine yazılmış makaleler incelenmiş ve periodontitis ile ilgili 6 farklı kategori oluşturulmuştur. Bu gruplama ile IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler, insan lökosit antijenleri (HLA), immünoresseptörler, MMP' ler ve katepsin gibi proteazlar ve yapısal moleküllere ait gen polimorfizmlerinin periodontitis ile ilişkisi gösterilmiştir (Takashiba and Naruishi, 2006). Çizelge 2.1' de periodontitis ile ilgili araştırılan aday genlerin özeti verilmiştir. Bu tabloda bağışıklık sisteminin hastalık üzerinde ne kadar önemli bir rolü olduğu ve araştırmacıların konak bağışıklığı ile ilgili gen polimorfizmlere odaklandığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 2.1. Periodontitis olası risk faktörleri olarak araştırılan aday genlerin ve kodladıkları proteinlerin özeti (Loos et al., 2005).

Gen	Kodlanan Protein
ACE	Angiotensin-converting enzim
ER2	Östrojen reseptörü
ET1	Endotelin-1
FBR	Fibrinojen
FcγRIIa / IIb / IIIa / IIIb	Fc gama reseptörü IIa / IIb / IIIa / IIIb
IFNγRI	İnterferon gama reseptör-1
IL1A	İnterlökin-1α
IL1B	İnterlökin-1β
IL2	İnterlökin-2
IL4	İnterlökin-4
IL6	İnterlökin-6
IL10	İnterlökin-10
LTA	Lenfotoksin-α
MMP-1	Matriksmetalloproteinaz-1
MMP-3	Matriksmetalloproteinaz-3
MMP-9	Matriksmetalloproteinaz-9
TLR-2	Toll-like reseptör-2
TRL-4	Toll-like reseptör-4
TNFA	Tümör nekroz faktör-α
TNFR2	Tümör nekroz faktör reseptör-2

Son yıllarda hem Çizelge 2.1' deki genlere ait farklı polimorfik bölgelerle hem de farklı gen bölgeleri ile periodontitis ilişkisi çalışılmıştır. Wu ve arkadaşları (2010) tarafından Tayvan popülasyonuna ait kronik ve agresif periodontitisli hastalar üzerinde yapılan çalışmada, IL-13 genine ait (-1112) C/T polimorfizminin agresif periodontitis ile ilişkili olduğu ve CC genotipine sahip olmanın agresif periodontitis riskini arttırdığı belirlenmiştir (Wu et al., 2010). Yapılan bir başka araştırmada, COX-2 geninin -765 bölgesinde bulunan tek nükleotit polimorfizminin Tayvan popülasyonunda agresif periodontitise karşı koruyucu etkide bulunduğu gösterilmiştir (Ho et al.,2008). Aynı gene ait -1195 bölgesindeki polimorfizmin ise Çin popülasyonunda kronik periodontitise yatkınlığa neden olduğu farklı bir çalışma ile kanıtlanmıştır (Xie et al., 2009).

Periodontitis ile ilgili ailesel çalışmalar az olmasına rağmen, eldeki çalışmaların sonucu hastalıkta ailesel birikimin olduğunu göstermektedir (Torres de Heens et al., 2010). Carvalho ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir araştırmada, ilk defa agresif periodontitise ait bir lokus tanımlanmış ve FAM5C adlı genin agresif periodontitisi tetiklediği gösterilmiştir (Carvalho et al., 2010).

Bugüne kadar TNFA gen varyasyonları ile periodontitis arasındaki ilişki bakımından elde edilen bilgi çok sınırlıdır (Laine et al., 2010). Çizelge 2.2' de farklı populasyonlar üzerinde yapılmış çalışmalarda, TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  genleri ile periodontitis arasındaki ilişki profillerinin özeti verilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı populasyonlarda TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  gen polimorfizmlerinin dağılımı.

	Populasyon	Hastalık	Gen	Polimorfizm	Hasta grubu	Kontrol grubu	İlişki
Babel et al., (2006)	Alman	*KP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%4.9 (6/122)	%7.3(8/110)	Yok
D'Autio et al., (2004)	Avrupa, Asya, Afrika	Periodontitis	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%1.1 (1/94)	-	Yok
Fassmann et al., (2003)	Çek	KP	TNF $\alpha$ LT $\alpha$	-308(G/A) +252(A/G)	%0.8 (1/132) %0.8 (1/132)	%0.9 (1/114) %8.8 (10/114)	Yok Var
Craandijk et al., (2002)	Beyaz Irk	Periodontitis	TNF $\alpha$	-376(G/A) -308(G/A) -238(G/A) +489(G/A)	%0 (0/90) %3 (3/90) %1 (1/90) %1 (1/90)	%0 (0/264) %2 (6/264) %0 (1/264) %2 (6/264)	Yok Yok Yok Yok
Scapoli et al., (2007)	İtalyan	Gingivitis	TNF $\alpha$ LT $\alpha$	-308(G/A) +252(A/G)	%2.1 (2/96) %1.1 (1/92)	-	Yok Yok
de Sa et al., (2007)	Brezilya	Periodontitis	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%17.8 (16/90)	%13.2 (14/106)	Yok
Folwaczny et al., (2004)	Alman	Periodontitis	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%2.5 (2/81)	%0 (0/80)	Yok
Schulz et al., (2008)	Beyaz Irk	**AP KP	TNF $\alpha$	-308(G/A) -238(G/A) -308(G/A) -238(G/A)	%7.2 (5/69) %0 (0/69) %1.9 (1/54) %1.9 (1/54)	%0 (0/52) %0 (0/52) %0 (0/52) %0 (0/52)	Yok Yok Yok Yok

Çizelge 2.2. devam ediyor.

Galbraith et al., (1999)	Beyaz Irk	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%20 (8/40)	%24 (11/45)	Var
Moreira et al., (2009)	Brezilya	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%0 (0/55)	%0 (0/43)	Yok
		KP		-308(G/A)	%1.5 (1/67)	%0 (0/43)	Yok
Shapira et al., (2000)	İsrail	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%0 (0/16)	%0 (0/27)	Yok
Menezes and Colombo (2008)	Brezilya	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%18.4 (7/38)	% 27.5 (14/51)	Yok
		KP		-308(G/A)	%19 (14/74)	% 27.5 (14/51)	Yok
Brett et al., (2005)	Beyaz Irk	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%0 (0/50)	%0 (0/97)	Yok
		KP		-308(G/A)	%2 (1/55)	%0 (0/97)	Yok
Soga et al., (2003)	Japonya	KP	TNF $\alpha$	-1031(T/C) -863(C/A) -857(C/T) -308(G/A)	%3.1 (2/64) %6.3 (4/64) %4.7 (3/64) %0 (0/64)	%1.6 (1/64) %1.6 (1/64) %6.3 (4/64) %0 (0/64)	Var Var Var Yok
Tervonen et al., (2007)	Finlandiya	KP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	% 31.4 (16/51) [AG/AA]	%23 (41/178)	Yok
Maria de Freitas et al., (2007)	Brezilya	AP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%0 (0/30)	%4.3 (3/70)	Yok
Endo et al., (2001)	Japonya	AP	TNF $\alpha$	-1031(T/C) -863(C/A) -857(C/T) -308(G/A) -238(G/A)	-	-	Yok Yok Yok Yok
Donati et al., (2005)	Beyaz Irk	KP	TNF $\alpha$	-308(G/A)	%21.7 (13/60) [AG/AA]	18.0 (7/39)	Yok

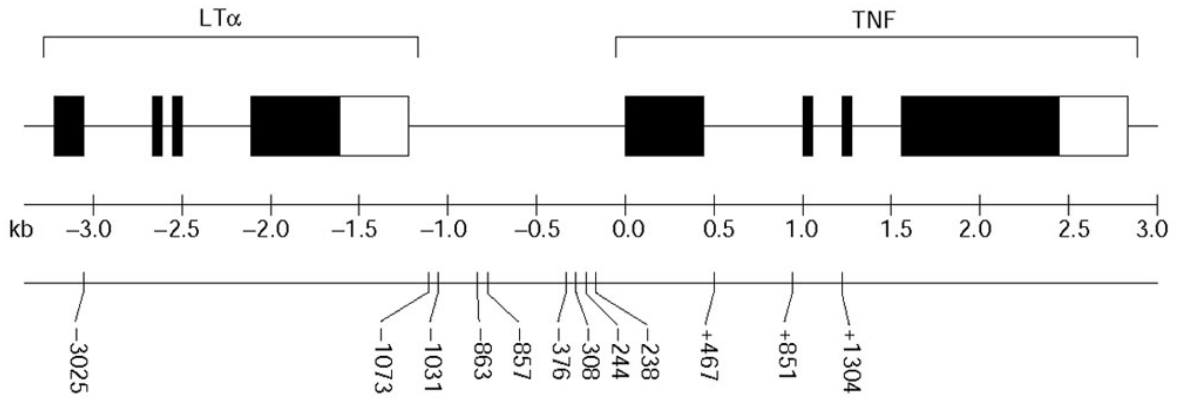
\*KP: kronik periodontitis

\*\*AP: agresif periodontitis

### 2.5.1. Tümör Nekroz Faktör Ve Lenfotoksin Gen Polimorfizmlerinin Periodontitis ile İlişkisi

HLA sınıf I ve II bölgeleri arasında yerleşim gösteren ve HLA (Human Leukocyte Antigen) sınıf III olarak bilinen gen bölgesi, TNF ve LT gibi yangı ve bağışıklık cevabı ile ilişkili birçok gen ile ilişkilidir (Boraska et al., 2009).

TNF ve LT- $\alpha$  genlerinin çevresinde yaklaşık 16 polimorfik bölge belirlenmiştir. Bu polimorfizmler beş adet mikrosatelit, on adet bialelik ve bir adet C insersiyon bölgesi içermektedir (Fanning et al., 1997).



Şekil 2.9. TNF geni üzerindeki polimorfik bölgeler (<http://genomebiology.com>)

TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesine ait -1031, -863, -367, -308, -238 ve kodlama bölgelerinden ilk intron bölgesine ait +489 polimorfizmleri çok sayıda araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Şekil 2.9). Genin promotor bölgesinde -238 ve -308 pozisyonlarında polimorfizm olduğu bildirilmiştir. Fassmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada -308A alelinin yüksek promotor aktivitesi ve aşırı TNF- $\alpha$  üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Fassmann et al., 2003). Tümör nekroz faktör (-308) promotor polimorfizminin, genin transkripsiyonel aktivitesine etkisini araştıran bir başka çalışmada, A aleli varlığının genin yüksek ifadesinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Kroeger et al., 1997; Elahi et al., 2009).

Beyaz ırkın yaklaşık % 60 - %70 lik bir kısmında yabanıl TNF1 genotipinin, %30 - %40 oranında heterozigot genotipin ve %1.5 - %3 sıklığında da varyant TNF2 genotipinin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Seidemann et al., 2005; Demeter et al., 1997; Wihlborg et al., 1999).

.....tcctctcgccccagggacatataaaggcagttggttggcacacccagccag  
 CAGACGCTCCCTCAGCAAGGACAGCAGAGGACCAGCTAAGAGGGAGAGAAGCAACTACAG  
 ACCCCCCCTGAAAACAACCTCAGACGCCACATCCCCTGACAAGCTGCCAGGCAGGTTCT  
 CTTCTCTCACATACTGACCCACGGCTCCACCCTCTCTCCCCTGGAAAGGACACCATGAG  
 CACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGG  
 GGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTTCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGC  
 AGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAGTGATCGGCCCCAGAGGGAAGA  
 G  
 gtgagtgccctggccagccttcatcc.....taaccattctccttctccccaacag  
 TTCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCCTCTGGCCAGGCAGTCA  
 gtaagtgtctccaaacctctttcct.....tttttcttttctctctcctcttcag  
 GATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAG  
 gtaagagctctgaggatgtgtcttg.....cctctccctctctccctccctccag  
 CAAACCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCTCCTGG  
 CCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTACCTCA  
 TCTACTCCCAGGTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCTCCACCCATGTGCTCCTCACCC  
 ACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGCCATCA  
 AGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGAGCCCA  
 TCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGATCAATC  
 GGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGCCCTGT  
 GAGGAGGACGAACATCCAACCTTCCCAAACGCCTCCCCTGCCCAATCCCTTTATTACCC  
 CCTCCTTCAGACACCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTGGGGGCTTAGGGTCTG  
 GAACCAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCACTTCGAAACCTGGGATTCAGGAA  
 TGTGTGGCCTGCACAGTGAAGTGTGCTGGCAACCACTAAGAATTCAAACCTGGGGCCTCCAGA  
 ACTCACTGGGGCCTACAGCTTTGATCCCTGACATCTGGAATCTGGAGACCAGGGAGCCTT  
 TGGTTCTGGCCAGAATGCTGCAGGACTTGAGAAGACCTCACCTAGAAATTGACACAAGTG  
 GACCTTAGGCCTTCTCTCTCCAGATGTTTCCAGACTTCTTGAGACACGGAGCCAGCC  
 CTCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTTATGTTTGCACCTGTGATTATTTATTATTTATT  
 TATTATTTATTTATTTACAGATGAATGTATTTATTTGGGAGACCGGGGTATCCTGGGGGA  
 CCAATGTAGGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAAAACGGAGCTGAACAATA  
 GGCTGTTCCCATGTAGCCCCCTGGCCTCTGTGCCTTCTTTTGATTATGTTTTTTAAATA  
 TTTATCTGATTAAGTTGTCTAAACAATGCTGATTTGGTGACCAACTGTCACTCATTGCTG  
 AGCCTCTGCTCCCCAGGGGAGTTGTGTCTGTAATCGCCCTACTATTCAGTGGCGAGAAAT  
 AAAGTTTGCTTAGAAAAGAAA  
 catggtctccttcttggaaattaattctgcatctgcctcttcttgtgggtg.....

Şekil 2.10. İnsan TNF- $\alpha$  genine ait nükleotit dizisi.  
 ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000204490;r=HSCHR6\\_MHC\\_COX:31530756-31533525;t=ENST00000376122](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000204490;r=HSCHR6_MHC_COX:31530756-31533525;t=ENST00000376122)).

.....gccacgctgccactgccgcttcctctataaagggacctgagcgtccgggc  
CCAGGGGCTCCGCACAGCAGGTGAGGCTCTCCTGCCCATCTCCTTGGGCTGCCCGTGCT  
TCGTGCTTTGGACTACCGCCAGCAGTGTCTGCCCTCTGCCTGGGCCCTCGGTCCCTCCT  
GCACCTGCTGCCTGGATCCCCGGCCTGCCTGGGCCCTGGGCCTTG  
gtggggtttgggttttgggtttccttct.....tctctctctctctctcttctctgcag  
GTTCTCCCCATGACACCACCTGAACGTCTCTTCCCTCCCAAGGGTGTGTGGCACCACCCTA  
CACCTCCTCCTTCTGGGGCTGCTGCTGGTTCTGCTGCCTGGGGCCCAG  
gtgaggcagcaggagaatgggggct.....ccccctcaactctgttctcccctag  
GGGCTCCCTGGTGTGGCCTCACACCTTCAGCTGCCCAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAG  
ATGCATCTTGCCACAGCACCTCAAACCTGCTGCTCACCTCATTG  
gtaaacatccacctgacctcccaga.....ccccatcccctatggctcttccctag  
GAGACCCAGCAAGCAGAACTCACTGCTCTGGAGAGCAAACACGGACCGTGCCTTCCTCC  
AGGATGGTTTCTCCTTGAGCAACAATTCTCTCCTGGTCCCCACCAGTGGCATCTACTTCG  
TCTACTCCCAGGTGGTCTTCTCTGGGAAAGCCTACTCTCCAAGGCCACCTCCTCCCCAC  
TCTACCTGGCCCATGAGGTCCAGCTCTTCTCCTCCAGTACCCCTTCCATGTGCCTCTCC  
TCAGCTCCCAGAAGATGGTGTATCCAGGGCTGCAGGAACCCTGGCTGCACTCGATGTACC  
ACGGGGCTGCGTTCCAGCTCACCCAGGGAGACCAGCTATCCACCCACACAGATGGCATCC  
CCCACCTAGTCTCAGCCCTAGTACTGTCTTCTTTGGAGCCTTCGCTCTGTAGAACTTGG  
AAAAATCCAGAAAGAAAAATAATTGATTTCAAGACCTTCTCCCCATTCTGCCTCCATTC  
TGACCATTTTCAGGGGTCGTCACCACCTCTCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCC  
CTGATCAAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGGAATTCTAGGCATCCAGGGGACCACACCT  
CCCTGAACCATCCCTGATGTCTGTCTGGCTGAGGATTTCAAGCCTGCCTAGGAATTTCCA  
GCCAAAGCTGTTGGTCTGTCCCACCAGCTAGGTGGGGCCTAGATCCACACACAGAGGAA  
GAGCAGGCACATGGAGGAGCTTGGGGGATGACTAGAGGCAGGGAGGGGACTATTTATGAA  
GGCAAAAAAATTAATTTATTTATTTATGGAGGATGGAGAGAGGGGAATAATAGAAGAACA  
TCCAAGGAGAAACAGAGACAGGCCCAAGAGATGAAGAGTGAGAGGGCATGCGCACAAGGC  
TGACCAAGAGAGAAAGAAGTAGGCATGAGGGATCACAGGGCCCCAGAAGGCAGGGAAAGG  
CTCTGAAAGCCAGCTGCCGACCAGAGCCCCACACGGAGGCATCTGCACCCTCGATGAAGC  
CCAATAAACCTCTTTTCTCTGAAA  
tgctgtctgcttgtgtgtgtgtgtgtctgggagtgagaacttcccagtctat.....

Şekil 2.11. İnsana ait LT $\alpha$  genin nükleotit dizisi.  
([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000226979;r=6:31539831-31542101;t=ENST00000418386](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000226979;r=6:31539831-31542101;t=ENST00000418386)).

Bu çalışma kapsamında periodontitis ile ilişkisi çalışılan, TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  genlerine ait nükleotit dizileri sırasıyla Şekil 2.10 ve Şekil 2.11’ de verilmiştir.

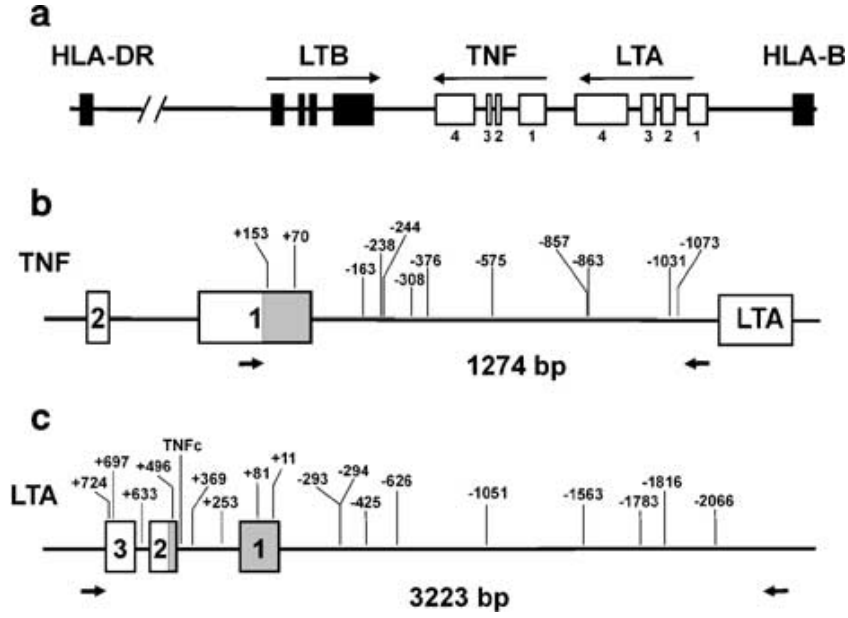
TNF- $\alpha$  -308 (G $\rightarrow$ A) polimorfizminin periodontitis dışında, serebral malarya, ülseratif kollitis, Crohn hastalığı, mukokutanöz Leishmania, lepromatöz lepra, septik şok ve ölümcül meningokokal hastalıklar gibi birçok enfeksiyonel hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bayley et al., 2004; McGuire et al., 1994; Stuber et al., 1996).

TNF salgılanma seviyesinin LT $\alpha$  geninin ilk intron bölgesinde bulunan LTA Ncol ya da LTA +252 olarak adlandırılan polimorfizmin ve TNF $\alpha$  promotor bölgesinde bulunan TNF-308\*2 aleli ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Messer et al., 1991; Wilson et al., 1993; Moffatt et al., 1997; Stuber et al., 1996). Ayrıca TNF $\alpha$  ve LT $\alpha$  genlerinin varyantlarının *in vitro*' da farklı TNF/LT üretimi ile ilişkili olduğu ve yangısal hastalıklara yatkınlık sağladığı gösterilmiştir (Pociot et al., 1993; Hajeer et al., 2001; Heesen et al., 2003).

Farklı hastalıklar üzerinden yapılan birçok çalışmada TNF-308\*2 ve LT $\alpha$  Ncol\*1 gen polimorfizmleri arasında güçlü bir bağlantı dengesizliği (linkaj disequilibrium) olduğu bildirilmiştir (Mrazek et al., 2005; Moffatt et al., 1997; Kadar et al., 2008). Sarkoidoz hastaları üzerinde yapılan bir araştırmada, LTA (+252A/G) ve TNF (-308G/A) polimorfizmleri hastalıkla doğrudan ya da linkaj sonucu olup olmadığı kanıtlanmaksızın ilişkili bulunmuştur (Mrazek et al., 2005). Diğer bir çalışmada ise, TNF-308\*2 ve LT $\alpha$  Ncol\*1 gen polimorfizmlerini birlikte taşıyan bireylerde astım hastalığının daha yaygın olduğu ifade edilmiştir (Moffatt et al., 1997). LT- $\alpha$  geninin kodlanan bölgesi olan intronunda +252 pozisyonunda A' nın G' ye dönüşmesi sonucu ortaya çıkan polimorfizm, proteinin yüksek seviyelerde ifade olmasından sorumludur (Messer et al., 1991). Beyaz ırkta %40-45 oranında homozigot AA genotipi, %40-45 oranında heterozigot genotip ve %15 oranında homozigot GG genotipi gözlenmektedir (Seidemann et al., 2005; Demeter et al., 1997; Wihlborg et al., 1999). Lenfotoksin alfa +252 G/A polimorfizmi ile birçok otoimmün hastalık arasında güçlü bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır (Koss et al., 2000; Mulcahy et al., 1996).

Lenfotoksin- $\alpha$  geni üzerinde bulunan farklı polimorfizmlerle de periodontitis ilişkisi araştırma konusu olmuştur. Palikhe ve arkadaşları tarafından koroner arter hastalığı ve periodontitisli bireylerde yapılan bir çalışmada LTA +496(C/T) polimorfizminin hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Periodontitis açısından, CC homozigot genotipini taşıyan bireylerin TT homozigot olan bireylerden 8 kat daha fazla riske sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca heterozigot bireylerin de TT homozigot bireylere göre hastalığa yatkınlığı 5 kat yüksektir (Palikhe et al., 2008).

Şekil 2.12' de TNFA ve LTA genlerinin, insan lökosit antijenleri (HLA) bölgesinde gösterdiği yerleşim verilmiştir. TNFA geni LTA ve LTB genlerinin arasında yerleşim göstermekte ve üzerinde çok sayıda polimorfik bölge içermektedir.



Şekil 2.12. (a) TNF ve LTA genlerinin HLA lokusu üzerindeki genel yerleşimi, (b) TNF-α geni üzerinde yer alan polimorfizmler, (c) LT-α genine ait polimorfik bölgelerin gösterimi (Posch et al., 2003).

TNF-α ve LT-α genlerinin fiziksel olarak bağlantılı genler olduğu bilinmektedir (Gardner et al., 1987). Şekil 2.13' te TNF-α ve LT-α genlerine ait ortak korunmuş bölgeler gösterilmiştir. TNF-α ve LT-α genleri arasında benzerlik gösteren en önemli bölge son ekzonda bulunmaktadır. Bu ekzon LT-α geninin kodlamasından %80 oranında sorumluyken, TNF-α geninden %89 oranda sorumludur. Önceleri Pennica ve arkadaşları tarafından yapılan karşılaştırmalarda iki gen arasındaki homoloji %28 bulunmuş, daha sonra bu rakam Aggarwal ve arkadaşlarının çalışması ile %35' lere kadar yükseltilmiştir (Pennica et al., 1984; Aggarwal et al., 2003). Nükleotit seviyesini de yansıtan %56 maksimum homoloji ise dördüncü ekzonun kodlanan kısımlarını içermektedir. Her iki genin 3'UTR bölgeleri %43 oranında benzerdir ve fazla miktarda A-T rezidusuna sahiptirler. İntronlarını ve 5'UTR bölgelerini kapsayan diğer bölgeler, önemli bir benzerlik göstermemektedirler (Nedwin et al., 1985).

TNF- $\beta$	TTTCCCAGAACTCAGTCGCCTGAACCCCCAGCCTGTGGTT
TNF- $\alpha$	CTTGTGTGTCCCCAACTTTCCAAATCCCCGCCCGCGAT
CONSENSUS	-TT----G--C-CA-----C--AA-CCCC--CC----G-T
TNF- $\beta$	CTCTCCTAGGCCTCAGCCTTTCCTGCCCTTGGACTGAAACA
TNF- $\alpha$	GGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGC <u>CCACTACCG</u>
CONSENSUS	-----A--CC----C-----TGC-----C---A-C-
TNF- $\beta$	GCAGTATCTTCTAAGCCCTGGGGGCTTCCCCGGGCCCCAG
TNF- $\alpha$	<u>CTTCCTC</u> CAGATGAGCTCATGGGTTTCTCCACCAAGGAAG
CONSENSUS	-----C---T-AGC-C--GGG--TC-CC-----AG
TNF- $\beta$	CCCCGACCTAGAACCCGCCCGCTGCCTGCCACGCTG <u>CCAC</u>
TNF- $\alpha$	TTTTCCGCTGGTTGAATGATTCTTTCCCCGCCCTCCTCTC
CONSENSUS	-----CT-G-----CT--C--C--C-----C-C
TNF- $\beta$	<u>TGCCGCTTCCTC</u> TATAAAGGGACCTGAGCGTCCGGGCCCA
TNF- $\alpha$	GCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCAC--ACCCA
CONSENSUS	--CC-----TATAAAGG-A--TG---G--C---CCCA

Şekil 2.13. TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  genlerinin promotor bölgelerinin karşılaştırılması. Altı çizili nükleotitler yüksek homoloji gösteren bölgeleri ifade etmektedirler (Nedwin et al., 1985).

### 1.6. Çalışmanın Amacı

Periodontitis çevresel ve genetik faktörlerin birlikte ortaya çıkardığı multifaktöriyel bir hastalıktır. Aday genlerin hastalığın etiyolojisi üzerine olan etkilerini araştırmak hastalığa yatkın bireylerin önceden saptanmasını sağlamakla kalmaz, koruyucu ve hastaya özgül tedavilerin gelişmesine olanak sağlar.

Sitokinlerin enfeksiyonel hastalığın gelişiminde büyük rol oynadığı ve gerek bölgesel gerek sistemik bağışıklık cevapla ilişkili olduğu bilinmektedir. Periodontitis ile ilişkili olarak, dişeti dokusunda yüksek seviyelerde ölçülen en önemli sitokinlerden biri TNF- $\alpha$ 'dır. Lenfotoksin- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) geni ise bağışıklık cevapta rol almasının yanı sıra, TNF- $\alpha$  üretimini arttırması gibi bir özelliği olması açısından bu çalışmada önem kazanmış ve bu iki genin birlikte incelenmesi gereği ortaya çıkmıştır.

Farklı popülasyon grupları üzerinde yapılan sitokin gen polimorfizmlerini araştırmaya yönelik çalışmalarda, çok farklı gen frekansları ortaya çıkmıştır. Popülasyon gruplarına göre değişim gösteren frekansların tanımlanması da bu açıdan incelenme niteliği kazanmıştır.

Aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın bölgelerde yerleşim gösteren, aynı protein süper ailesine ait olan, yüksek oranda homoloji taşıyan ve aynı reseptörlere bağlanarak işlev gösteren bu genlerin ifade edilmelerini ve protein üretimlerini etkileyen gen polimorfizmlerinin tanımlanması hastalığın patojenitesinin anlaşılması ve risk faktörlerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu amaçla, Türk popülasyonunu yansıtan bir örneklem seçilerek TNF- $\alpha$  (-308 G/A) ve LT- $\alpha$  (+252 A/G) polimorfizmlerinin profillerinin belirlenmesi ve alel frekanslarının tanımlanmasına yönelik bir çalışma planlanmıştır. Plan dahilinde:

1. Hasta ve sağlıklı bireylere ait kan örneklerinden DNA izolasyonu,
2. TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  genlerine ait seçilen SNP bölgelerinin PZR ile çoğaltılması,
3. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin *NcoI* restriksiyon enzimi ile özgül bölgelerinden kesilerek, oluşan fragmentlere göre her bireyin genotip profillerinin belirlenmesi,
4. Elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve Türk popülasyonuna göre ortaya çıkan alel frekanslarının literatürdeki diğer popülasyonlara ait çalışmalarla karşılaştırılması işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi**

Bu araştırma kronik periodontitis ve agresif periodontitis hastaları ile periodontal açıdan sağlıklı bireyler üzerinden yürütülmüştür. Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Bölümü ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Bölümü'nde muayene olan gönüllü 115 agresif ve 109 kronik periodontitisli olmak üzere toplam 224 periodontitis hastası ve 85 sağlıklı bireyden, etik kurallar çerçevesinde EDTA'lı vakumlu tüpler içerisine 5-10 ml kan örnekleri alınarak, +4°C'de saklanmıştır. Çalışmaya katılan bireylerde sistemik hastalık olmamasına dikkat edilmiş ve katılımcılar çalışma hakkında bilgilendirilip, yazılı ve sözlü onayları alınmıştır.

#### **3.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

DNA'lar, QIAmp marka kandan DNA izolasyon kiti ile izole edilmiştir.

- 1) 20 µl QIAGEN Proteazı veya Proteinaz K 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün dibine pipetlendi.
- 2) 200 µl kan örneği mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
- 3) 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 saniye süreyle vortekslendi.
- 4) Örnekler 56°C'de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon süresince her 3 dakikada bir tüpler altüst edilerek karıştırıldı. Süre bitiminde tüpler, kapaktaki damlaların düşmesi için kısaca santrifüje edildi.
- 5) Örneklerle 200 µl % 96-100'lük etanol eklendi ve karışım 15 saniye süresince vortekslendi. Kapaktaki damlaların düşmesi amacıyla tüpler santrifüje edildi.
- 6) Oluşan karışım 2 ml'lik toplama tüplerinde bulunan QIAmp Spin Kolon'a aktarıldı ve 8000 rpm'de 1-1,5 dakika santrifüje edildi. Kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı.

- 7) 500 µl Buffer AW1 ile kolon yıkandı ve temiz bir toplama tüpüne aktarıldı.
- 8) 500 µl Buffer AW2 ile 14000 rpm' de 3 dakika süresince kolon yıkandı ve temiz toplama tüpüne aktarıldı.
- 9) 200 µl Buffer AE ya da distile su ile DNA' ların kolondan ayrılabilmesi için 5 dakika oda ısısında (15-25 °C) bekletildi. Süre bitiminde 8000 rpm' de 1-1,5 dakika santrifüje edildi.
- 10) Tüpteki DNA -20°C' de saklandı.

### **3.3. İzole Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü**

İzolasyon ardından, DNA varlığı agaroz jel elektroforezi yardımı ile kontrol edildi. %1' lik agaroz jel şu şekilde hazırlandı:

1. 1XTBE (Tris-Borat EDTA) tamponu ile %1'lik miktara göre ayarlanan miktarda agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında kaynatıldı.
2. Jelin içerisine DNA'ların boyanmasını ve bu sayede görünür hale gelmesini sağlayan GeneMark marka "safeview" isimli boyadan 5µl eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu işleminin ardından jel, avuç içini yakmayacak bir ısıya (50-60°C) kadar soğuması amacıyla bekletildi. Bu sırada jel tepsisi hazırlandı ve kuyucukların oluşumunu sağlayan taraklar tepsiye yerleştirildi. Yeteri kadar soğuyan jel, tek bir köşeden, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek jel tepsisine döküldü. Polimerleşmesi için 30 dakika beklenildi.
3. Polimerleşen jel elektroforez tankı içerisine alındı. Üzerine 1XTBE tamponu döküldükten sonra taraklar çıkarıldı ve elektroforez tankı tamamen tampon ile dolduruldu.

#### 10XTBE Tamponu (pH 8.3)

1mM Borik asit

20mM EDTA

1mM Tris

4. 2µl DNA örneği alınıp 2µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara sırayla yüklendi.
5. Örnekler, 90V' da yükleme boyasının ilerlemesi takip edilerek yaklaşık 45 dakika boyunca yürütüldü.
6. Jeldeki DNA bantları, 300 nm dalga boyundaki UV lambası kullanılarak gözlemlendi.

#### 6XYükleme Tamponu (25ml)

0,0625 gr Brom fenol mavisi

10 gr Sükroz

15ml 10XTBE tamponu

### **3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu, genomik DNA dizisindeki istenilen bölgelerinin özgül primerler kullanılarak *in vitro*' da  $10^6$  kata kadar çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (Saiki et al., 1988). İlk kez 1985 yılında Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından bulunmuş ve bu buluş 1993'te Kary Mullis'e Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır.

PZR tekniği, prenatal tanı, dizi analizi çalışmaları, mutasyon taramaları, DNA parmak izi gibi çalışmalarda günümüzde sıklıkla kullanılan vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiştir.

PZR tekniği üç temel basamaktan oluşur;

1. Denatürasyon: Bu basamakta çoğaltılacak DNA tek zincirli hale getirilene kadar yaklaşık 5 dakika süre ile 90°-95°C de ısıtılır.
2. Bağlanma (Annealing): İkinci basamakta, sıcaklıklar primerlere özgül olmak koşuluyla 50°-70°C lere düşürölür ve primerlerin DNA tek zincirine bağlanması sağlanır.
3. Uzama (Extension): Uzamanın gerçekleştirildiği bu basamakta, ısıya dayanıklı *Taq polimeraz* enzimi ile yaklaşık 72°C sıcaklık altında dNTP lerin DNA ya 5' → 3' yönünde bağlanması ve çift zincirli DNA ürünün sentezlenmesi sağlanır.

### 3.4.1. TNF- $\alpha$ -308 Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

```
CCAGGCTTGTCCCTGCTACCCCCACCCAGCCTTTCCTGAGGCCTCAAGCCTGCCACCAAGC
CCCCAGCTCCTTCTCCCCGCAGGGACCCAAACACAGGCCTCAGGACTCAACACAGCTTTTC
CCTCCAACCCCGTTTTTCTCTCCCTCAAGGACTCAGCTTTCTGAAGCCCCTCCCAGTTCTAG
TTCTATCTTTTTCTGCATCCTGTCTGGAAGTTAGAAGGAAACAGACCACAGACCTGGTCC
CCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTTTTTGAGGGCCATGGGGACGGGGTTCAGCCT
CCAGGGTCCTACACACAAATCAGTCAGTGGCCCAAGACCCCCCTCGGAAC
GGAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAGGGGTATCCTTGATGCTTGTGTGTCCCAATT
TCCAAATCCCCGCCCGCGATGGAGAAGAAACCGAGACAGAAGGTGCAGGGCCCACTACC
GCTTCTCCAGATGAGCTCATGGGTTTTCTCCACCAAGGAAGTTTTCCGCTGGTTGAATGAT
TCTTTCCCCGCCCTCCTCTCGCCCCAGGGACATATAAAGGCAGTTGTTGGCACACCCAGCC
AGCAGACG
```

Şekil 3.1. TNF- $\alpha$  gen dizisi üzerinde ileri - geri primerlerin ve çoğaltılan 117 baz çiftlik bölgenin gösterimi. İleri primer sarı renk ile, geri primer mavi renk ile ve çoğaltılan bölge ise koyu renkte ve altı çizilerek belirtilmiştir. Çoğaltılan bölge promotor bölgesinde yer aldığı için, şekilde sadece genin promotor kısmına yer verilmiştir. İleri primer üzerinde bulunan ve yeşil renkle gösterilen tek nükleotit, primerin mis-match primer olduğunun göstergesidir. Genin normal dizisinde G olarak kodlanan nükleotit primer üzerinde C ile yer değiştirilmiş ve *NcoI* enzimi için kesim noktası oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. TNF- $\alpha$  (-308) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.

Bileşen	1 X 50 $\mu$ l
Kalıp DNA	2 $\mu$ l
10X PZR Tamponu	5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
10 mM dNTP karışımı	0,2 $\mu$ l
100 pmol ileri primer	0,1 $\mu$ l
100 pmol geri primer	0,1 $\mu$ l
Hot Start Taq polimeraz	0,1 $\mu$ l
Steril distile H <sub>2</sub> O	42 $\mu$ l

### **PZR Koşul**

Ön Denatürasyon	95°C	15 dakika	
Denatürasyon	94°C	1 dakika	} 35 Döngü
Bağlanma	60°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	

TNF- $\alpha$  (-308) primer dizisi:

İleri (F) primer: 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3'

Geri (R) primer: 5' ACA CTC CCC ATC CTC CCG GCT 3'

TNF- $\alpha$  (-308) gen bölgesinin PZR'si için; Çizelge 3.1' de verilen miktarlarda hazırlanan karışım ile kalıp DNA buz üzerinde iyice karıştırılarak Biometra marka Thermal Cycler cihazına konulmuştur. Reaksiyon yukarıda verilen sıcaklık koşullarında ve sürelerinde 35 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.2. LT- $\alpha$ +252 Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

AGCCTCACCCATGTGGAATTCTGAAACTTCCTTTGTAGAAAACCTTGGAAGGTGTCTGCC  
ACATTGATCCTGGAATGTGTGTTTATTTGGGGTTATATAAATCTGTTCTGTGGAAGCCAC  
CTGAAGTCAGGAAGAGATGGAGGGCATCCTTCAGGAGTGAGATGAGACCTCATCATACTT  
GACTGTCCAGCATCATCTCTGAGTAAGGGGACCAAAAAATTTATCTTCCAAACTAGGACA  
CTTTCAAGAGTGGAAGGGGGATCCATTAATATTTTCACCTGGACAAGAGGGCAAACACCAG  
AATGTCCCCGATGAAGGGGATATATAATGGACCTTCTTGATGTGAAACCTGCCAGATGGG  
CTGGAAGTCCGTATACTGGGACAAGTATGATTTGAGTTGTTTGGGACAAGGACAGGGGT  
ACAAGAGAAGGAAATGGGCAAAGAGAGAAGCCTGTACTCAGCCAAGGGTGCAGAGATGTT  
ATATATGATTGCTCTTCAGGGAAACCGGGCTCCAGCTCACACCCCAGCTGCTCAACCACC  
TCCTCTCTGAATTGACTGTCCCTTCTTTGGAACCTAGGCCTGACCCCACTCCCTGGCCC  
**TCCCAGCCCACGATTCCCCTGACCCGACTCCCTTTCCAGAACTCAGTCGCCTGAACCCC**  
**CAGCCTGTGGTTCTCTCCTAGGCCTCAGCCTTTCTGCCTTTGACTGAAACAGCAGTATC**  
**TTCTAAGCCCTGGGGGCTTCCCCGGGCCCCAGCCCCGACCTAGAACCCGCCCGCTGCCTG**  
**CCACGCTGCCACTGCCGCTTCTCTATAAAGGGACCTGAGCGTCCGGGGCCAGGGGCTCC**  
**GCACAGCAGGTGAGGCTCTCCTGCCCATCTCCTTGGGCTGCCCGTGCTTTCGTGCTTTGG**  
**ACTACCGCCCAGCAGTGTCTGCCCTCTGCCTGGGCCTCGGTCC** **CTCCTGCACCTGCT**  
**GCCTGGATCCCCGGCCTGCCTGGGCCTGGGCCTTG** **GTGGGTTTGGTTTTGGT**  
**TTCTTTCTCTGTCTCTGACTCTCCATCTGTCTCAGTCTCATTGTCTCTGTCAACA**  
**CATTCTCTGTTTCTGCCATGATTCTCTCTGTTCCCTTCTGTCTCTCTCTG**  
**TCTCCCTCTGCTCACCTTGGGGTTTCTCTGACTGCATCTTGTCCCTTCTCT**  
**GTCGATCTCTCTCTCGGGGGTCCGGGGGTGCTCTCTCCCAGGGCGGGAGGTC**  
**TGTCTTCCGCCGCGTGCCCCGCCCGCTCACTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCT**  
**TTCTCTGCAG** **GTTCTCCCC** **ATGACACCACCTGAACGTCTTTC** **CTCCAAGGG**

Şekil 3.2. LT- $\alpha$  geninin promotor bölgesini (mavi), ilk intronunu (siyah) ve ekzonlarını (kırmızı) içeren nükleotit sekansı. LTA +252 polimorfizminin bulunduğu çoğaltılan ilk intron bölgesi ve kullanılan ileri (sarı) ve geri (yeşil) primerler. Koyu ve altı çizili olarak belirtilen dizi PZR sonucu çoğaltılan bölgeyi ifade etmektedir.

LT- $\alpha$  geni intron bölgesi çoğaltılmasını gerçekleştirmek için primer, dNTP, Taq polimeraz ve kalıp DNA miktarı, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve primer bağlanma (annealing) derecesi parametrelerinin optimizasyonu, gradiyentli PZR kullanılarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. LT- $\alpha$  (+252) gen bölgesinin çoğaltılması için optimize edilen bileşen miktarları.

Bileşen	1 X 50 $\mu$ l
Kalıp DNA	4 $\mu$ l
10X PZR Tamponu	5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
10 mM dNTP karışımı	0,3 $\mu$ l
100 pmol ileri primer	0,2 $\mu$ l
100 pmol geri primer	0,2 $\mu$ l
Taq polimeraz	0,2 $\mu$ l
Steril distile H <sub>2</sub> O	41 $\mu$ l

### **PZR Koşul**

Ön Denatürasyon	94°C	3 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	} 32 Döngü
Bağlanma	65°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Son Uzama	72°C	5 dakika	

### **LT- $\alpha$ (+252) primer dizisi:**

İleri (F) primer: 5' CTC CTG CAC CTG CTG CCT GGA TC 3'

Geri (R) primer: 5' GAA GAG ACG TTC AGG TGG TGT CAT 3'

LT- $\alpha$  (+252) gen bölgesinin PZR' si için; Çizelge 3.2' de verilen miktarlarda hazırlanan karışım ile kalıp DNA buz üzerinde iyice karıştırılarak Biometra marka Thermal Cycler cihazına konulmuştur. Reaksiyon yukarıda verilen sıcaklık koşullarında ve sürelerinde 32 döngü boyunca gerçekleştirilmiştir.

### **3.4.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü**

PZR işleminden sonra oluşan fragmentlerin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Oluşan ürünlerin uzunluklarını belirlemek amacı ile 100-1000 baz çiftlik Gene Ruler belirteç kullanılmıştır.

#### **3.4.3.1. TNF- $\alpha$ PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü**

PZR işleminin ardından oluşan ürünler, 30 ml hacminde 0,5  $\mu$ l Etidyum bromür içeren % 1,5' luk agaroz jele 8  $\mu$ l PZR ürünü ve 2  $\mu$ l yükleme boyası olmak üzere yüklenmiştir. Oluşan bantlar 90 Voltluk elektroforetik alanda 45 dakika boyunca 1XTBE tamponu içerisinde yürütülmüş ve Syngene Gene Genius Bio Imaging jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

#### **3.4.3.2. LT- $\alpha$ PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü**

Lenfotoksin alfa geninin ilk intron bölgesi üzerinde bulunan +252 A/G tek nükleotit polimorfizmini belirlemek amacıyla, 368 baz çiftlik bir bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve oluşan üründen 8  $\mu$ l % 1,5'luk agaroz jel kuyucuklarına yüklenerek kontrol edilmiştir. Ürünlerin 45 dakika boyunca 90 Voltluk akımda yürütülmesinin ardından, 368 baz çifti büyüklüğündeki bantlar Major Science UVDI cihazı ile fotoğraflanmıştır.

### **3.5. Gen Bölgelerindeki Polimorfizmlerin Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) ile Belirlenmesi**

TNF- $\alpha$  -308 G/A ve LT- $\alpha$  +252 A/G gen polimorfizmlerini belirlemek amacıyla Fermentas marka *Nco*I restriksiyon endonükleazları kullanılmıştır.

#### ***Nco*I Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Tanıma Dizisi**

5'...C $\nabla$ CATGG...3'

3'...GGTAC $\nabla$ C...5'

### 3.5.1. TNF- $\alpha$ -308 G/A Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi

TNF genine ait PZR ürünleri, aşağıda verilen ölçülerde enzim, tampon ve su ile tepkimeye sokularak enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C de 12-16 saat kesim işlemine tabii tutulmuştur.

	<u>1x 15 <math>\mu</math>l</u>
PZR ürünü	10 $\mu$ l
10xEnzim Tamponu	1,5 $\mu$ l
<i>Nco</i> I (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l (10 U)
Steril distile su	2,5 $\mu$ l

Kesim sonucu oluşan fragmentler, boyutlarının küçük olması nedeniyle % 3 lük agaroz jelde yürütülmüştür. Restriksiyon ürünlerin büyüklüklerini ölçmek amacı ile Gene Ruler DNA markırı kullanılmıştır. Her bir kesim ürününden 15  $\mu$ l ve yükleme boyasından 2  $\mu$ l karıştırılarak, Etidyum bromür yerine kullanılan 5  $\mu$ l Safeview boyası eklenilen %3 lük 90 ml agaroz jele yüklenmiş ve 1XTBE tamponu içerisinde 1 saat boyunca 60 Voltluk akımda bantların ayrılması sağlanmıştır. Oluşan bantların Major Science UVDI cihazı ile fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.5.2. LT- $\alpha$ +252 A/G Tek Nükleotit Polimorfizminin RFLP ile Belirlenmesi

Lenfotoksin- $\alpha$  genine ait PZR ürünleri, aşağıda verilen ölçülerde enzim, tampon ve su ile tepkimeye sokularak enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C de 12-16 saat kesim işlemine tabii tutulmuştur.

	<u>1x 15 <math>\mu</math>l</u>
PZR ürünü	10 $\mu$ l
10xEnzim Tamponu	1,5 $\mu$ l
<i>Nco</i> I (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l (10U)
Steril distile su	2,5 $\mu$ l

Kesilen PZR ürünleri sonucu oluşan fragmentler, 5 µl Safeview eklenmiş %2 lik 90 ml agaroz jel üzerindeki kuyucuklara, 15 µl PZR ürünü ve 2 µl yükleme boyası karışımı eklenerek yürütülmüştür. Bu işlem 50 dakika süresince ve 80 voltluk elektroforetik alanda gerçekleştirilmiş ve kesime uğramış PZR ürünleri büyüklüklerine göre jelde ilerlemiştir. Elektroforez işleminin ardından jel, Major Science UVDI ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### **3.6. İstatistiksel Analizler**

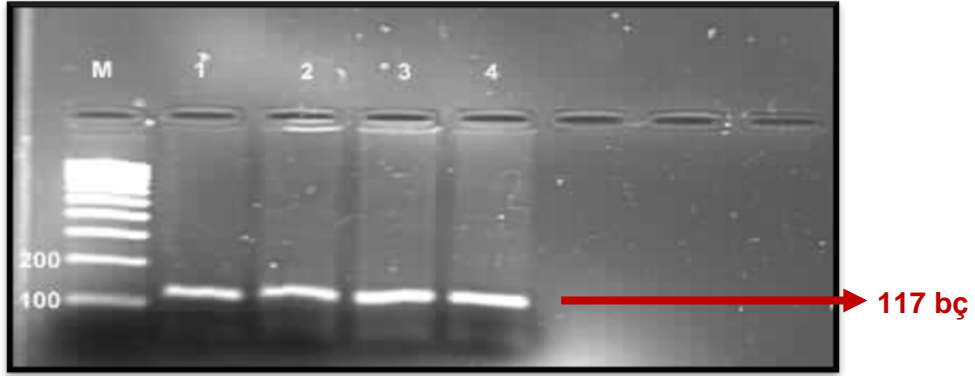
Araştırmamızda, elde edilen verileri değerlendirebilmek için SPSS version 15.0 for Windows (SPSS, Inc, USA) istatistik paket programı kullanılmıştır. Çalışma gruplarımız olan kronik periodontitis, agresif periodontitis ve kontrol grupları arasında TNF- $\alpha$  (-308 G/A) ve LT- $\alpha$  (+252 A/G) gen polimorfizm frekansları açısından fark bulunup bulunmadığı Ki-kare (Pearson Ki-kare, Fisher' in kesin Ki-kare testi) testleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hasta ve sağlıklı bireylerin cinsiyet ve yaş dağılımlarının belirlenmesinde de yine Ki-kare testi kullanılmıştır. Farkları  $p < 0.05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. PZR Sonuçları

#### 4.1.1. TNF- $\alpha$ Geni PZR Sonuçları

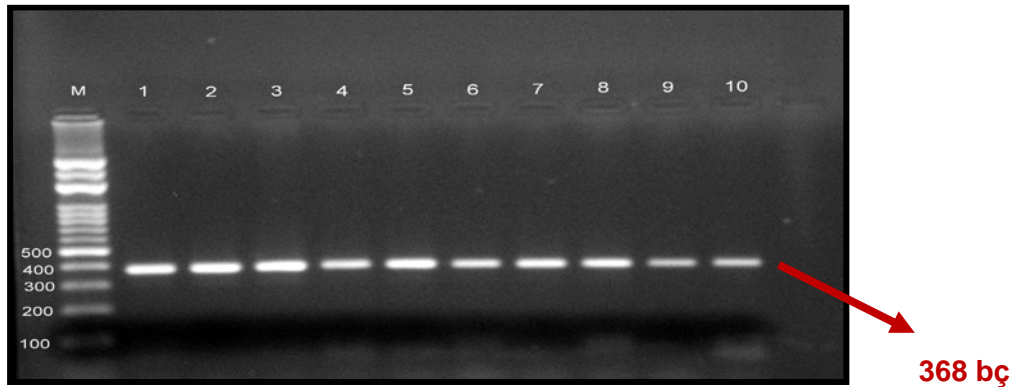
Periodontitis ile ilişkili TNF- $\alpha$  geninin promotor bölgesine ait (-308) pozisyondaki polimorfizmi içeren gen dizisinin PZR yöntemi ile çoğaltılması sonucu 117 baz çifti büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir.



Şekil 4.1. TNF- $\alpha$  promotor -308 bölgesindeki polimorfizmi içeren 117 baz çiftlik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi.

#### 4.1.2. LT- $\alpha$ Geni PZR Sonuçları

Hastalık ile ilişkili olduğu düşünülen LT- $\alpha$  geninin ilk intron bölgesine ait (+252) pozisyondaki polimorfizmi içeren gen dizisinin PZR yöntemi ile çoğaltılması sonucu 368 baz çifti büyüklüğünde ürünler elde edilmiştir.



Şekil 4.2. LT- $\alpha$  intron +252 bölgesindeki polimorfizmi içeren 368 baz çiftlik bölgenin amplifikasyon sonrası agaroz jelde görüntülenmesi.

## 4.2. RFLP Sonuçları

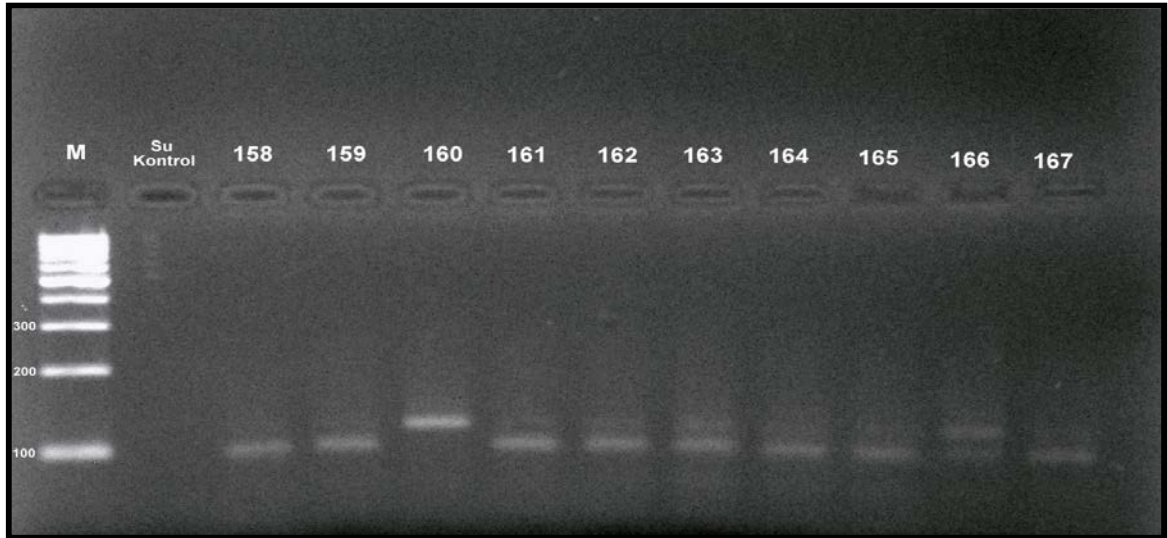
Yapılan çalışmada, 109 kronik, 115 agresif olmak üzere toplam 224 periodontitis hastası ve 85 sağlıklı bireyin kan örneklerinden elde edilen DNA'nın, PZR ile çoğaltılmasından sonra TNF- $\alpha$  (-308) ve LT- $\alpha$  (+252) genlerine ait RFLP polimorfizmleri incelenmiştir.

### 4.2.1. TNF- $\alpha$ (-308) Promotor Bölgesinin *NcoI* Enzimi ile Kesim Sonuçları

TNF- $\alpha$  (-308) G $\rightarrow$ A polimorfizmini belirlemek üzere yapılan kesimler sonucu;

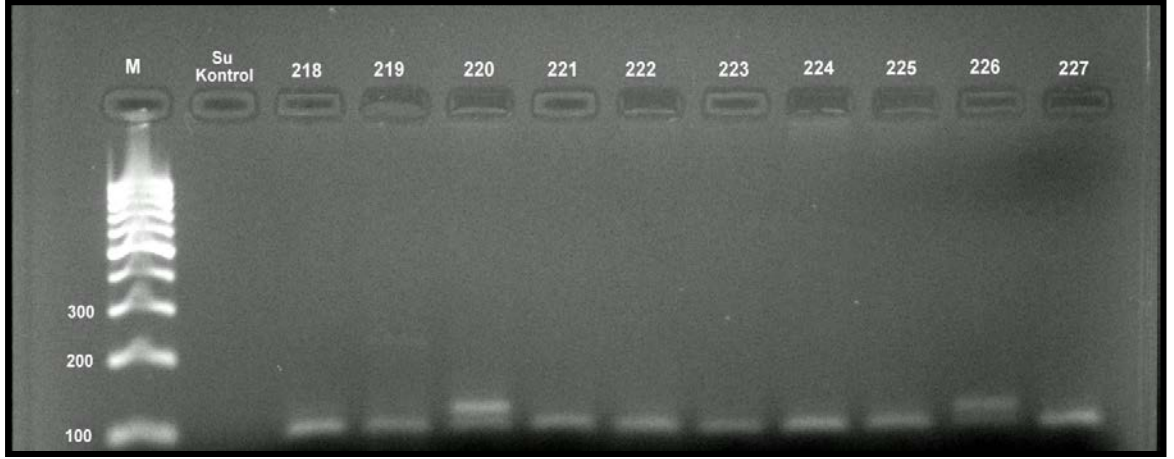
1. Homozigot TNF- $\alpha$  (-308) GG genotipi: 97bç + 20bç uzunluğunda iki fragment
2. Heterozigot TNF- $\alpha$  (-308) GA genotipi: 117bç + 97bç + 20bç uzunluğunda üç fragment
3. Homozigot TNF- $\alpha$  (-308) AA genotipi: 117bç uzunluğunda kesime uğramamış olan polimorfizm içeren fragment oluşmuştur.

Jel görüntüleri sonucunda elde edilen fragmentler bu üç genotip açısından değerlendirilmiş ve bireylerin TNF- $\alpha$  (-308) polimorfizmine ait genotip profilleri belirlenmiştir.

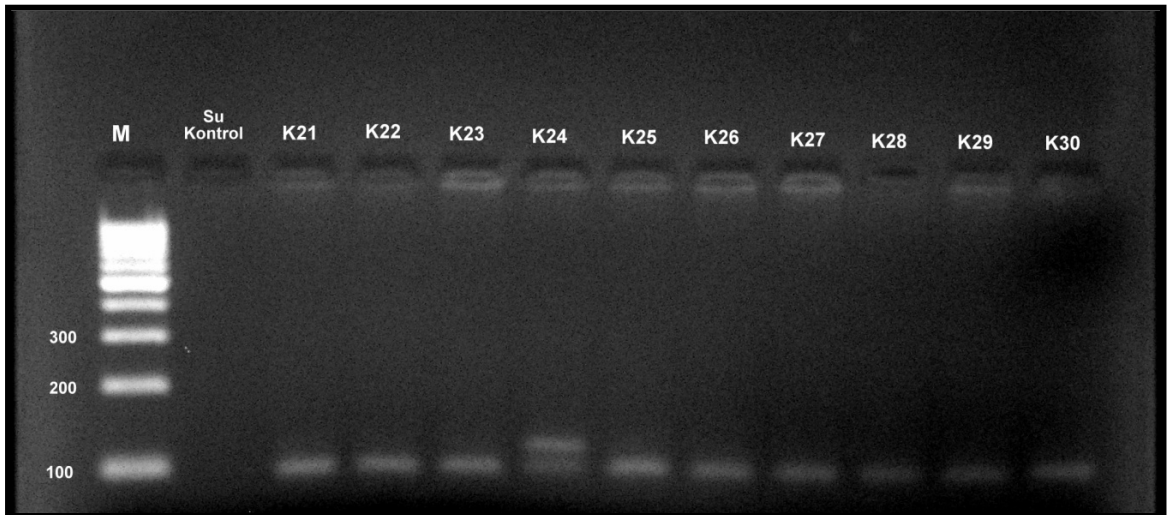


Şekil 4.3. TNF- $\alpha$  (-308) bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesimi sonucu 158-167 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik markır ifade edilmektedir.

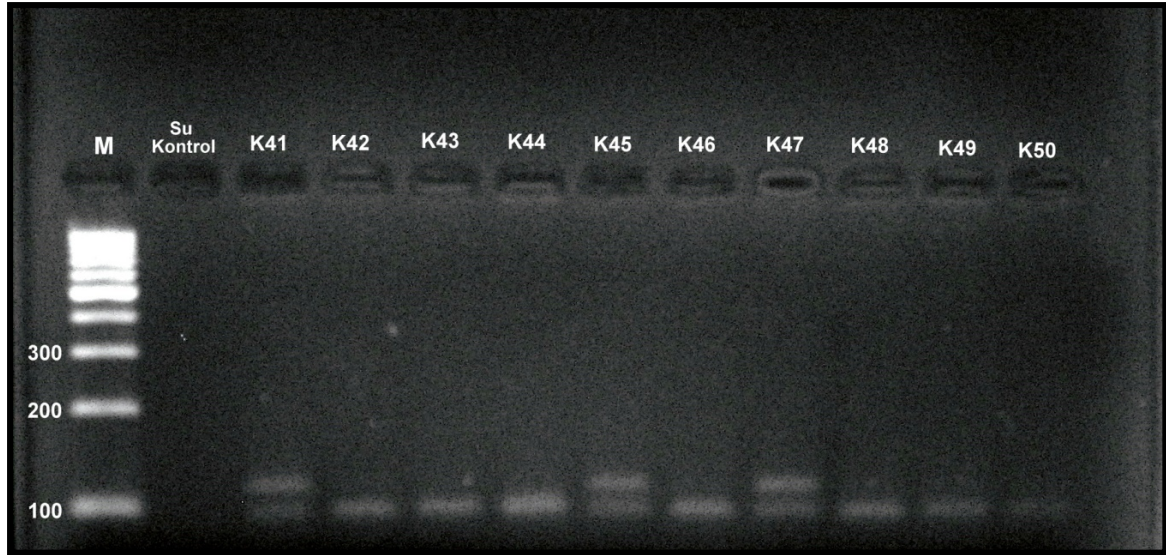
TNF- $\alpha$  (-308) tek nükleotit polimorfizmini taşıyan tek örnek, Şekil 4.3' te beşinci kuyucukta bulunan 160 numaralı bireydir. Homozigot AA genotipini taşıyan bu örnekte RFLP sonucu kesilmeden kalan tek bir fragment gözlenmiştir. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da bulunan örneklerden 220, 226, K24, K41, K45 ve K47 heterozigot genotipi (GA) ifade ederken; diğer örnekler homozigot GG genotipini göstermektedirler.



Şekil 4.4. TNF- $\alpha$  (-308) bölgesinin *Nco*I enzimi ile kesimi sonucu 218-227 numaralı hastalardan elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik markır ifade edilmektedir.



Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait 21-30 numaralı bireylerin TNF- $\alpha$  (-308) bölgesinin *Nco*I enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik markır ifade edilmektedir.



Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait 41-50 numaralı bireylerin TNF- $\alpha$  (-308) bölgesinin *Nco*I enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik markır ifade edilmektedir.

Elde edilen RFLP sonuçlarına göre periodontitisle ilişkili olduğu düşünülen TNF- $\alpha$  (-308) AA homozigot genotipi, kontrol ve KP grubunda gözlenmezken; AP hasta grubunda sadece bir hastada gözlenmiştir ve frekansı % 0,9 olarak belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  (-308) GG genotipi, AP grubunda 61 (%53) hastadan, KP grubunda 74 (%67,9) hastadan ve sağlıklı grubundaki 75 (%88,2) bireyden elde edilmiştir. Heterozigot genotip olan TNF- $\alpha$  (-308) GA genotipine ise kontrol grubunda 10 (%11,8) bireyde, KP grubunda 35 (%32,1) hastada ve AP grubunda 53 (%46,1) hastada rastlanmıştır (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. TNF- $\alpha$  (-308) gen bölgesi RFLP sonuçlarının hasta ve kontrol gruplarındaki sayı ve yüzde dağılımı

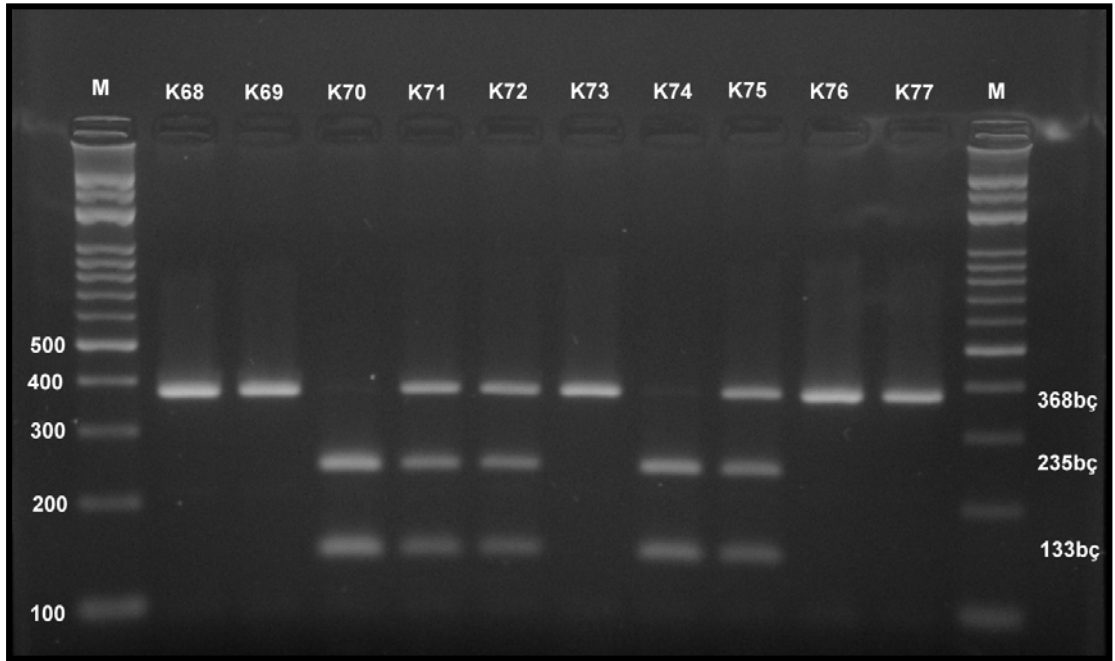
TNF- $\alpha$ (-308) Genotipleri	Kontrol Grubu n=85 Sayı (%)	Kronik Periodontitis n=109 Sayı (%)	Agresif Periodontitis n=115 Sayı (%)
Homozigot GG genotipi	75 (%88,2)	74 (%67,9)	61 (%53,1)
Heterozigot GA genotipi	10 (%11,8)	35 (%32,1)	53 (%46,1)
Homozigot AA genotipi	0 (%0)	0 (%0)	1 (%0,9)

#### 4.2.2. LT- $\alpha$ (+252) İtron Bölgesinin *NcoI* Enzimi ile Kesim Sonuçları

LT- $\alpha$  (+252) A→G tek nükleotit polimorfizmini belirlemek üzere yapılan kesimler sonucu;

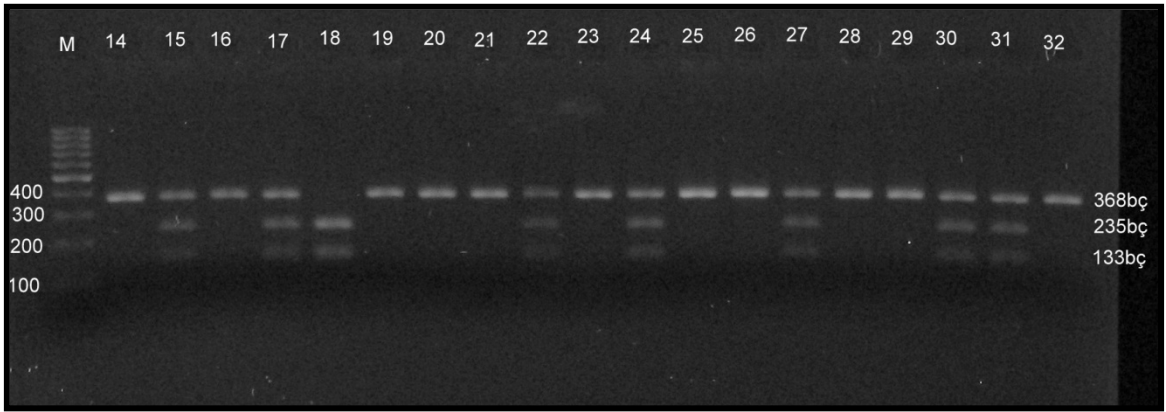
1. Homozigot LT- $\alpha$  (+252) AA genotipi: 368 bç uzunluğunda kesime uğramamış tek fragment,
2. Heterozigot LT- $\alpha$  (+252) AG genotipi: 368bç + 235bç + 133bç uzunluğunda üç fragment,
3. Homozigot LT- $\alpha$  (+252) GG genotipi: polimorfik bölgeden kesime uğramış 235bç + 133bç uzunluğunda iki fragment oluşmuştur.

Jel görüntüleri sonucunda elde edilen fragmentler üç ayrı genotip açısından değerlendirilmiş ve bireylerin LT- $\alpha$  (+252) polimorfizmine ait profilleri belirlenmiştir.

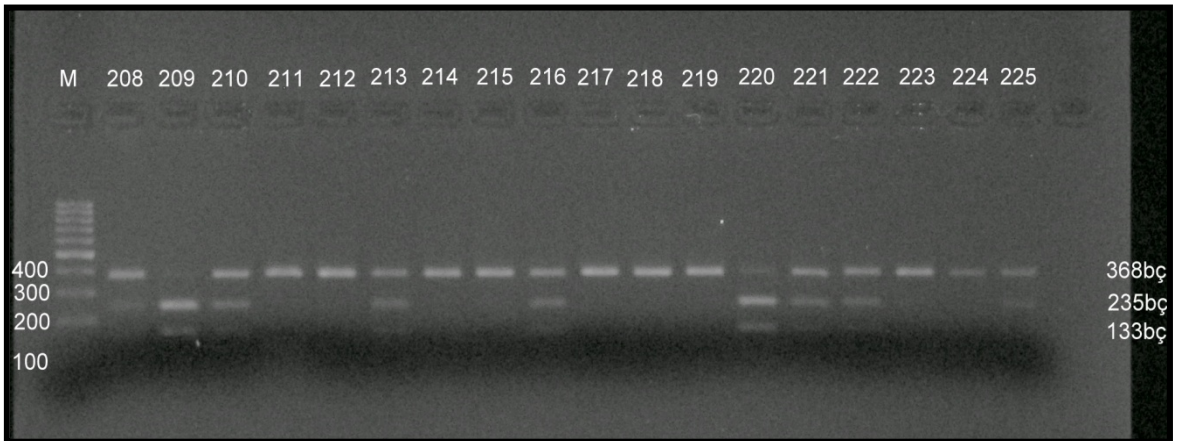


Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait K68-K77 numaralı bireylerin LT- $\alpha$  (+252) bölgesinin *NcoI* enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik belirteç ifade edilmektedir.

Şekil 4.7' de her üç genotipe ait fragmenti içeren bir jel görüntüsü yer almaktadır. Bu şekle göre K68, K69, K76 ve K77 numaralı örnekler LT- $\alpha$  (+252) A/G polimorfizmini taşımadığından *Nco*I enzimi ile kesilmemiş ve 368 baz çiftlik tek bir fragment olarak kalmıştır. K70 ve K74 numaralı örnekler ise LT- $\alpha$  (+252) bölgesine ait tek nükleotit polimorfizmini içerdiğinden dolayı *Nco*I enzimi ile kesime uğramış ve sonuç olarak 235 baz çiftlik ve 133 baz çiftlik olmak üzere iki fragment oluşumu gözlenmiştir. Heterozigot genotipe sahip olan örnekler ise K71, K72, K75 numaralı bireylerdir ve kesim sonucu 368, 235 ve 133 baz çiftlik üç ayrı fragment oluşmuştur.



Şekil 4.8. Hasta grubuna ait 14-32 numaralı bireylerin LT- $\alpha$  (+252) bölgesinin *Nco*I enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik belirteç ifade edilmektedir.



Şekil 4.9. Hasta grubuna ait 208-225 numaralı bireylerin LT- $\alpha$  (+252) bölgesinin *Nco*I enzimi ile kesimi sonucu elde edilen RFLP ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. M harfi ile 100-1000 baz çiftlik belirteç ifade edilmektedir.

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9' da hasta grubuna ait örneklerin kesim sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre Şekil 4.8' deki 18 numaralı örnek ve Şekil 4.9' daki 209 ve 220 numaralı örnekler, LT- $\alpha$  (+252) A/G gen polimorfizmi taşıyan ve homozigot GG genotipine sahip olan bireylerdir. Heterozigot genotipe sahip bireyler ise 15, 17, 22, 24, 30, 31, 208, 210, 213, 216, 221, 222 ve 225 numaralı bireylerde gözlenmiştir.

LT- $\alpha$  genine ait RFLP sonuçlarına göre, hasta grubuna ait 120 (%53,6) bireyde LT- $\alpha$  (+252) AA genotipi, 90 (40,2) bireyde LT- $\alpha$  (+252) AG heterozigot genotipi ve 14 (%6,3) bireyde +252 bölgesinde A/G polimorfizmini taşıyan LT- $\alpha$  (+252) GG genotipi gözlenmiştir. Sağlıklı bireylere ait LT- $\alpha$  geni kesimlerinden, 52 bireyde (%61,2) homozigot AA genotipi, 27 (%31,8) bireyde heterozigot AG genotipi ve 6 bireyde (%7,1) homozigot GG genotipi saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. LT- $\alpha$  (+252) gen bölgesi RFLP sonuçlarının kontrol, AP ve KP gruplarındaki sayı ve yüzdeleri

LT- $\alpha$ (+252) Genotipleri	Kontrol Grubu n=85 Sayı (%)	Kronik Periodontitis n=109 Sayı (%)	Agresif Periodontitis n=115 Sayı (%)
Homozigot AA genotipi	52 (%61,2)	60 (%55)	60 (%52,2)
Heterozigot AG genotipi	27 (%31,8)	40 (%55)	50 (%43,5)
Homozigot GG genotipi	6 (%7,1)	9 (%8,3)	5 (%4,3)

### 4.3. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kullandığımız gruplar, ilk olarak cinsiyet açısından değerlendirilmiş ve kontrol, KP ve AP grupları arasında cinsiyet açısından herhangi bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Sağlıklı bireylerle hasta bireylerin karşılaştırılması yapıldığında, kadın ve erkek hastaların periodontitise yatkınlığı açısından istatistiksel anlamda sınırda anlamlı ( $p=0.054$ ) bir fark bulunmuştur. Bu sonuca göre çalışmamızdaki hasta grubunun %43,8' ini erkekler oluştururken, %56,2' sini kadınlar oluşturmaktadır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=85) Sayı (%)	Periodontitis (n=224) Sayı (%)	X <sup>2</sup> testi
Erkek	28 (%33)	98 (%43,8)	p=0,054
Kadın	57 (%67)	126 (%56,2)	

Çizelge 4.4. Kontrol ve AP gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=85) Sayı (%)	AP (n=115) Sayı (%)	X <sup>2</sup> testi
Erkek	28 (%33)	39 (%34)	p=0,886
Kadın	57 (%67)	76 (%66)	

Kontrol ve periodontitis grupları arasında sınırda anlamlı farkın, hangi periodontitis tipinden kaynaklandığını bulmak amacıyla, AP-kontrol ve KP-kontrol karşılaştırmalarının da yapılması gerektiği düşünülmüştür. Sağlıklı bireyler ile AP hastaları cinsiyet açısından karşılaştırıldığında, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.4). Dolayısıyla, cinsiyetin AP hastalığının taşınmasında önemli bir etken olmadığı düşünülmüştür.

Çizelge 4.5. Kontrol ve KP gruplarının cinsiyet açısından karşılaştırılması

	Kontrol (n=85) Sayı (%)	KP (n=109) Sayı (%)	X <sup>2</sup> testi
Erkek	28 (%33)	59 (%54,1)	p=0,003
Kadın	57 (%67)	50 (%45,9)	

Kronik periodontitis hastaları ve sağlıklı bireyler arasında yapılan karşılaştırma sonucunda, cinsiyet grupları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Kontrol ve hasta gruplarına ait diğer bir değerlendirme yaş ölçütüne göre gerçekleştirilmiştir. Periodontitis sınıflaması için daha önceleri kullanılan bir belirteç olan 30 yaş, sınır olarak seçilmiş ve bireyler 30 ve 30 yaşın altı bir grup, 30 yaşın üstü diğer grup olmak üzere iki kategoride toplanmışlardır. Yaşa bağlı olarak

yapılan istatistiksel değerlendirmede, her iki hastalık tipi için de yaş grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Kontrol ve AP gruplarının yaşa göre değerlendirilmesi

	Kontrol (n=85) Sayı (%)	AP (n=115) Sayı (%)	X <sup>2</sup> testi
≤ 30 yaş	78 (%91.7)	50 (%43.5)	p<0,05*
> 30 yaş	7 (%8.3)	65 (%56.5)	

\*İstatistiksel olarak anlamlı bulunan fark.

Çizelge 4.7. Kontrol ve KP gruplarının yaşa göre değerlendirilmesi

	Kontrol (n=85) Sayı (%)	KP (n=109) Sayı (%)	X <sup>2</sup> testi
≤ 30 yaş	78 (%91.7)	17(%15.6)	p<0,05*
> 30 yaş	7 (%8.3)	92 (%84.4)	

\*İstatistiksel olarak anlamlı bulunan fark.

Yapılan RFLP analizleri sonucu elde edilen her iki gene ait veriler, AP, KP ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiştir. TNF- $\alpha$  (-308) polimorfizmi genotiplerine göre yapılan karşılaştırmada, agresif periodontitis ve kontrol grubu arasında, TNF- $\alpha$  (-308) AA genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken (p=0,389); TNF- $\alpha$  (-308) GG ve TNF- $\alpha$  (-308) GA genotipleri açısından ortaya çıkan fark anlamlıdır (p<0,05). Kontrol ve AP grupları, TNF- $\alpha$  (-308) alel frekanslarındaki farklılıklar da istatistiksel olarak test edilmiş ve A alelinin farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.8).

TNF- $\alpha$  (-308) polimorfizmi genotipleri ve alel frekansları arasında farkın bulunup bulunmadığı, kontrol ve KP grupları arasında da değerlendirilmiştir. Bu iki grup içerisinde TNF- $\alpha$  (-308) AA genotipini taşıyan bireye rastlanmadığı için, AA genotipine ait test sonucu elde edilememiştir. AP-Kontrol karşılaştırmasında olduğu gibi, KP-Kontrol arasında da TNF- $\alpha$  (-308) GG ve TNF- $\alpha$  (-308) GA genotipleri ve A aleli açısından ortaya çıkan farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  genotiplerinin ve alel frekanslarının kontrol ve AP grupları arasında değerlendirilmesi

			KONTROL	AP	p değeri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Genotip	GG	75 (%88,2)	61 (%53)	0,000
		GA	10 (%11,8)	53 (%46,1)	0,000
		AA	0 (%0)	1 (%0,9)	0,389
			n=85	n=115	
	Alel frekansı	G aleli	160 (%94,1)	175 (%76)	0,340
		A aleli	10 (%5,9)	55 (%24)	0,000
			n=170	n=230	
<b>LT-<math>\alpha</math></b>	Genotip	AA	52 (%61,1)	60 (%52,2)	0,165
		AG	27 (%31,8)	50 (%43,5)	0,092
		GG	6 (%7,1)	5 (%4,3)	0,406
			n=85	n=115	
	Alel frekansı	A aleli	131 (%77,1)	170 (%74)	0,475
		G aleli	39 (%22,9)	60 (%26)	0,250
			n=170	n=230	

LT- $\alpha$  (+252) polimorfizmine ait RFLP sonuçlarına göre, kontrol, KP ve AP grupları arasında değerlendirmeler yapılmıştır. LT- $\alpha$  (+252) geninin her üç genotipinde de, agresif periodontitis ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenememiştir. LT- $\alpha$  (+252) geni alel frekansları bakımından yapılan değerlendirmede de, sağlıklı ve agresif periodontitisli bireylerden oluşan iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.8). Kronik periodontitis ve kontrol grupları arasında LT- $\alpha$  (+252) genotip ve alel frekansları açısından fark bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla Pearson Ki-kare ve Fisher'in Kesin Ki-kare testleri yapılmış ve istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir sonuca rastlanmamıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. TNF- $\alpha$  ve LT- $\alpha$  genotiplerinin ve alel frekanslarının kontrol ve KP grupları arasında değerlendirilmesi

			KONTROL	KP	p değeri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Genotip	GG	75 (%88,2)	74 (%67,9)	0,001
		GA	10 (%11,8)	35 (%32,1)	0,001
		AA	0 (%0)	0 (%0)	-
			n=85	n=109	
	Alel frekansı	G aleli	160 (%94,1)	183 (%84)	-
		A aleli	10 (%5,9)	35 (%16)	0,001
			n=170	n=218	
<b>LT-<math>\alpha</math></b>	Genotip	AA	52 (%61,1)	60 (%55,0)	0,391
		AG	27 (%31,8)	40 (36,7)	0,473
		GG	6 (%7,1)	9 (%8,3)	0,757
			n=85	n=109	
	Alel frekansı	A aleli	131 (%77,1)	160 (%73,4)	0,703
		G aleli	39 (%22,9)	58 (%26,6)	0,366
			n=170	n=218	

Son olarak TNF- $\alpha$  (-308) genine ait RFLP sonuçları, agresif periodontitis ve kronik periodontitis grupları arasında test edilmiştir (Çizelge 4.10). TNF- $\alpha$  (-308) heterozigot GA genotipi, AP grubunda KP grubundan daha sık görülürken; TNF- $\alpha$  (-308) homozigot GG genotipi KP grubunda daha sık bulunmaktadır. TNF- $\alpha$  (-308) GG genotipinin, KP grubunda AP grubundan fazla bulunması istatistiksel açıdan anlamı bir sonuç olarak bulunmuştur (p=0,023). Heterozigot genotipin, AP grubunda fazla bulunması istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklıdır (p=0,032). Polimorfizme neden olan A alelinin frekans farkının, AP ve KP grupları arasında değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlenmiştir (p=0,019).

Çizelge 4.10. TNF- $\alpha$  (-308) genotiplerinin ve alel frekanslarının KP ve AP hastalarında karşılaştırılması

TNF- $\alpha$ (-308)		KP	AP	p değeri
Genotip	GG	74 (%67,9)	61 (%53)	0,023
	GA	35 (%32,1)	53 (%46,1)	0,032
	AA	0 (%0)	1 (%0,9)	0,329
		n=109	n=115	
Alel frekansı	G aleli	183 (%84)	175 (%76)	0,307
	A aleli	35 (%16)	55 (%24)	0,019
		n=218	n=230	

## 5. TARTIŞMA

Periodontitis, patojen mikroorganizma kaynaklı ürünlere verilen bağışıklık cevap sonucu başlatılan ve gerek çevresel gerekse genetik etmenlerin kompleks etkileriyle oluşan, çok faktörlü, enfeksiyonel bir hastalıktır (Kornman et al., 1997; Bascones-Martinez et al., 2009). Konakçının yangısal cevabına etkisi olabilecek genetik değişiklikler, periodontitise yatkınlık ve hastalığın gidişatı açısından önem taşımaktadır (Okada and Murakami, 1998).

Genetik koda ait bazı varyasyonlar, kodlanan genin farklı ifadesi ya da fonksiyonel değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Farklı genotipe sahip bireylerin oluşmasına yol açan bu durum, bireylerin hastalığa yatkınlıklarını ve hastalığın ciddiyetini arttırabilmektedir (Craandijk et al., 2002). Genler üzerinde meydana gelen bu değişiklikler, hastalıklar söz konusu olduğunda koruma ya da risk faktörü olarak karşımıza çıkabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda hastalıklar ile genetik polimorfizmler arasında bulunduğu düşünülen bağlantıyı ortaya çıkarmak ve hastalıklara ilişkin aday genleri tespit etmek, hastalığa tanı koymada ve tedavi yollarını belirlemede en güvenilir yol gösterici olarak ön plana çıkmıştır.

Bağışıklık ve yangısal cevap ile bağlantılı birçok gen polimorfizminin, periodontitis gibi yangısal bileşeni olan hastalıklara karşı olan hassasiyeti ve hastalığın şiddetini arttırdığı bilinmektedir (Wilson, 2008). TNF- $\alpha$  geninin, periodontitis ile ilişkili olarak neden iyi bir aday gen olduğu üzerinde birçok tartışma mevcuttur. TNF- $\alpha$ ' nın periodontitis açısından önemli olmasının ilk nedeni, öncül yangısal karaktere sahip önemli bir bağışıklık düzenleyicisi olmasından kaynaklanmaktadır. TNF- $\alpha$ ' nın, kemik rezorpsiyonu kapasitesinde artış ve periodontal ligamentin oluşumuna yönelik fibroblast hücre farklılaşması gibi hastalık etkileri ile paralel fonksiyonlarının bulunması, bu sitokinin periodontitis patolojisinde önemli bir rolü olduğunun kanıtıdır (Manolagas, 1995; Birkedal-Hansen, 1993). İkinci neden olarak, periodontitisli olan ve periodontitisli olmayan bireylerden alınan periferik kan hücreleri ve lökositlerde, bireyler arası farklı TNF- $\alpha$  seviyelerinin saptanması gösterilmektedir (Pociot et al., 1993; Galbraith et al., 1998). Ayrıca, TNF- $\alpha$  alellerinin lepra, menenjit, cerebral malarya gibi birçok kronik hastalıkla ilişkili genetik belirteç olarak önerilmesi de bu geni periodontal açıdan araştırmaya iten etmenlerdendir (Roy et al., 1997; Nadel et al., 1996; McGuire et al., 1994).

TNF- $\alpha$  ifade seviyesinin, HLA-DR alelleriyle ya da yakından bağlantılı olduğu LT- $\alpha$  geninin polimorfik dizileri ile bağlantılı olabileceği bulunmuştur (Alfonso and Richiardi, 1994). Yetişkin periodontitis hastaları ile yapılan bir çalışmada, TNF- $\beta$  (LT- $\alpha$ ) geninin ilk intronunda bulunan *Ncol* polimorfizmi ile yüksek seviyede TNF- $\alpha$  üretiminin bağlantılı olduğu ve bu durumun yangısal hastalıklara yatkınlık yarattığı bulunmuştur (Holla et al., 2001). Bu amaçla, periodontitisin tanısına katkı sağlayabileceği düşünülen aday genlerle ilgili bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmaya katılan bireylerin yaş ortalaması $\pm$ standart sapma değerleri, kontrol grubunda 25,17 $\pm$ 4,65, KP grubunda 40,46 $\pm$ 9,50 ve AP grubunda 31,08 $\pm$ 8,00 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre literatürle uyumlu olarak KP ve kontrol grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. 1999 yılında yenilenen sınıflandırma sistemine göre, KP tanısı konulabilmesi için bireylerin 30 yaşın üstü olması artık ölçütlerden biri olma özelliğini yitirmiştir. Fakat yine de kronik periodontitis, gençlerde de görülebilen ama yetişkinlerde görülmesi ile karakterize olan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Wiebe and Putnins, 2000). AP ve kontrol grubuna ait bireylerin yaş açısından karşılaştırılmasında da aynı şekilde 30 yaşından büyük olma anlamlı çıkmıştır. Literatürde AP hastalarının genel olarak 30 yaş altı bireyler olarak değerlendirilmesi nedeniyle, bu sonuç literatürden farklı olarak ele alınabilir. Genel olarak sağlıklı grupta az sayıda 30 yaş üstü bireyin mevcut olmasının, bu anlamlılığı yaratmış olabileceği düşünülmektedir.

Cinsiyete bağlı yapılan değerlendirmede, kontrol grubu ve kronik periodontitis grubu arasında anlamlı fark bulunurken; AP ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından bir fark gözlenmemiştir. Literatürde geniş çapta gerçekleştirilen epidemiyolojik çalışmalarda, erkeklerin yıkıcı periodontal hastalıklara yakalanma açısından kadınlara göre daha fazla risk faktörü taşıdığı ortaya çıkarılmıştır (Shiau and Reynolds, 2010). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, erkek cinsiyetinin periodontal hastalık açısından risk taşımaya rağmen, agresif periodontitis gibi hızlı ilerleyen doku kaybı ile karakterize olan periodontal hastalıklarda cinsiyetler arasında fark bulunmadığı bildirilmiştir (Shiau and Reynolds, 2010). Cinsiyet faktörü açısından, çalışmamızdan elde edilen sonuçların literatürdeki çalışmalarla paralel olduğu gözlenmiştir.

LT- $\alpha$  (+252) gen polimorfizmi ile periodontitis ilişkisine dair, Fassmann ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, LT- $\alpha$  (+252) homozigot AA genotipi farkının hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı olduğu bulunmuştur. Çalışmada AA genotipinin varlığı hasta grubunda %0,8 iken, kontrol grubunda bu oran %8,8' dir. Ortaya çıkan bu fark, AA genotipinin koruyucu özellik taşıdığı ve bu nedenle hasta grubunda kontrol grubuna göre daha az ifade edildiği düşünülmektedir (Fassmann et al., 2003). Bizim yaptığımız çalışmada ise, LT- $\alpha$  (+252) bölgesine ait genotiplerin üçünde de kontrol, KP ve AP grupları arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir. Genotip açısından yapılan istatistiksel değerlendirmelere ek olarak, alel frekansları da test edilmiştir. Alel frekansları açısından da kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark bulunamamıştır. LT- $\alpha$  (+252) A/G gen polimorfizmine ilişkin ileride, birey sayısı artırılarak yapılacak bir çalışmanın planlanmasının, popülasyona ait profilin kesinleşmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

TNF- $\alpha$  (-308) gen polimorfizminin, diğer etnik gruplarla kıyaslandığında beyaz ırkta prevalansının yaygın olduğu bildirilmiştir (Endo et al., 2001). Genin -308 pozisyonunda meydana gelen guaninden adenine transisyon sonucu, TNF- $\alpha$ ' nın fenotipik ifadesinin değişmesi ve iki ila üç kat daha fazla transkripsiyonel aktivitenin ortaya çıkması, beyaz ırkta en çok görülen polimorfizmdir (D'Autio et al., 2004; Kroeger et al., 2000). Periodontitis hastalarına ait oral nötrofillerle yapılan bir çalışmada, TNF- $\alpha$  geni -308. pozisyonunda adenin içeren bireylerin yabancı tiple kıyaslandığında daha fazla miktarda TNF ürettiği gösterilmiştir (Galbraith et al., 1996).

Literatürdeki çalışmaların büyük bir kısmında, TNF- $\alpha$  (-308) gen polimorfizmi açısından sağlıklı bireylerle periodontitis hastaları arasında anlamlı farklılık gösterilememiştir (Moreira et al., 2009; Shapira et al., 2000; Menezes and Colombo, 2008; Brett et al., 2005; Soga et al., 2003; Tervonen et al., 2007; Maria de Freitas et al., 2007; Donati et al., 2005; Babel et al., 2006; D'Autio et al., 2004; Craandijk et al., 2002; Schulz et al., 2008). Galbraith ve arkadaşlarının(1999), gingivitis ve ilerlemiş periodontitis hastaları üzerinde yaptıkları araştırmada ise diğer çalışmalardan farklı olarak, TNF- $\alpha$  (-308) GG genotipinin periodontitis hastalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu bildirilmiştir (Galbraith et al.,1999).

TNF- $\alpha$  (-308) genine ait çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol, AP ve KP grupları arasında heterozigot GA genotipi ve A aleli açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu tespit edilmiştir. Yabancıl genotip olan TNF- $\alpha$  (-308) GG genotipi, kontrol grubunda hasta gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu nedenle Türk popülasyonunda bu genotipin, periodontitis açısından bir koruma faktörü olabileceği düşünülebilir. Ek olarak G aleli varlığı, kontrol ve hasta gruplarında test edilmiş fakat anlamlı bir fark gözlenememiştir.

TNF- $\alpha$  (-308) pozisyonunda G/A polimorfizmi taşıyan AA genotipine, çalışma grubumuzdaki AP hastalarından sadece bir hastada rastlandığı için, bu genotipe dair istatistiksel bir sonuç elde edilememiştir. Daha fazla AA genotipli hasta elde edilebileceği düşünülerek, ileriki çalışmaların daha çok sayıda hasta üzerinden devam ettirilmesi planlanmıştır.

Çalışmamıza ait dikkat çekici bir diğer sonuç, TNF- $\alpha$  (-308) heterozigot GA genotipi ile ilgili olarak elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, GA genotipinde, kontrol-AP, kontrol-KP ve AP-KP olmak üzere gerçekleştirilen karşılaştırma gruplarının tümünde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. TNF- $\alpha$  (-308) heterozigot genotip varlığı, kontrol bireylerinde en az saptanırken hasta grubunda artış göstermiştir. Hastalık tiplerinin kendi içerisinde test edilmesi sonucu, hastalığın hızlı ilerleyen ve şiddetli ataçman kaybı görülen tipi olan agresif periodontitis grubunda heterozigot genotip varlığının, kronik periodontitis grubuna göre daha yüksek oranda tespit edilmiş olması istatistiksel olarak önemlidir. Bu bulgulardan yola çıkılarak, Türk popülasyonunda, TNF- $\alpha$  (-308) heterozigot GA genotipinin, hastalığın insidansını ve şiddetini arttırdığı yorumuna varılabilir. Heterozigot genotip varlığında görülen hastalığa yatkınlık nedeni A aleli varlığı ile desteklenmiştir. A aleli frekansına ilişkin yapılan istatistiksel değerlendirmede, hem kontrol ve hasta grupları arasında hem de AP ve KP gruplarının arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklar bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak çalışmamız, hem heterozigot genotip varlığında hastalığın sıklığının artması hem de A aleli frekansları arasındaki anlamlı fark bulunması nedeniyle, genotipe A alelinin tek bir alel olarak bile katılmasının periodontitis açısından risk taşıdığını göstermektedir. Bu nedenle Türk popülasyonunda TNF- $\alpha$  (-308) heterozigot genotipinin, periodontitis ile ilişkili bir risk faktörü olarak göz önünde

bulundurulması gerektiği düşünölmüştür. Hastalığa ilişkin elde edilen bu bulgu üzerinde, daha kapsamlı ve daha fazla bireyi içerecek çalışmaların planlanması halinde, ileride bu genotipin ya da alelin, hastalığa ait bir belirteç olarak kullanılma imkanı sağlayabileceği düşünölmektedir. Popölasyonu daha çok yansıtan daha geniş kapsamlı araştırmalara ek olarak, ailesel çalışmaların ve haplotip analizlerinin yapılmasının da, hastalığa ait koruma ve risk faktörlerini belirleme açısından etkili olabileceği yorumuna gidilmiştir.

Periodontitis, patojene, konakçıya, çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Buradan yola çıkılarak, hastalığın tek bir gen ya da tek bir polimorfizmden ötürü ortaya çıkmadığı açıkça görölmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasına ek olarak, periodontitis ile ilgili seçilen aday genlere ait inceleme sonuçları birleştirildiğinde, popölasyona ve hastalığa ait daha net sonuçların elde edilebileceği ön görölmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aggarwal, B.B., 2003, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double edged sword, *Nature Reviews Immunology* 3, 745-756.
- Albandar, J.M., Brunelle, J.A., Kingman, A., 1999, Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994, *J Periodontol*; 70: 13-29.
- Albandar, J.M., and Rams, T.E., 2002, Global epidemiology of periodontal diseases: an overview, *Periodontology* 2000, Vol. 29, 7–10.
- Alfonso, S.D., Richiardi, P.M., 1994, A polymorphic variation in putative regulation box of the TNFA promoter region, *Immunogenetics* 39: 150-154.
- Armitage, G.C., 1999, Development of a classification system for periodontal disease and conditions, *Ann Periodontol* Volume 4, Number 1.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S., Graves, D.T., 1998, IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis, *Journal of Immunology*, 160, 403-409.
- Babel, N., Cherepnev, G., Babel, D., Tropmann, A., Hammer, M., Volk, H-D., Reinke, P., 2006, Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-10, IL-6, and interferon- $\gamma$  gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis, *J Periodontol*; 77:1978-1983.
- Baelum, V., Fejerskov, O., 1986, Tooth loss as related to dental caries and periodontal breakdown in adult Tanzanians, *Community Dent Oral Epidemiol*; 14(6): 353-7.
- Baker, P., Dixon, M., Evans, R., Dufour, L., Johnson, E., Roopenian, D., 1999, CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 67: 2804-2809.
- Bartold, P.M., and Narayanan, A.S., 2006, Molecular and cell biology of periodontal tissues, *Periodontology* 2000, Vol. 40, 29–49.
- Bascones-Martinez, A., and Figuero-Ruiz, E., 2004, Periodontal diseases as bacterial infection, *Med Oral Patol Cir Bucal*, 9 Suppl: S75-91.
- Bascones-Martinez, A., Munoz-Corcuera, M., Noronha, S., Mota, P., Bascones-Ilundain, C., Campo-Trapero, T., 2009, Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: basic mechanisms, *Med Oral Patol Cir Bucal*, 14 (12).
- Bastos, F.M., Lima, A.J., Vieira, M.P., Mestnik, J.M., Faveri, M., Duarte M.P., 2009, TNF- $\alpha$  and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects, *Oral Diseases* 15, 82-87.
- Baumgartner, J., Watkins, B., Bae, K., Xia, T., 1999, Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections, *J Endod* 25: 413-415.

- Bayley, P.J., Ottenhoff, M.H.T., Verweij, L.C., 2004, Is there a future for TNF promoter polymorphisms?, *Genes and Immunity* 5, 315-329.
- Bergström, J., 1989, Cigarette smoking as risk indicator in chronic periodontal disease, *Community Dent Oral Epidemiol*: 17: 245-247.
- Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D., Mundy, G.R., 1986, Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319, 516-518.
- Beutler, B.A., 1999, The role of tumor necrosis factor in health and disease, *J Rheumatol Suppl.* 57: 16-21.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A., 1985, Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin, *Nature*, 8-14;316(6028):552-4.
- Birkedal-Hansen, H., 1993, Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res*; 28: 500-510.
- Boraska, V., Zeggini, E., Groves, C.J., Rayner, N.W., Skrabic, V., Diakite, M., Rockett, K.A., Kwiatkowski, D., McCarthy, M.I., Zemunik, T., 2009, Family-based analysis of tumor necrosis factor and lymphotoxin- $\alpha$  tag polymorphisms with type 1 diabetes in the population of South Croatia. *Human Immunology* 70, 195-199.
- Borch, T.S., Holmstrup, P., Bendtzen, P.K., Nielsen, C.H., 2010, *In vitro* cytokine responses to periodontal pathogens: generalized aggressive periodontitis is associated with increased IL-6 response to *Porphyromonas gingivalis*, *Scandinavian Journal of Immunology* 71, 440–446.
- Boughman, J.A., Astemborski, J.A., Suzuki, J.B., 1992, Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol*; 19(4): 233-9.
- Bouma, G., Crusius, A.B.J., Pool, O.M., Kolkman J.J., Von Blomberg, B.M.E., Kostense, P.J., Giphart, M.J., Schreuder, G.M.TH., Meuwissen, S.G.M., and Pena, A.S., 1996, Secretion of tumour necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 43, 456-463.
- Boyce, F.B., Li P., Yao, Z., et al., 2005, TNF-alpha and pathologic bone resorption, *Keio J Med* 54: 127-131.
- Brett, P.M., Zygogianni, P., Griffiths, G.S., Tomaz, M., Parkar, M., D'Aiuto, F., and Tonetti, M., 2005, Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis, *J Dent Res* 84(12):1149-1153.
- Carvalho, F.M., Tinoco, E.M., Deeley, K., Duarte, P.M., Faveri, M., Marques, M.R., Mendonça, A.C., Wang, X., Cuenco, K., Menezes, R., Garlet, G.P., Vieira, A.R., 2010, FAM5C contributes to aggressive periodontitis, *PLoS One.* 7;5(4):e10053.

- Clark, A.I., 2007, How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 325-343.
- Clerehugh, V., 2008, Periodontal disease in children and adolescents, *British Dental Journal*, Volume 204, No:8.
- Corey, L.A., Nance, W.E., Hofstede, P., Schenkein, H.A., 1993, Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population, *J Periodontol*; 64(12): 1205-8.
- Craandijk, J., van Krugten, M.V., van der Velden, U., Loos, B.G., 2002, Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms in relation to periodontitis, *J Clin Periodontol*; 29; 28-34.
- D'Aiuto, F., Parkar, M., Brett, P.M., Ready, D., Tonetti, M.S., 2004, Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections, *Cytokine* 28, 29-34.
- Darveau, R.P., Tanner, A., Page, R.C., 1997, The microbial challenge in periodontitis, *Periodontol 2000*: 14: 12-32.
- Delima, A.J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S., Graves, D.T., 2001, Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis, *J Clin Periodontol*; 28: 233-240.
- Demeter, J., Porzolt, F., Ramisch, S., Schmidt, D., Schmid, M., Messer, G., 1997, Polymorphisms of the tumor-necrosis factor alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukemia, *Br J Haematol* 97: 107-112.
- de Sa, A.R., Moreira, P.R., Xavier, G.M., Sampaio, I., Kalapothakis, E., Dutra, W.O., and Gomez, R.S., 2007, Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses, *International Endodontic Journal*, 40, 563-572.
- Dixon, D.R., Bainbridge, B.W., Darveau, R.P., 2004, Modulation of the innate immune response within the periodontium, *Periodontol 2000*;35:53-74.
- Donati, M., Berglundh, T., Hytönen, A-M., Hahn-Zoric, M., Hanson, L-A., Padyukov, L., 2005, Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians, *J Clin Periodontol*; 32: 474-479.
- Eck, M.J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos A.M., Sprang, S.R., 1992, The structure of human lymphotoxin (tumour necrosis factor-beta) at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem*; 267: 2119-22.
- Endo, M., Tai, H., Tabeta, K., Kobayashi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., 2001, Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis, *Journal of Periodontology*, Vol.72, No.11, 1554-1559.

- Elahi, M.M., Asotra, K., Matata, B.M., Mastana, S.S., 2009, Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease, *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 163-172.
- Fanning, C.G., Bunce, M., Black, M.C., Welsh, I.K., 1997, Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphisms of tumor necrosis factor and lymphotoxin  $\alpha$ . *Tissue Antigens*: 50: 23-31.
- Fassmann, A., Holla, L.I., Buckova, D., Vasku, A., Znojil, V., Vanek, J., 2003, Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308 (A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population, *J Periodontol Res*, 38: 394-399.
- Ferrante, A., Martin, A., Bates, E., et al., 1993, Killing of *Staphylococcus aureus* by TNF $\alpha$ -activated neutrophils, *J Immunol*; 151: 4821-4828.
- Folwaczny, M., Glas, J., Török, H-P., Mende, M., Folwaczny, C., 2004, Lack of association between the TNF $\alpha$  G – 308 A promoter polymorphism and periodontal disease, *J Clin Periodontol*; 31: 449-453.
- Galbraith, G.M., Pandey, J.P., Schmidt, M.G., Arnaud, P., Goust, J.M., 1996, Tumor necrosis factor alpha gene expression in human monocyte THP-1 cells exposed to beryllium, *Arch Environ Health*, 51(1): 29-33.
- Galbraith, G.M.P., Hendley, T.M., Sanders, J.J., Palesch, Y., Pandey, J.P., 1999, Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis, *J Clin Periodontol*, 26: 705-709.
- Galbraith, G.M.P., Steed, R.B., Sanders, J.J., Pandey, J.P., 1998, Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype, *Journal of Periodontology* 69, 428-433.
- Gardner, S.M., Mock, B.A., Hilgers, J., Huppi, K.E., Roeder, W.D., 1987, Mouse lymphotoxin and tumor necrosis factor: structural analysis of the cloned genes, physical linkage, and chromosomal position, *The Journal of Immunology*, Vol. 139, 476-483.
- Genco, R., 1996, Current view of risk factors for periodontal disease, *J Periodontol*: 67: 1041-1049.
- Giovannetti de Menezes, N., and Colombo, A.P.V., 2008, Lack of association between the TNF- $\alpha$  -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians, *Braz Oral Res*; 22(4):322-7.
- Goetz, W.F., Josep, V.P., MacKenzie, S., 2004, Tumor necrosis factors, *Developmental and Comparative Immunology* 28, 487-497.
- Goodsell, S.D., 2006, The molecular prospective: tumor necrosis factor, *The Oncologist*; 11: 83-84.
- Graves, D.T., and Cochran, D., 2003, The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, *J Periodontol* ; 74: 391-401.

- Graves, D.T., Oskoui, M., Volejnikova, S., Naguib, G., Cai, S., Desta, T., Kakouras, A., Jiang, Y., 2001, Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P.gingivalis* infection, *J Dent Res* 80 (10): 1875-1879.
- Hajeer, A.H., Hutchison, I.V., 2001, Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on the TNF $\alpha$  production and diseases. *Hum Immunol*: 62: 1191-9.
- Hamlet, S., Ellwood, R., Cullinan, M., et al., 2004, Persistent colonisation with *Tannarella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res*; 83: 232-235.
- Hart, T., and Kornman, K.S., 1997, Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis, *Periodontol* 2000; 14:202-215.
- Hassel, T.M., and Harris, E.L., 1995, Genetic influences in caries and periodontal diseases, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 6, 319-342.
- Havemose-Poulsen, A., Sorensen, K.L., Stoltze, K., Bendtzen, K., and Holmstrup, P., 2005, Cytokine profiles in peripheral blood and whole blood cell cultures associated with aggressive periodontitis, juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *J Periodontol*; 76: 2276-2285.
- Heesen, M., Kunz, D., Bachmann- Mennenga, B., Merk, H.F., Bloemeke, B., 2003, Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med*: 31: 211-4.
- Heitz-Mayfield, L.J.A., 2005, Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis, *J Clin Periodontol*, 32 Suppl.6: 196-209.
- Ho, Y.P., Lin, Y.C., Yang, Y.H., Ho, K.Y., Wu, Y.M., Tsai, C.C., 2008, Cyclooxygenase-2 Gene-765 single nucleotide polymorphism as a protective factor against periodontitis in Taiwanese, *J Clin Periodontol*; 35 (1): 1-8.
- Holla, I.L., Fassmann, A., Vasku, A., Znojil, V., Vanek, J., Vacha, J., 2001, Interactions of lymphotoxin  $\alpha$  (TNF- $\beta$ ), angiotensin-converting enzyme (ACE), and endothelin-1 (ET-1) gene polymorphisms in adult periodontitis, *J Periodontol*, Volume 72 Number 1.
- International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, 1999, *Annals of Periodontology*, 4.
- Jacob, C.O., Fronek, Z., Lewis, G.D., Koo, M., Hansen, J.A., McDevitt, H.O., 1990, Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor  $\alpha$ : Relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus, *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 87*, pp. 1233-1237.

- Kadar, K., Kovacs, M., Karadi, I., Melegh, B., Pocsai, Z., Mikala, G., Tordai, A., Szilagyi, A., Adany, R., Füst, G., Varkonyi, J., 2008, Polymorphisms of TNF-alpha and LT-alpha genes in multiple myeloma, *Leukemia Research* 32, 1499-1504.
- Kinane, D.F., 2001, Causation and pathogenesis of periodontal disease, *Periodontology* 2000, Vol. 25, 8-20.
- Kinane, D.F., and Hajishengallis, G., 2009, Polymicrobial infections, biofilms and beyond, *J Clin. Periodontol*, 36: 404-405.
- Kinane, D.F., Hart, T.C., 2003, Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease, *Crit.Rev.Oral.Biol.Med* 14, 430-449.
- Kinane, D.F., Hodge, P., Eskdale, J., Ellis, R., Gallagher, G., 1999, Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis, *J Periodont Res*; 34: 379-386.
- Kornman, K.S., Page, R.C., Tonetti, M.S., 1997, The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players, *Periodontology* 2000, 14, 33-53.
- Kornman, K.S., and di Giovine, F.S., 1998, Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis, *Annals of Periodontology* 3, 327-338.
- Koss, K., Satsangi, J., Fanning, G.C., Welsh, K.I., Jewell, D.P., 2000, Cytokine (TNF $\alpha$ , LT $\alpha$  and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes and Immunity*, 1, 185-190.
- König, A., Mühlbauer, R.C., Fleisch, H., 1988, Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption *in vivo* as measured by urinary [<sup>3</sup>H]tetracycline excretion from prelabeled mice, *J Bone Miner Res*, 3(6):621-7.
- Körner, H., and Sedgwick, D.J., 1996, Tumour necrosis factor and lymphotoxin: Molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunology and Cell Biology* 74, 465-472.
- Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J., 1997, The -308 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription, *Molecular Immunology*, Vol. 34, No. 5, pp. 391-399.
- Kroeger, K.M., Steer, J.H., Joyce, D.A., Abraham, L.J., 2000, Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism, *Cytokine* 12, 110-119.
- Kurtiş, B., Tüter, G., Serdar, M., Akdemir, P., Uygur, C., Firatli, E., and Bal, B., 2005, Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis, *J Periodontol*; 76: 1849-1855.

- Laine, M.L., Loos, B.G., Crielaard, W., 2010, Gene polymorphisms in chronic periodontitis, *Int J Dent*; Volume 2010, 324719.
- Loos, B.G., John, R.P., Laine M.L., 2005, Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action, *J Clin Periodontol*; 32 (Suppl. 6): 159-179.
- Löe, H., and Morrison, E., 1986, Periodontal health and disease in young people: screening for priority care, *Int Dent J*; 36(3): 162-7.
- Manolagas, S.C., 1995, Role of cytokines in bone resorption, *Bone* ;17(2 Suppl):63S-67S.
- Marazita, M.L., Burmeister, J.A., Gunsolley, J.C., Koertge, T.E., Lake, K., Schenkein, H.A., 1994, Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol*; 65(6): 623-30.
- Maria de Freitas, N., Imbronito, A.V., Neves, A.C., Nunes, F.D., Pustiglioni, F.E., Lotufo, R.F., 2007, Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis, *Eur Cytokine Netw*; 18(3):142-7.
- McGuire, W., Hill, A.V.S., Allsopp, C.E.M., Greenwood, B.M., Kwiatkowski, D., 1994, Variation in the TNF- $\alpha$  promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371: 508-511.
- Menezes, N.G., Colombo, A.P., 2008, Lack of association between TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians, *Braz Oral Res*, 22(4): 322-7.
- Messer, G., Spengler, U., Jung, M.C., Honold, G., Blömer, K., Pape, G.R., Riethmüller, G., Weiss, E.H., 1991, Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: An *NcoI* polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production, *J Exp Med* 173:209-219.
- Michalowicz, B.S., 1994, Genetic and heritable risk factors in periodontal disease, *J Periodontol*; 65 (5 Suppl): 479-488.
- Michalowicz, B.S., Aeppli, D., Virag, J.G., Klump, D.G., Hinrichs, J.E., Segal, N.L., Bouchard, T.J., Pihlstrom, B.L., 1991, Periodontal findings in adult twins, *J Periodontol*; 62:293-299.
- Michalowicz, B.S., Diehl, S.R., Gunsolley, J.C., Sparks, B.S., Brooks, C.N., Koertge, T.E., Califano, J.V., Burmeister, J.A., Schenkein, H.A., 2000, Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*; 71:1699-1707.
- Mocellin, S., Rossi, C.D., Pilati, P., Nitti, D., 2005, Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy, *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 35-53.

- Moffatt, M.F., Cookson, W.O.C.M., 1997, Tumour necrosis factor haplotypes and asthma, *Human Molecular Genetics*, Vol. 6, No. 4, 551-554.
- Moreira, P.R., Costa, J.E., Gomez, R.S., Gollob, K.J., and Dutra, W.O., 2009, TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with the periodontitis in Brazilians, *The Open Dentistry Journal*, 3, 184-190.
- Mrazek, F., Holla, L., I., Hutyrova, B., Znojil, V., Vasku, A., Kolek, V., Welsh, K., I., Vacha, J., du Bois, R., M., Petrek, M., 2005, Association of tumour necrosis factor- $\alpha$ , lymphotoxin- $\alpha$  and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens*, 65: 163-171.
- Mucci, L.A., Bjorkman, L., Douglass, C.W., Pedersen, N.L., 2005, Environmental and heritable factors in the etiology of oral diseases – a population-based study of Swedish twins, *Journal of Dental Research* 84, 800-805.
- Mulcahy, B., Waldron-Lynch, F., McDermott, D.F., Adams, C., Amos, I., Zhu D.K., Ward, R.H., Clegg, D.O., Shanahan, F., Molloy, M.G., O'Gara, F., 1996, Genetic Variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis, *Am. J. Hum. Genet.* 59: 676-683.
- Muller, U., Jongeneel, C.V., Nedospasov, S.A., Fischer-Lindahl, K., Steinmetz, M., 1987, Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to *H-2D* in the mouse major histocompatibility complex, *Nature* 325, 265-267.
- Nadel, S., Newport, M.J., Booy, R., Levin, M., 1996, Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease, *Journal of Infectious Diseases* 174, 878-880.
- Nares, S., 2003, The genetic relationship to periodontal disease, *Periodontol* 2000 32, 36-49.
- Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V., Gray, W.P., 1985, Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization, *Nucleic Acids Research* Volume 13 Number 17.
- Noble, J.A., Valdes, A.M., Lane, J.A., Green, A., Erlich, H.A., 2006, Linkage disequilibrium with predisposing DR3 haplotypes accounts for apparent effects of TNF and LTA polymorphisms on T1D susceptibility, *Hum Immunol.*; 67 (12):999-1004.
- Novak, M.J., 2002, Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. *Carranza's Clinical Periodontology* (s. 64-74).
- Offenbacher, S., 1996, Periodontal diseases: pathogenesis, *Ann Periodontol*; 1: 821-878.
- Okada, H., Murakami, S., 1998, Cytokine expression in periodontal health and disease, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 9, 248-266.

- Page, R.C., 1991, The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.*;26(3 Pt 2):230-42.
- Palikhe, A., Lokki, M., L., Pussinen, P., J., Paju, S., Ahlberg, J., Asikainen, S., Seppanen, M., Valtonen, V., Nieminen, M., S., Sinisalo, J., 2008, Lymphotoxin alpha LTA+496C allele is a risk factor for periodontitis in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens* 71, 530-537.
- Palmer, R.M., Wilson, R.F., Hasan, A.S., Scott, D.A., 2005, Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking, *Journal of Clinical Periodontology* 32 (Suppl. 6) 180-195.
- Pang, R.Y., Chen, K.Y., Zhang, J.C., Xu, C.R., Zhang, X., 2005, Association of TNFA-308 gene polymorphisms with susceptibility to chronic periodontitis in Chinese patients. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*; 14(6): 586-9.
- Pennica, D., Nedwin G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Aggarwal, B.B., Goeddel, D.V., 1984, Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312(5996):724-9.
- Peschon, J.J., Torrance, D.S., Stocking, K.L., Glaccum, M.B., Otten, C., Willis, C.R., Charrier, K., Morrissey, P.J., Ware, C.B., Mohler, K.M., 1998, TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles of p55 and p75 in several models of inflammation, *The Journal of Immunology*, 160: 943-952.
- Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W., 2005, Periodontal diseases, *Lancet* 366: 1809-1820.
- Pociot, F., Briant, L., Jongeneel, V.C., Mölvig, J., Worsaae, H., Abbal, M., Thomsen, M., Nerup, J., Cambon-Thomsen, A., 1993, Association of tumor necrosis factor(TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin- dependent diabetes mellitus, *Eur. J. Immunol.* 23: 224-231.
- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E.I., Hourihaddad, Y., 2009, Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol*; 36: 406–410.
- Posch, P.E., Cruz, I., Bradshaw, D., Medhekar, B.A., 2003, Novel polymorphisms and the definition of the tumor necrosis factor and lymphotoxin  $\alpha$  loci: inclusion in HLA haplotypes, *Genes and Immunity* 4, 547-558.
- Roberts, F.A., McCaffery, K.A., Michalek, S.M., 1997, Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis, *J Dent Res* 76(12): 1833-1839.
- Roy, S., McGuire, W., Mascie-Taylor, C.G.N., Saha, B., Hazra, S.K., Hill, A.V.S., Kwiatkowski, D., 1997, Tumor necrosis factor promotor polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy, *Journal of Infectious Diseases* 176, 530-532.

- Sachidanandam, R., et al, 2001, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature* 409, 928-933.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with athermostable DNA polymerase. *Science, New Series*, Vol.239, No.4839, 487-491.
- Sandros, J., Karlsson, C., Lappin, D.F., Madianos, P.N., Kinane, D.F., Papapanou, P.N., 2000, Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection, *J Dent Res* 79(10):1808-1814.
- Scapoli, C., Mamolini, E., Trombelli, L., 2007, Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis, *J Clin Periodontol*; 34; 1031-1038.
- Schork, N.J., Fallin, D., Lanchbury, J.S., 2000, Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology, *Clinical Genetics* 58, 250-264.
- Schulz, S., Machulla, H.K.G., Altermann, W., Klapproth, J., Zimmermann, U., Glaser, C., Kluttig, A., Stein, J., Schaller, H-G., Reichert, S., 2008, Genetic markers of tumour necrosis factor  $\alpha$  in aggressive and chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*; 35; 493-500.
- Seidemann, K., Zimmermann, M., Book, M., Meyer, U., Burkhardt, B., Welte, K., Reiter, A., Stanula, M., 2005, Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Münster trial NHL-BFM 95, *Journal of Clinical Oncology* Volume 23, Number 33.
- Seymour, G.J., 1987, Possible mechanisms involved in immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease, *J Dent Res*, 66: 2.
- Shiau, H.J., Reynolds, M.A., 2010, Sex differences in destructive periodontal disease: a systemic review, *J Periodontol*. 2010 Oct;81(10):1379-89.
- Shiau, H.J., Reynolds, M.A., 2010, Sex differences in destructive periodontal disease: exploring the biological basis, *J Periodontol*. . [Epub ahead of print].
- Shapira, L., Stabholz, A., Rieckmann, P., Kruse, N., 2001, Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  promoter region in families with localized early-onset periodontitis, *J Periodont Res*; 36: 183-186.
- Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., Kent, R.J., 1998, Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
- Soga, Y., Nishimura, F., Ohyama, H., Maeda, H., Takashiba, S., Murayama, Y., 2003, Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF- $\alpha$ ) -1031/ -863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese, *J Clin Periodontol*; 30: 524-531.

- Spies, T., Morton, C.C., Nedospasov, S.A., Fiers, W., Pious, D., Strominger, J.L., 1986, Genes for the tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  are linked to the human major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol.83, pp.8699-8702.
- Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L., Ago, J.M., 1987, Synergistic interactions between interleukin1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption, *J Immunol* 1;138(5): 1464-8.
- Stashenko, P., Jandinski, J.J., Fujiyoshi, P., Rynar, J., Socransky, S.S., 1991, Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease, *J Periodontol*; 62: 504-509.
- Stashenko, P., Obernesser, M.S., Dewhirst, F.E., 1989, Effect of immune cytokines on bone, *Immunol Invest*; 18(1-4):239-49.
- Stuber, F., Petersen, M., Bokelmann, F., Schade, U., 1996, A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis, *Crit Care Med*; 24:381-384.
- Takashiba, S., and Naruishi, K., 2006, Gene polymorphisms in periodontal health and disease, *Periodontology* 2000, Vol. 40, 94-106.
- Tervonen, T., Raunio, T., Knuutila, M., Karttunen, R., 2007, Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease, *J Clin Periodontol*, 34; 377-383.
- Thomson, B.M., Mundy, G.R., Chambers, T.J., 1987, Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption, *J Immunol*; 138;775-779.
- Torres de Heens, G.L., Loos, B.G., van der Velden, U., 2010, Monozygotic twins are discordant for chronic periodontitis: clinical and bacteriological findings, *J Clin Periodontol*; 37: 120-128.
- Van der Velden, U., Abbas, F., Armand, S., Loos, B.G., Timmermann, M.F., Van der Weijden, G.A., van Winkelhoff, A. J., Winkel, E.G., 2006, Java Project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol*; 33(8):540-8.
- Van Dyke, T.E., and Dave, S., 2005, Risk factors for periodontitis, *J Int Acad Periodontol*: 7(1): 3-7.
- Van Dyke, T.E., 2007, Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontology* 2000, Vol. 45, 10-13.
- Vassalli, P., 1992, The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol.*;10:411-52.

- Vernal, R., Leo'n, R., Silva, A., van Winkelhoff, A.J., Garcia-Sanz, J.A., Sanz, M., 2009, Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes, *J Clin Periodontol*; 36: 823–829.
- Vilcek, J., Lee, T.H., 1991, Minireview: tumor necrosis factor, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 12, Issue of April 25, pp. 7317-7316.
- Wajant, H., Pfeffer, K., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 1998, Tumor necrosis factors in 1998, *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 297-302.
- Wiebe, C.B., and Putnins, E.E, 2000, The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology – An update, *J Can Dent Assoc*; 66:594-7.
- Wihlborg, C., Sjoberg, J., Intaglietta, M., Axdorph, U., Pisa, K.E., Pisa, P., 1999, Tumor-necrosis factor-alpha cytokine promoter gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia, *Br J Haematol* 104: 346-349.
- Williams, R.C., 1990, Periodontal disease, *The New England Journal of Medicine*, Volume 322 No.6.
- Wilson, A.G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F.S., van der Putte, L.B.A., Duff, G.W., 1993, An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J. Exp. Med.* Volume 177, 557-560.
- Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O., Duff, G.W., 1997, Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 94, pp. 3195-3199.
- Wilson, A.G., 2008, Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases, *J Periodontol*; 79; 1514-1519.
- Wiltgen, M., and Tilz, G.P., 2008, Tumour necrosis factor and its receptor: a basic structural analysis of two counterparts, *Hematology*, Vol.13, No.4, 224-229.
- Wolchok, J.D., Vilcek, J., 1991, There is more to hemorrhagic necrosis than tumor necrosis. *J Natl Cancer Inst.* 83: 807-809.
- Wu, Y.M., Chuang, H.L., Ho, Y.P., Ho, K.Y., Tsai, C.,C., 2010, Investigation of interleukin-13 gene polymorphisms in individuals with chronic and generalized aggressive periodontitis in a Taiwanese (Chinese) population, *J Periodont Res* 2010; 45: 695–701.
- Xie, C.J., Xiao, L.M., Fan, W.H., Xuan, D.Y., Zhang, J.C., 2009, Common single nucleotide polymorphisms in cyclooxygenase-2 and risk of severe chronic periodontitis in a Chinese population, *J Clin Periodontol.*;36(3):198-203.

Yoshie, H., Galicia, C.J., Kobayashi, T., Tai, H., 2005, Genetic polymorphisms and periodontitis, International Congress Series 1284, 131-139.

Yoshie, H., Kobayashi, T., Tai, H., Galicia, C.J., 2007, The role of genetic polymorphisms in periodontitis, Periodontology 2000, Vol. 43, 102-132.

Kitaplar:

Abbas, K. A., and Lichtman, H.A., 2005, Cellular and Molecular Immunology, 5th Edition, 247p.

Carranza, F.A., and Newman, M.G., 1996, Clinical Periodontology, W.B.Saunders Company, 8th Edition, 118p.

Lindhe, J., Karring, T., and Lang, P.N., 1998, Clinical Periodontology and Implant Dentistry, Munksgaard, 3rd Edition, 213p.

İnternet kaynakları:

<http://genomebiology.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X02910?>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_012010.1?from=5000&to=7222&report=genbank,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012010.1?from=5000&to=7222&report=genbank)

[www.anadolusaglik.org](http://www.anadolusaglik.org)

[www.totaldentistryonline.com](http://www.totaldentistryonline.com)

## EKLER

### EK 1 ETİK KURUL İZNI



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



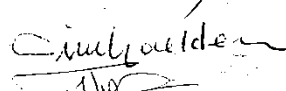

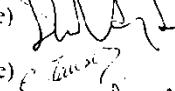

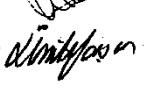
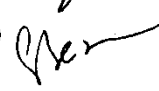
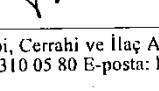
Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/1159  
Konu :

19.11.2005

#### ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

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

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

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

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

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** Selin ÖZKAN  
**Doğum Yeri :** ANKARA  
**Doğum Yılı :** 1984  
**Medeni Hali :** Bekar  
**E-mail:** slnozkan@hacettepe.edu.tr

### Eğitim ve Akademik Durumu:

**Ortaokul-Lise:** 1996-2002 Mamak Anadolu Lisesi  
**Lisans:** 2002- 2006 H.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
**Yüksek Lisans:** 2008-2010 H.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
**Yabancı Dil:** İngilizce

## **AKADEMİK AKTİVİTELER**

### **1. Yazılı ve Sözlü Bildiriler**

#### **1.1. Posterler**

1. Güncü G.N., Özkan S., Baltacıoğlu E., Şüküroğlu E., Dursun E., Sümer S., Akalın F.A., “Kronik Periodontitisli ve Agresif Periodontitisli Bireylerde Lenfotoksin- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) +252 Gen Polimorfizminin İncelenmesi” Türk Periodontoloji Derneği 40. Bilimsel Kongresi 14-16 Mayıs 2010, İzmir.

### **2. Kongreler, Kurslar**

1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu, Boğaziçi Üniversitesi, 18-19 Nisan 2009, İstanbul
2. IV. Kök Hücre Sempozyumu, TÜBA, 26-27 Haziran 2009, Ankara
3. Oksidatif stres, DNA hasarı, DNA onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi, 15-18 Haziran 2010, İzmir
4. Tanıda Moleküler Yöntemler XI. Biyokimya Yaz Okulu, Çukurova Üniversitesi, 14-17 Eylül 2010, Adana