T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜTÜSÜ

KRONİK PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE BAŞLANGIÇ PERİODONTAL TEDAVİSİNİN, DİŞETİ OLUĞU SIVISI RANKL ve OPG DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dt. Bahadır ŞATANA

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tamer ATAOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07102013 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA- 2009

ÖNSÖZ

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne;

Çalışmamızın başarıya ulaşmasında emeği geçen, S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Seyfullah Haliloğlu ve ekibine;

Doktoram süresince emeği geçen Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerine;

Bu tezin yapımı esnasında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canımdan çok sevdiğim aileme ve nişanlıma;

Bölümümdeki bütün arkadaşlarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR V

1.GİRİŞ 1

1.1.Dişeti Oluğu Sıvısı 4

1.2. Savunma Hücrelerinin Periodontal Ortamdaki Rolleri 6

1.2.1. Nötrofillerin Periodontal Ortamdaki Rolleri 6

1.2.2. Periodontal Ortamdaki Diğer Lökositlerin Fonksiyonu 7

1.2.2.1. Monosit/makrofajların rolü 7

1.2.2.2. Lenfositlerin Rolü 8

1.3. Periodontal Doku Yıkımı 9

1.4. Osteoklast Farklılaşmasının Düzenlenmesi 11

1.5. RANKL, RANK ve OPG'nin Keşfi 16

1.5.1. RANKL 16

1.5.2. RANK 18

1.5.3. Osteoprotogerin 18

1.6. Osteoklastlarda RANKL/RANK ile Transkripsiyon Faktör Aktivasyonu 19

1.7. Osteoimmünoloji 22

1.8. Periodontitisli Dokulardaki RANKL ve OPG Ekspresyonu 24

1.8.1. PTH ile Uyarılmış Osteoblastlardaki RANKL ve OPG Ekspresyonu 25

1.8.2. Periodontal Ligament Fibroblastlarından RANKL, OPG Ekspresyonu 26

1.8.3. Dişeti Fibroblastlarından RANKL ve OPG Ekspresyonu 27

1.8.4. Spesifik Periodontopatojenik Bakterilerin RANKL ve OPG Ekspresyonundaki Rolleri 30

1.9. İnterlökin-17 30

1.10. Th17 Hücreleri 30

1.11. Cerrahisiz Periodontal Tedavi 33

2. GEREÇ ve YÖNTEM 34

2.1. Çalışma Grubu 34

2.2. Klinik Periodontal Değerlendirme 35

2.2.1. Sondlama Cep Derinliği 35

2.2.2. Klinik Ataşman Seviyesi 35

2.2.3. Plak İndeksi 35

2.2.4. Gingival İndeks 36
2.3.Örnek Alınacak Dişlerin Tespiti 36
2.4. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklemesi 36
2.5. Cerrahisiz Periodontal Tedavi 37
2.6. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin Analizi 38
2.6.1. Total $RANKL^{DOS}$ Miktarının Belirlenmesi 38
2.6.2. $Osteoprotegerin^{DOS}$ Miktarının Belirlenmesi 39
2.6.3. İnterlökin-17^{DOS} Miktarının Belirlenmesi 40
2.7. Verilerin İstatistiksel Analizi 40

3.BULGULAR 42
3.1. Tedavi Öncesi Klinik Bulgular ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri 42
3.2. Tedavi Sonrası Klinik Bulgular ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri 43
3.3. Tedavinin Sığ Cep Örnekleme Alanlarına Etkisi 45
3.4. Tedavinin Derin Cep Örnekleme Alanlarına Etkisi 45
3.5. Klinik Periodontal Parametreler ile $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} İlişkisi 48
3.5.1. Sondlama Cep Derinliği ile İlişki 48
3.5.2. Klinik Ataşman Düzeyiyle İlişki 49
3.5.3. Gingival İndeksle İlişki 50
3.5.4. Dişeti Oluğu Sıvısı Hacmiyle İlişki 51

4.TARTIŞMA 52
5.SONUÇ ve ÖNERİLER 59
6. ÖZET 60
7. SUMMARY 61
8. KAYNAKLAR 62
9. ÖZGEÇMİŞ 74

KISALTMALAR

Aa	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CDT	Cytolethal distending toxin
ClC	Klorid kanal
DC	Derin cep
DOS	Dişeti oluğu sıvısı
ELISA	Enzyme linked-immuno-sorbent assay
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
Gİ	Gingival indeks
IL	İnterlökin
ICAM	Hücreler arası adezyon molekülü
$IL\text{-}17^{DOS}$	Dişeti oluğu sıvısı interlökin–17
IL-17R	İnterlökin-17 reseptörü
IGF	İnsulin benzeri büyüme faktörü
IFN	İnterferon
KAS	Klinik ataşman seviyesi
Maks	Maksimum
MCSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
Min	Minimum
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
MMP	Matriks metalloproteinaz
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NFATc1	Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü
OCIF	Osteoklast inhibe edici faktör
ODF	Osteoklast farklılaşma faktörü
OPG^{DOS}	Dişeti oluğu sıvısı osteoprotegerin
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin ligand
Ort	Ortalama
pg	Pikogram
Pg	Porphyromonas gingivalis
PGE_2	Prostaglandin E_2

Pİ	Plak indeksi
PL	Periodontal ligament
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PTH	Paratiroid hormon
PTHrP	Paratiroid hormonla ilişkili protein
RANK	Nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatörü
RANKL	RANK'ın ligandı
$RANKL^{DOS}$	Dişeti oluğu sıvısı RANKL
$RANKL/OPG^{DOS}$	Dişeti oluğu sıvısı RANKL/OPG
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SC	Sığ cep
SCD	Sondlama cep derinliği
sn	Saniye
Ss	Standart sapma
STAT1	Transkripsiyon 1'in aktivatörü ve sinyal dönüştürücüsü
Td	Trepenoma denticola
Th	Yardımcı T
Thp	Th projenitör
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFSF	Tumör nekroz faktör süperailesi
TÖ	Tedavi öncesi
TRAF	Tümör nekroz faktör reseptörle ilişkili faktör
Treg	Düzenleyici T
TS	Tedavi sonrası

1.GİRİŞ

Periodontal hastalık bakteriyel enfeksiyona karşı verilen lokal enflamatuvar cevap sonucunda meydana gelir ve doku bütünlüğünün kaybedilmesiyle sonuçlanır. Gingivitis dişetinde enflamasyonun görüldüğü fakat doku yıkımının geri dönüşebilecek kadar az olduğu bir periodontal hastalık formudur. Periodontitis subgingival bakterilere karşı verilen kronik enflamatuvar cevap sonucu geri dönüşü olmayan periodontal doku yıkımına ve diş kaybına yol açan hastalıktır. Periodontitisin ilerleyişi kronik, ağır ya da hafif seyreden periyodlar şeklindedir ve hastalığın erken evrelerinde hafif belirtiler vererek fark edilmeden kalabilir. Periodontitis klinik olarak; diş ve destek dokular arasındaki ataşmanın kaybı (klinik ataşman kaybı), dişin kökü ve destek dokular arasındaki cebin derinleşmesi (cep derinliği) ve/veya radyografide görülen kemik kaybı ile teşhis edilir (Offenbacher 1996). Amerikan Periodontoloji Akademisi'nin yayınlamış olduğu ortak bildiride gingivitisin nüfusun %90'ından daha fazlasını etkilediği bildirilmiştir. Aynı bildiride hastalığın daha şiddetli formu olan periodontitisin ise erişkin nüfusun %7-15'inde görüldüğünden bahsedilmektedir (Brown ve Löe. 1993).

Periodontitis patojenik bakterinin gerekli olduğu fakat tek başına yeterli olmadığı çok sayıda etkeni olan bir hastalıktır. Konağın mikrobiyal plağa karşı verdiği immün ve enflamatuvar cevap çevresel, davranışsal ve genetik faktörlerin etkisi altında yıkıcı bir hastalığın gelişimine olan yatkınlığın belirlenmesindeki en kritik faktördür. Bu nedenle, hastalığın ilerleyişi episodik olmasına rağmen periodontal hastalık gelişme riski bakımından alan-merkezli değil hasta-merkezlidir (Champagne ve ark. 2003).

Ağız boşluğu, sindirim sisteminin giriş yeridir. Sindirim organlarının mukozal yüzeyleri yiyecek, içecek, fırsatçı "kommensal" ve/veya virülan bakteri ve virüsler gibi çeşitli antijenlerle karşı karşıya gelmektedir. Mukozal immünite epiteldeki eşsiz T hücresi alt grupları ve salgısal "sekretuar" immünglobulin A'nın sekresyonuyla karakterizedir. (Nagasawa ve ark. 2007).

Dişler, transmukozal organlardır ve sindirim yolundaki tek sert dokudurlar. Bağlantı epiteli mikrobiyal atakları; özel yapısı sayesinde, epitelyal ve epitelyal

olmayan hücrelerin işbirliğiyle kontrol etmektedir. Bağlantı epitelinde hücreler arası bağlantı birimleri olan "desmozom" ve "gap junction" sayıları azdır, hücreler arası boşluk fazladır. Bu durum, hücreler arası boşluğa doğru lökosit infiltrasyonu ve gingival sulkusdan lamina propriaya doğru antijen difüzyonunu kolaylaştırır. İnsan dişeti lamina propriası çok vaskülarizedir (Schroeder ve Listgarten 1997). Lökositlerin seçici migrasyonlarının belirlenmesinde adezyon moleküllerinin ekspresyonu önemli rol oynamaktadır. Hücreler arası adezyon molekülü "Intercellular adhesion molecule" (ICAM)-1 ekspresyonunun artması nötrofillerin dişeti oluğuna doğru yönelmesini sağlayan önemli bir mekanizma olabilir (Tonetti ve ark. 1995). Sağlıklı dişetinde bağlantı epitelinden gingival sulkusa, dakikada yaklaşık 30.000 nötrofil göç etmektedir (Schenkein ve ark. 1999) ve bu nötrofiller bakteriye karşı korunmada önemli roller üstlenirler (Nagasawa ve ark. 2007).

Sağlıklı periodontal alanlar çoğunlukla gram-pozitif mikroorganizmaların baskın olduğu mikrobiyal plak ile karakterizedir. Bu durumda, dişeti oluğu sıvısı (DOS), dişeti dokusundan gingival sulkusa doğru akan serum eksudadır. Gingivitis, mikrobiyal plak kompozisyonunun gram-negatif mikroorganizmalar lehine değişmesiyle karakterizedir (Tonetti ve ark. 1998). Bu gram-negatif bakteriler yerel konak cevabını tetikleyerek dişetinde eritem, ödem, pürtüklülük kaybı, sondlamada kanama ve cep oluşumuna neden olurlar. Gingivitis birçok bireyde meydana gelmesine rağmen şiddeti değişkenlik gösterir. Histolojik olarak vasküler permeabilite artışı, vazodilatasyon, dokudan gingival sulkusa doğru sızan polimorfonükleer lökositlerden (PMNL, nötrofil) kaynaklanan eksuda gözlemlenebilmektedir (Page ve Schroeder 1976, Tsai ve ark. 1998). Nötrofiller bakterilere karşı savunmanın ilk hattını oluşturabilecek özelleşmiş antimikrobiyal mekanizmalara sahiptirler. Bakterilerce aktive edilen nötrofiller aynı zamanda konak enflamatuvar cevabın devam ettirilmesini sağlayan kemotaktik ve vazoaktif mediyatörleri üretirler. Lökotrien B_4, platelet aktive edici faktör, elastaz ve kollajenaz matriks metalloproteinaz (MMP)-8 gibi nötrofil kaynaklı ürünlere gingivitisli bireylerin DOS'unda sıklıkla rastlandığı için gingivitisin nötrofil-baskın bir cevap sonucu geliştiği düşünülmektedir. DOS'da nötrofil kemoatraktan interlökin (IL)-8 seviyesinin artması sağlıklı durumdan gingivitise geçiş sırasında görülen erken bulgulardan biridir (Tsai ve ark 1998). İnterlökin-1 veya tümör nekroz faktör (TNF)-α gibi monositik ürünlerin gingivitisli bireylerin DOS'unda düşük

bulunmaları, kronik enflamasyonla ilişkili hücrelerin düşük düzeyde aktive olduklarını göstermektedir. Periodontitiste gram-negatif mikrobiyal plak gelişir ve gingival sulkusun derinlerine doğru kolonize olarak (subgingival plak) kronik enflamatuvar cevabı arttırır. Spesifik subgingival patojenlerin varlığı hastalık oluşturmak için gereklidir fakat tek başına yeterli değildir (Beck ve ark 1990, Socransky ve ark. 1998). Supragingival plak miktarını değerlendiren plak skorları periodontal hastalığın klinik bulgularıyla pek ilişkili değildir (Page ve Beck 1997). Bununla birlikte plak kontrolü hastalarda ve hastalıklı alanlarda hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılmasında çok önemlidir. Çeşitli periodontal patojenler sağlık, gingivitis ve periodontitis ile olan ilişkilerine bakılarak çeşitli gruplar içerisinde tanımlanmış ve sınıflandırılmışlardır (Socransky ve ark. 1998). Plak olgunlaşıp daha patojenik olmaya başladıkça buna paralel olarak konak enflamatuvar cevabı akuttan kroniğe doğru dönüşmeye başlar. Gram-negatif periodontopatojenler mikrobiyal toksinleri, proteazları ve endotoksinleri (lipopolisakkarit) içeren veziküllerini boşaltarak konak savunma mekanizmalarından (kompleman, antikorlar, nötrofiller) kurtulabilirler. Lipopolisakkarit dokuya penetre olarak monositleri uyaran prostaglandin E_2 (PGE_2), tromboksan B_2, IL–1, IL–6, IL–8, TNF ve kollajenaz gibi enflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasına neden olur. Bu mediyatörler daha sonra vasküler düz kas hücrelerini, fibroblastları, monositleri ve osteoklastları MMP'leri üretmesi ve kemik yıkımını uyarması için aktive ederler. Bu enflamatuvar süreç klinik olarak enflamasyonla, ataşman kaybıyla, cep oluşumuyla, kemik kaybıyla ve en sonunda dişin çekimiyle sonuçlanır. Enflamatuvar mediyatörlerin monositik sentezlenmesinin yanı sıra aynı zamanda antijen sunumu da gerçekleşir. Konak cevabının bu kolu, adaptif immün cevabı başlangıçta "T helper" yardımcı T (Th) tip1 cevabıyla (pro-enflamatuvar, IL-2, TNF ve interferon-γ) ve sonrasında Th tip2-baskın cevapla (anti-enflamatuvar, IL-4, -5, -6, -10, -13 ve immünglobulinlerin üretimi) tetikler (Gemmel ve Seymour 1994, 1998). Gingivitisten periodontitise geçiş ile Th1'den Th2'ye geçiş arasında tutarlı bir ilişki söz konusudur (Shapira ve ark. 1994). Bununla birlikte, diğer çalışmalar (Salvi ve Lawrence 1997) aktif periodontal hastalığın ilerleyişi sırasında Th1 cevabın Th2 cevaptan daha baskın olduğunu ileri sürmektedir. Aynı çalışmada Th2 cevap ile hastalığın ilerleme göstermediği (stabil kaldığı) dönemler arasında da tutarlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. İnsanda aktif periodontal hastalığın ilerleyiş periyodları sırasında Th2'den Th1'e doğru olan bu geçiş hayvan modellerindeki hastalık ilerleyişiyle de tutarlıdır (Kawai ve ark. 1998).

Enflamatuvar sitokinler DOS içeriğinde saptanabilmektedir ve lokal immünregülatör ve enflamatuvar durum hakkında fikir vermektedirler. Ayrıca hidroksiprolin gibi kollajen yıkım ürünleri de DOS'da saptanabilmektedir ve hem yumuşak hem de sert doku yıkımının birlikte, direkt olarak tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Giannobile 1999). Bundan başka kronik periodontitiste hastalık ilerlerken akut bölümlerin üst üste çakışmasıyla nötrofil aktivasyonu gerçekleşir ve nötrofillerce üretilen bazı ürünlerin DOS'daki seviyeleri artar. Periodontal abse nötrofil infiltrasyonuyla doku pH'ını nasıl düşürüldüğünün, oksidatif metabolitler, IL-8, MMP'ler ve nötrofilik katepsinlerle ataşman yapılarının nasıl hızla yıkıma uğratıldığının en çarpıcı örneğidir. Ancak kronik lezyonlarda nötrofillere ulaşan sinyaller erken gingivitis lezyonlarındakilerden oldukça farklıdır ve vazoaktif moleküllerin katkıda bulundukları fagositoz ve nötrofil kaynaklı yıkımdan daha fazla doku yıkımı meydana getirirler. Bu yüzden ağızdaki bakterilere karşı verilen konak cevabının derecesi ve niteliği hastalığın şiddetini belirleyen en temel etkendir (Champagne ve ark. 2003).

1.1. Dişeti Oluğu Sıvısı

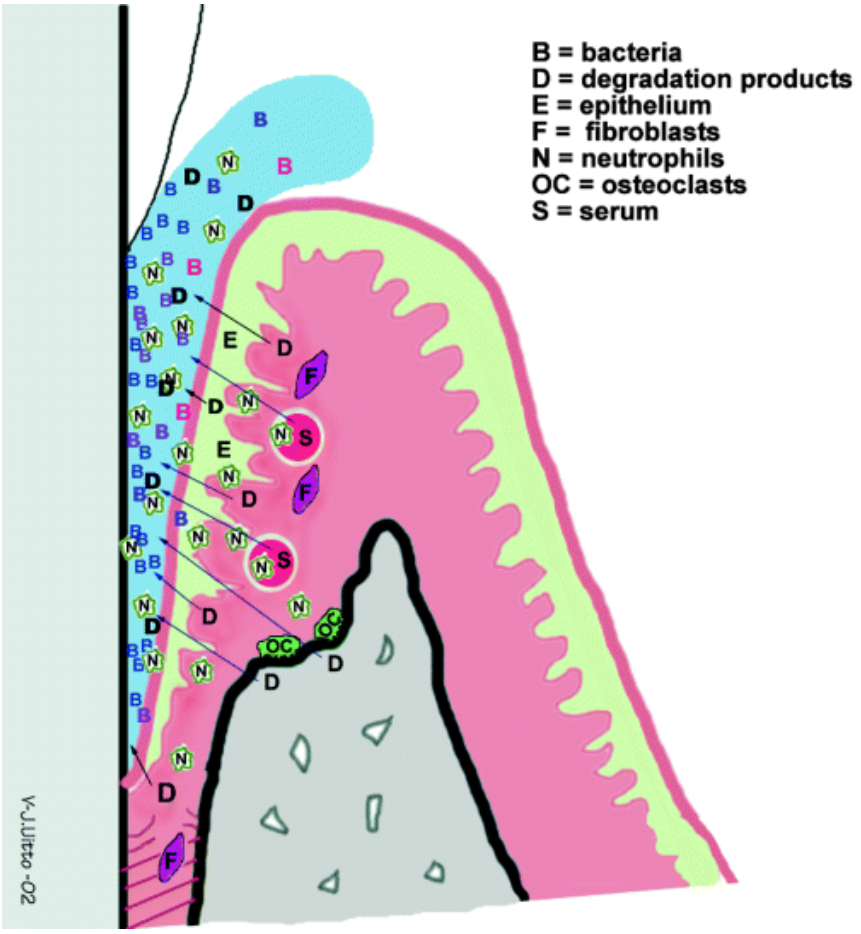
Dişeti oluğu sıvısı üzerine yapılan çalışmalar elli yıldır devam etmektedir. Waerhaug, 1950'lerin başında sulkusun anatomisini ve periodontitisin oluşumu sırasında sağlıklı sulkustan periodontal cebe geçişi araştıran öncü çalışmalar yapmıştır. Brill tarafından 1950'lerin sonunda, 1960'ların başında yapılan seri çalışmalarla DOS kompozisyonunun ve oluşumunun fizyolojisi anlaşılmaya başlamıştır. Löe ve Holm-Pedersen'in (1965) yaptığı çalışmalar DOS'un anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. DOS periodontal hastalığın belirteci olarak kullanılmaya başlamıştır. Egelberg DOS'u analiz etmeye devam etmiştir. Çalışmaları, DOS akışıyla ilişkili olan dentogingival kan damarları ve bunların permeabilitesi üzerine odaklıdır (Cimasoni 1974). DOS çalışmalarının sayısında 1970'lere gelindiğinde bir patlama olmuştur. Dentogingival yapının ve fizyolojisinin anlaşılmaya başlamasının temeli, Schroeder'in (1969) ve Listgarten'in (1966) yapmış oldukları önemli mikroskop çalışmalarıyla oluşturulmuştur. Enzimler başta olmak üzere DOS'daki proteinlerin varlığı ve fonksiyonları araştırma konusu olmuştur. Hasar görmüş periodontal dokulardan açığa çıkan enzimlerin periodontal diagnozdaki güçlü potansiyelleri daha sonradan anlaşılmıştır. DOS'daki kollajenaz

ve elastazın daha çok nötrofillerden köken aldığı ve aktivitelerinin dişetindeki enflamasyon ve cep derinliğiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (Uitto 2003). Nötrofillerin göçü, nötrofillerin DOS'daki ve dişeti dokusundaki fonksiyonları Attström ve Egelberg (1970) tarafından aydınlatılmıştır. Cimasoni, DOS ile ilgili monografisinin ilk baskısını 1974'te yayınlamıştır. Bu kapsamlı derleme DOS çalışmalarına önemli katkılarda bulunmuştur ve milenyumun sonuna doğru DOS üzerine yapılan çalışmalar çarpıcı biçimde artmıştır. Amerika'daki "Ulusal Kütüphane" nin 2003 yılında yapmış olduğu Pub-Med araştırmasında tıp bilimini ilgilendiren 1656 farklı DOS çalışmasına rastlanmıştır (Uitto 2003).

Bağlantı epiteli eşsiz bir dokudur. Keratinize olmayan bir epitelin yapısal değişiklik göstermeyen sert dokuya yaptığı bu bağlantının, vücutta başka örneği yoktur. Bu durum, dentogingival bağlantı epitelini periodonsiyumu koruması için olağanüstü bir mücadeleye iter. DOS, bağlantı epitelinin yapısının korunmasında ve periodonsiyumun antimikrobiyal savumasında çok önemli bir rol oynar (Delima ve Van Dyke 2003).

DOS serumdan, lökositlerden, periodonsiyumun yapısal hücrelerinden ve ağızdaki bakterilerden köken alan maddelerden oluşan kompleks bir sıvıdır (Şekil 1.1). İçeriğindeki bu maddeler periodontal hastalığın ve tedaviden sonraki iyileşmenin belirteçleri gibi hizmet eder. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) ve *Trepenoma denticola* (*Td*) gibi bazı şüpheli periodontopatojenler geniş spektrumlu nötral proteinazlar üretirler. Bu proteinazlar periodontitis hastalarının plak ve DOS örneklerinde saptanabilirler (Uitto 2003).

DOS'daki konak-kökenli maddeler antikorları, sitokinleri, enzimleri ve doku yıkım ürünlerini içermektedir. DOS'daki antikorlar hem yerel hem de sistemik olarak sentezlenen molekülleri kapsar. DOS içerisinde yer alan kollajen telopeptid parçaları ve osteokalsin gibi kemik-özel belirleyiciler (marker) periodontal kemik yıkımını yansıtırlar (Ebersole 2003).



Şekil 1.1. Dişeti oluğu sıvısı periodontal hastalıklara bakış için bir penceredir. DOS serumdan, lökositlerden, bakterilerden, aktive edilmiş epitel hücrelerinden, bağ dokusu hücrelerinden ve kemik hücrelerinden köken alan maddelerden oluşmuştur. Tüm bu maddeler periodontal doku yıkımını yansıtır ve periodontal durumun belirteçleri olarak kullanılırlar (Uitto 2003).

1.2. Savunma Hücrelerinin Periodontal Ortamdaki Rolleri

1.2.1. Nötrofillerin Periodontal Ortamdaki Rolleri

Nötrofiller monositler ve makrofajlar ile birlikte kemik iliğinde yer alan stromal hücrelerden köken alırlar. Bu hücreler ilikten ayrıldıktan sonra tamamen farklılaşırlar ve 6-9 saatlik yarı ömüre sahip olurlar. Nötrofiller enfeksiyon bölgesinin yerini saptar ve sınırlarlar. Hücre-dışı mikrobiyal parazitlere karşı ilk hücresel konak savunmasını yaparak enflamasyonun akut fazında önemli rol oynarlar. Aslında doğal veya non-spesifik immün cevabın üyeleridirler ve çözünür

antikorlar, kompleman sistem elemanlarıyla birlikte antikor-kompleman-nötrofil eksenini kurabilmek için uyum içerisinde çalışırlar (Miyasaki 1991).

Nötrofillerin spesifik fonksiyonları konak substratına yapışma, kemoatraktanlar yardımıyla göç etme (migrasyon), tanıma ve mikroorganizmanın fagositozudur. Bu yeteneklerinin herhangi birisindeki bozulma hastalığın klinik belirtilerini ortaya çıkartır (Van Dyke ve Hoop 1990). Nötrofiller, dişeti kan damarlarının endotellerinden diapedez yoluyla geçerek ve bağlantı epiteli boyunca göç ederek dişeti oluğuna katılırlar. Nötrofiller bakteriyel faktörler ve antijen komplekslerini içeren çeşitli kemotaktik faktörler tarafından kontrol edilmektedirler (Dennison ve Van Dyke 1997). Bu faktörlerin hepsi DOS'da mevcuttur ve bu hücreler gingival sulkusa ulaştıklarında mikrobiyal kolonizasyonu önlemek ve bakteriyel ürünleri etkisizleştirebilmek için çeşitli mekanizmalar sergilerler (Van Dyke ve Hoop 1990).

1.2.2. Periodontal Ortamdaki Diğer Lökositlerin Fonksiyonu

Dişeti dokusunda toplanan birçok nötrofil dişeti epiteline ve dişeti oluğuna doğru göç etmesine rağmen diğer tek-çekirdekli hücrelerin büyük çoğunluğu bağ dokusunda ve oral epitelin bazal tabakasının altında (sub-bazal tabakasında) kalmaya devam eder ve lokal enflamatuvar hücre infiltratını oluşturur (Kornman ve ark 1997). Bu hücre grubu monositleri, makrofajları, T ve B lenfositleri ve plazma hücrelerini içermektedir. Bu hücreler enflamatuvar durumun daha da kronikleştiği periodontal lezyonlarda görülürler (Page ve Schroeder 1976).

1.2.2.1. Monosit/makrofajların rolü

Monositler kemik iliğindeki öncü hücrelerden köken alırlar. Bu aşamadayken hala olgunlaşmamış oldukları düşünülmektedir fakat dokulara geçtikten sonra makrofajlara farklılaşırlar. Nötrofiller gibi bu hücreler de çok hareketlidirler fakat daha uzun yaşam süreleri vardır. Yine nötrofiller gibi ölümcül derecede farklılaşmazlar, yani dolaşımdan ayrılsalar bile hala prolifere olabilir ve çok çekirdekli dev hücreler oluşturabilirler. Bu hücreler de kemotaktik ajanlara cevap verirler ve yabancı antijenlerle savaşırlarken benzer enzimatik sistemleri kullanırlar.

Makrofajlar uzun ömürlü oldukları için genellikle kronik enflamasyonlarda baskın hücrelerdir (Page ve Schroeder 1976, Delima ve Van Dyke 2003).

Makrofajların iki farklı fonksiyonları vardır; bazıları fagositler gibi görev yapar ve patojenleri, yaşlanmış dokuları yutup parçalar, bazıları ise dokulara geçtikten sonra antijen-sunan hücreler gibi fonksiyon görür. Bu mekanizma T hücresi aktivasyonuna ve hücresel immün yanıtın düzenlenmesine yardımcı olur. Ayrıca bu hücreler IL–1 ve TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinler için temel kaynaklardan bir tanesidir. Pro-enflamatuvar sitokinler hücresel immünitenin aktivasyonuyla enflamatuvar sürecin arttırılmasına ve konak dokularının yıkımına katkıda bulunurlar. Teorik olarak monositler/makrofajlar dentogingival aralıkta nötrofillerinkine benzer bir rol üstlenirler. Fagositoz yoluyla koruyucu, lizozomal materyalin serbestlenmesiyle zarar verici konumundadırlar. Dişeti oluğu sıvısındaki immün hücrelerin %2-3'ü monositler veya makrofajlardır (Dennison ve Van Dyke 1997, Delima ve Van Dyke 2003).

1.2.2.2. Lenfositlerin Rolü

Lenfositler immün sistemin lenfoid koludur ve kazanılmış veya hücresel immünitenin temel efektör hücreleridir. Bu hücreler daha önceki bir karşılaşmada bakterilere veya diğer yabancı maddelere karşı konak tarafından elde edilmiş spesifik antijenlere karşı kullanılırlar. Lenfositler fagositoz yapmazlar ve çok hareketli değildirler. Lenfositler protein sentezleyebilirler fakat nötrofiller ve makrofajların üretmiş oldukları enzimatik ürünleri sağlayamazlar. T hücreleri ve B hücreleri lenfositlerin iki ana tipidir (Page ve Schroeder 1976, Nanci ve Bosshardt 2006).

T hücreleri

Timusta olgunlaşırlar ve en son dolaşım, lenf sistemlerinde farklılaşırlar. Lenfositlerin büyük çoğunluğu T hücreleridir ve bu hücreler kan ile lenf dolaşımı arasında ileriye, geriye hareket ederek en sonunda bağ dokusuna geçerler. Periferik kandaki lenfositlerin %60-70'i T lenfositlerdir. Tüm T hücrelerinde antijeni tanıyan spesifik bir T hücre reseptörü vardır. T hücreleri B hücreleri gibi çözünür antijenlerle uyarılmaz. Uyarılabilmeleri için işlemden geçirilmiş membrana bağlı antijenlerin, antijen sunan hücreler tarafından T hücrelerine sunulmaları gerekmektedir. T

hücrelerinin iki temel alt grubu vardır. Bunlardan her birisi hümöral cevabın düzenlenmesinde farklı rollere sahiptirler. Yarımcı T (Th) hücreleri, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmalarına yardımcı olurlar. Baskılayıcı T hücreleri immün hücrelerin sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitelerini uyarır ve böylece hücresel immün cevabı kontrol eder. İki alt grup da ilgili biyolojik aktiviteleri düzenleyen çeşitli sitokinler üretirler. T hücreleri hümoral cevabın düzenlenmesinden sorumludurlar (Page ve Schroeder 1976, Delima ve Van Dyke 2003).

B hücreleri/plazma hücreleri

B hücreleri hümöral immün cevapta birincil hücrelerdir ve antijen-spesifik antikorları üretirler. Bu antikorlar bakteriyel ajanların tutunmalarını engellerler ayrıca kompleman sistemin aktivasyonunu ve fagositlerin ortama gelişini tetikleyen immün kompleksleri oluştururlar. Bu moleküller aynı zamanda çözünebilir toksinlerin etkisiz hale getirilmesinde veya mikrobiyal ajanların opsonizasyonunda etkilidirler. B hücreleri kemik iliğinde farklılaşırlar ve plazma hücresine dönüşebilmek için bağ dokusuna katılırlar. Bu hücreler aynı zamanda DOS'da bulunurlar ve DOS'daki hücrelerin %1-2'sini oluştururlar. Periodontal lezyonlarda periferal kandakinin aksine B hücreleri T hücrelerinden yaklaşık üç kat daha fazla bulunmaktadır. Bu durum, B hücrelerinin periodontal dokuların savunmasında oynadıkları rolün önemini göstermektedir (Delima ve Van Dyke 2003, Kirkwood ve ark. 2007).

1.3. Periodontal Doku Yıkımı

Periodontal hastalığın başlayışı ve ilerleyişi konağın oral patojenlere karşı vermiş olduğu yanıt sonucu gelişir. Periodontal patojenler kollajen gibi ekstrasellüler matriksi yıkıma uğratacak zararlı ürünleri, enzimleri (hyaluranidaz, kollajenaz, proteaz gibi) üretirler ve bu yıkım ürünlerini daha sonra olası bir doku invazyonu veya gelişimleri sırasında kullanırlar. Birçok mikrobiyal yüzey proteini ve lipopolisakkarit molekül lokal doku enflamasyonuyla sonuçlanacak konak immün cevabı başlatabilir. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Pg* ve diğer periodontopatojenler sitoplazmik membranlar, peptidoglikanlar, dış membran proteinleri, lipopolisakkarit, kapsüller ve fimbria gibi çeşitli virülan faktörlere sahiptirler. İmmün ve enflamatuvar süreç başlatıldıktan sonra MMP'ler, sitokinler,

prostaglandinler ve diğer konak enzimleri gibi çeşitli moleküller lökositler, fibroblastlar ve diğer doku-kökenli hücrelerce üretilmeye başlar (Graves ve ark. 1999, 2001). Proteazlar periodontal dokuların kollajen yapısını bozabilirler ve böylece bir sonraki lökosit infiltrasyonuna ortam hazırlamış olurlar. Nötrofiller ve periodontal dokulardaki yerleşik hücrelerce üretilen kollajenaz, periodontal hastalıklarda ve diğer kronik enflamatuvar hastalıklarda doğal konak cevabının bir parçası olmasına rağmen, aktive edilmiş MMP'ler ve MMP'lerin endojen inhibitörleri arasında bir dengesizlik bulunmaktadır (Uchida ve ark. 2000).

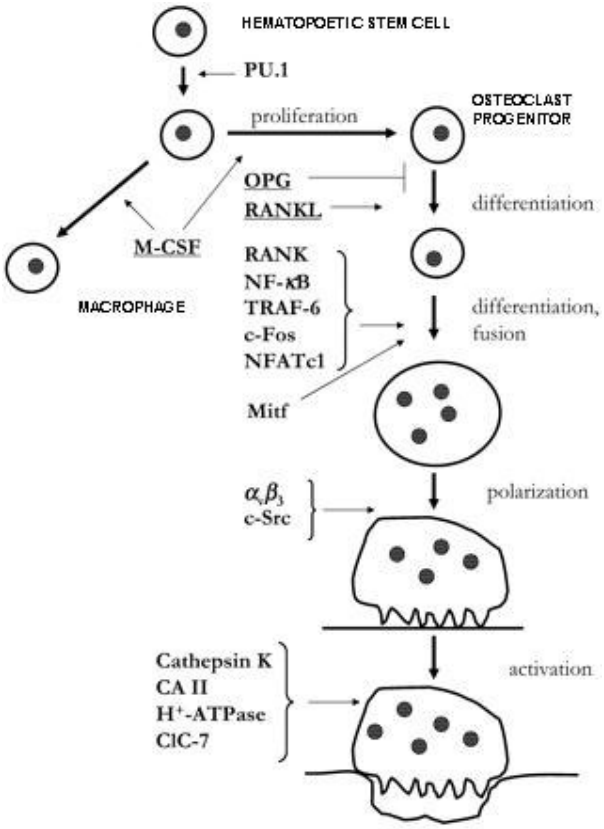
Hastalıklı dokuların içerisindeki aktive edilmiş osteoklastlar kemik yıkımının ayrılmaz bir parçasıdır (Crotti ve ark. 2003). Çeşitli enflamatuvar sinyaller TNF ligand ve reseptör ailesinin üç yeni üyesi olan nükleer faktör kappa B (NF-κB)'nin reseptör aktivatörü (RANK), RANK'ın ligandı (RANKL), veya osteoprotegerini (OPG) kontrol eder. Birtakım hormonlar ve sitokinler osteoklast farklılaşmasını, aktivasyonunu, fonksiyonunu ve yaşam süresini uzatarak osteoklastogenezisi yönlendirir (Aubin ve Bonnelye 2000, Hofbauer ve Heufelder 2001). Aktif osteoklastların oluşabilmeleri için makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gereklidir ayrıca monosit/makrofaj kökenli öncü hücreler ve osteoblastlar, stromal hücreler veya T ve B lenfositleri arasında hücre-hücre teması olması gerekmektedir. Bu hücrelerin tümü, bu süreç için gerekli olan RANKL'ı eksprese edebilirler. Osteoklastogenezisin oluşabilmesi için RANKL'ın osteoklast ve osteoklast prekürsörlerinin hücre yüzeyinde bulunan bir reseptör olan RANK'a bağlanması ve fonksiyonel osteoklastları oluşturabilmeleri için monosit/makrofaj kökenli hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmalarını uyarması gerekmektedir. Osteoblastlar, stromal hücreler ve diğer hücreler tarafından üretilen çözünebilir bir tuzak reseptör olan OPG, RANK/RANKL ilişkisini inhibe ederek RANKL'ın etkilerini ortadan kaldırır. Bu etki kemik ile ilgili hastalıklarda umut verici olarak değerlendirilmiştir. Periodontal patojenlerin varlığında (*Aa* gibi), CD4+ T lenfositlerinden eksprese olan RANKL düzeyleri artar ve bu durum osteoklast aktivasyonunu tetikleyerek romatoid artrit ve osteoporozda görülen kemik yıkımına benzer bir mekanizmayla kemik yıkımına neden olur (Mahamed ve ark. 2005, Teng ve ark 2000). Yıkıcı seyir daha fazla subgingival plak birikimine neden olur ve bu artış periodontal lezyonun şiddetlenmesiyle sonuçlanır. Periodontal cep derinleştikçe subgingival mikroflora daha anaerobik, konak cevabı da daha kronik ve yıkıcı olmaktadır. Periodontitisteki

enflamatuvar kemik kaybının ilerleyişi sitokinlerin bloke edilmeleri ve MMP'lerin yönlendirilmeleriyle durdurulabilir. Son zamanlarda, proteinlerin oluşumlarında rol alan bu hücre sinyal yollarının modülasyonu başlıca tedavi hedefleri arasında yerini almıştır (Kirkwood ve ark. 2007).

1.4. Osteoklast Farklılaşmasının Düzenlenmesi

Tek çekirdekli osteoklast projenitör hücreleri hematopoetik dokularda yer alan kök hücrelerinden köken alır. Bu kök hücreler prolifere olurlar ve tek çekirdekli projenitör hücrelere farklılaşıp dolaşıma katılırlar, daha sonra bilinmeyen yerel bir mekanizmayla kemik yüzeyini çevreleyen periosta ve endosteuma yerleşirler. Bir sonraki aşamada öncü hücreler farklılaşmaya devam ederler ve en sonunda kemik yüzeyinde çok çekirdekli osteoklastları oluştururlar. Kemik iliği kemik yüzeylerinde bulunan osteoklastların kemiğe dolaşım yoluyla mı, yoksa basitçe projenitör hücrelerin kemik yüzeylerine doğru göçü sonucu mu ulaştıkları tam olarak anlaşılamamıştır (Boyle ve ark. 2003). Kemiğin lokal çevresi kemik iliğinin kültür ortamına taşınmasıyla veya stromal hücreler/osteoblastların dalak hücreleri veya periferal kandaki lökositlerle birlikte kültür edilmesiyle *ex vivo* olarak taklit edilebilir. Bunun gibi sistemlerde, kültür edilmiş osteoklast öncü hücreler paratiroid hormon (PTH) veya $1.25(OH)_2$-vitamin D3 ile uyarıldıktan sonra aktive edilmiş çok çekirdekli osteoklastlara farklılaşabilir veya bu hücrelerin yapısına katılabilirler. Projenitör hücrelerin fonksiyonel olarak aktive edilmiş olgun osteoklastlara farklılaşabilmesi; transkripsyon faktörlerinin, hematopoetik sitokinlerin, hücre yüzey reseptörlerinin, proteolitik enzimlerin, fosfatazların, reseptörle ilişkili moleküllerin ve kinazların aktivasyonunu gerektirmektedir (Şekil 1.2), (Lerner 2004).

Transkripsiyon faktörü PU.1'den yoksun farelerde makrofaj ve osteoklastlara farklılaşacak projenitör hücreler olmadığı için makrofajlar ve osteoklastlar oluşamamıştır (Tondravi ve ark. 1997). Bir başka transkripsyon faktörü olan AP.1, Fos proteinlerini (c-Fos, FosB, Fra-1 ve Fra-2) ve Jun proteinlerini (c-Jun, JunB ve JunD) içeren heterodimerik bir protein olarak bilinmektedir. AP-1 yoksun farelerde osteoklastlar oluşamamıştır ve bu fareler osteopetrotik fenotip sergilemişlerdir (Lerner 2004).

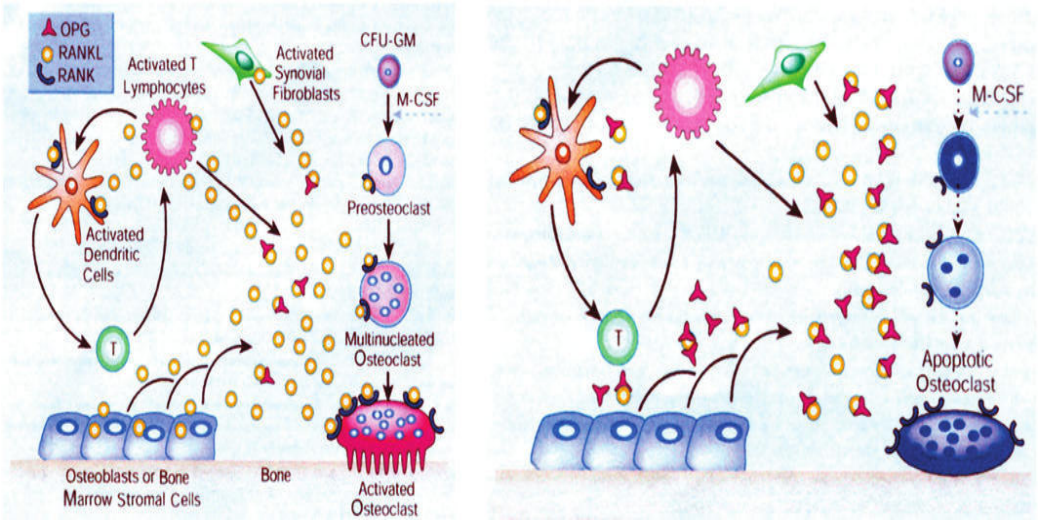


Şekil 1.2.. Osteoklast projenitör hücreleri monosit/makrofajlar ile yakından ilişkilidir ve ortak sinyalleme yollarıyla kontrol edilirler. Bununla beraber osteoklast-spesifik hattın farklılaşması, kaynaşması, polarizasyonu ve aktivasyonu sırasında çeşitli hücre-içi ve hücre-dışı sinyalleme molekülleri rol alır. Bu moleküllerden bazıları osteoklastlar, osteoklastların projenitör hücreleri ve bazı stromal hücreler/osteoblastlarca eksprese edilmektedirler (Lerner 2004).

Farelerde c-Fos geni silindiğinde osteoklast projenitör hücreleri azalmış ve buna bağlı olarak osteopetrotik fenotip gelişmiştir. Osteopetrotik fenotip kemik iliği transplantasyonuyla tedavi edilebilmiştir (Wang ve ark 1992). Yine c-Fos$^{-/-}$ farelerden elde edilen dalak hücre kültüründe osteoklastogenezisin gerçekleşemediği gözlenmiştir. Fos proteini formlarının transfeksiyonu sonucunda osteoklastogenezis gerçekleşebilmiştir. Jun transferi işe yaramazken en yüksek aktiviteyi Fra-1 göstermiştir (Matsuo ve ark. 2000). Aşırı Fra-1 eksprese eden transjenik (genetiği değiştirilmiş) fareler, c-Fos$^{-/-}$ farelerde osteopetrotik fenotip oluşumuna engel olmuşlardır. (Takayanagi ve ark. 2002).

Aynı kökenden gelen ve c-fms reseptörünün ligandı olan M-CSF, makrofaj/osteoklast öncü hücrelerin çoğalmaları ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gereklidir. Osteopetrozlu farelerin M-CSF geninde mutasyona rastlanılmıştır. RANKL veya RANK genleri ise projenitör hücrelerin farklılaşmaları üzerine fonksiyon görürler. RANKL veya RANK genleri silinirlerse veya aşırı OPG ekspresyonu olursa osteoklastogenezis gerçekleşemez. RANKL ve RANK bağlantısının gerçekleşememesi sonucu olgun osteoklastlar oluşamaz ve ortamdaki osteoklastlar apoptozise uğrar. OPG ekspresyonunun azalması aktif osteoklastların oluşmasıyla sonuçlanır. OPG geni silinen farelerde erken-yerleşen osteoporoz gelişmiştir (Şekil 1.3), (Cochran 2008).

Tümör nekroz faktör reseptörle ilişkili faktör (TRAF)6 geninin silindiği ve NF-κB proteinleri olan p50 ve p52'den yoksun olunduğu durumlarda, osteoklast projenitör hücreleri farklılaşamamışlardır (Naito ve ark. 1999). TRAF6 ve NF-κB RANK sinyalleme yolunun birer parçası oldukları için bu sonucun gözlenmesi, osteopetrozisin gelişmesi doğal bulunmuştur. Farelerdeki bu durum kemik iliği transplantasyonuyla düzeltilebilmiştir (Battaglino ve ark. 2002).



A **B**

Şekil 1.3. Çeşitli hücreler tarafından eksprese edilen RANKL osteoklast öncüleri üzerinde yer alan RANK'a bağlanarak osteoklastogenezisin gerçekleşmesine neden olur (A). RANKL'a oranla OPG miktarındaki artış RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engeller ve ortamdaki osteoklastların apoptozisine öncülük eder (B) (Cochran ve ark. 2008).

Tek çekirdekli osteoklast projenitör hücrelerinin olgun osteoklastlara farklılaşabilmeleri için çok çekirdekli osteoklastlarla kaynaşmaları ve kemiğe komşu osteoklast hücre membranının polarize olması gerekmektedir. Böylece sızdırmaz bölge (sealing zone) ve tırtıklı kenar (ruffle border) oluşumu gerçekleşmektedir (Lerner 2004). Osteoklastların kemik matriksine bağlanmalarıyla ortamda bulunan F-aktin halkaları arasında ilişki saptanmıştır. Bu olaya sızdırmaz alanda eksprese edilen integrin $\alpha_v\beta_3$ ve, osteopontin ve kemik sialoprotein'deki RGD (Arg-Gly-Asp) sekanslarının (adezyon sekansı) aracılık ettiği düşünülmektedir (Boyle ve ark. 2003). $\alpha_v\beta_3$ ekspresyonunun önemiyle ilgili yapılan bir çalışmada RGD içeren peptidlerin *in vitro* şartlarda kemik rezorbsiyonunu bloke ettikleri gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında $B_3^{-/-}$ farelerin çok çekirdekli osteoklastlar oluşturabilmelerine rağmen, tırtıklı kenarların düzensizliği ve oluşan osteoklastların aktin halkalardan yoksun olmaları nedeniyle daha az polarize olduklarını tespit etmişlerdir (Mc Hugh ve ark. 2000). Bu anomalilerin fonksiyonel önemi, kan kalsiyumun azalmasıyla, kemik yoğunluğunun artışıyla, $B_3^{-/-}$ farelerin *in vitro* şartlarda kemik rezorbsiyonu yapabilme etkinliklerinin azalmasıyla gösterilmeye çalışılmıştır (Lerner 2004). İlginç bir biçimde $\alpha_v\beta_3$'e bağlanan ligandın osteoklastların ekstrasellüler matrikse bağlanmasındaki rolü dışında hücre-içi sinyallemeye de katıldıkları belirtilmiştir. $\alpha_v\beta_3$ aktivasyonu hücre-içi kalsiyum değişiklikleriyle ve c-src aktivasyonuyla ilişkilidir (Zhang ve ark. 2002, Wang ve ark. 2003). $B_3^{-/-}$ farelere tam boy-B_3- integrin geni transfekte edilmiş ve bozulmuş osteoklast fonksiyonu düzeltilmiştir fakat sitoplazmik bölgesi olmayan B_3 integrinler transfekte edildiğinde aynı sonuç elde edilememiştir (Feng ve ark. 2001). Tırtıklı kenar oluşumu osteoklastogeneziste hayati öneme sahiptir. c-src'den yoksun fareler yeterli sayıda çok çekirdekli osteoklastlara sahip olmalarına rağmen, bu hücreler tırtıklı kenar oluşmadığı için rezorbsiyon yeteneklerini kaybetmişlerdir. (Boyce ve ark. 1992).

İntegrin $\alpha_v\beta_3$ ile osteopontin arasındaki etkileşimin kemik rezorbsiyonundaki önemi osteopontinden yoksun farelerde incelenmiştir. Osteopontin$^{-/-}$ farelerin overektomiyle tetiklenen kemik kaybına direnç geliştirdikleri bulunmuştur. Buna ek olarak fare kalvaryumu kültüründe PTH ile tetiklenen osteoklast oluşumu ve kemik rezorbsiyonu osteopontinden yoksun farelerde yapılan kültürde gözlemlenememiştir. Böylece osteopontinin sadece osteoklast polarizasyonunda değil aynı zamanda

osteoklastların kümelenmesinde de önemli rol aldığı anlaşılmıştır (Ihara ve ark 2001). Kemiğe bağlanıp tırtıklı kenar geliştiren farklılaşmış çok çekirdekli osteoklastlar hidroksiapatit kristallerinin çözülmesini ve kemik matriks proteinlerinin enzimatik olarak yıkılmasını sağlayan mekanizmalar ile kemiği rezorbe edici aktivite gösterir. Bu süreç tırtıklı kenardaki vakuoler tip H^+-ATPaz ile kontrol edilen proton sekresyonuyla başlatılır. Bu protein pompasıyla Howship rezorbsiyon lakünasında 4.5 pH değerine ulaşılır ve kemik minerali çözülür (Li ve ark. 1999, Lerner 2004).

Asit salgısının elektronötralitesinin sağlanabilmesi için, osteoklastik tırtıklı kenar membranlarında H^+-ATPaz ile birlikte klorid kanallarının da bulunması gerekmektedir. Son zamanlarda bir klorid kanal geninin osteoklast fonksiyonları üzerine olan kritik önemi gösterilmiştir. Klorid kanal (ClC)-7'yi eksprese eden genin silinmesi, farelerde şiddetli osteopetroz ve retinal dejenerasyonla sonuçlanmıştır (Kornak ve ark. 2001). ClC-$7^{-/-}$ farelerden izole edilen osteoklastların farklılaşmaları normaldir ve kemik yüzeyine bağlanabilmektedirler, fakat H^+-ATPaz'ı normal düzeylerde salgılayabilmelerine rağmen asit salgılayamazlar ve bu nedenle de rezorbsiyon lakünü oluşturamazlar. İnsan ClC-7 genindeki mutasyonlar hastalarda osteopetroza neden olmaktadır (Kornak ve ark. 2001, Campos-Xavier ve ark 2003).

Rezorbsiyon lakünasındaki demineralize edilmiş kemik, proteolitik enzimlerle yıkıma uğratılır. Kemik ekstrasellüler matriksindeki farklı proteinlerin yıkımında rol alan enzimlere ait bilgi çok sınırlıdır. Bununla beraber sistein proteazların önemli rol üstlendikleri ve genellikle sistein proteaz inhibitörlerinin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda kemik rezorbsiyonu için güçlü inhibitör oldukları gösterilmiştir. Katepsin K osteoklastlar tarafından bol miktarda eksprese edilen ve kollajenolitik aktiviteye sahip bir sistein proteazdır. Katepsin K geninin silinmesiyle osteopetrotik fenotipe sahip fareler meydana gelmiştir (Saftig 1998). Sistein proteazlar osteoklastların neden olduğu kemik rezorbe edici aktiviteye katılmalarının yanı sıra osteoklast farklılaşmasında da rol almaktadırlar (Lerner 2004).

MMP'lerin osteoklastik rezorbsiyondaki rolleri henüz açıklığa kavuşmamıştır. MMP'lere, Howship lakünasındaki aktivitelerinden çok osteoklastların ekstrasellüler matriks boyunca invaze olabilmeleri için gerek duyulmaktadır (Ensig ve ark. 2000).

1.5. RANKL, RANK ve OPG'nin Keşfi

Simonet ve ark. (1997) olası terapötik kullanımlar için çeşitli TNF reseptörleriyle ilişkili cDNA'ları yüksek miktarda eksprese eden farelerle çalışırlarken tesadüfen OPG'yi keşfetmişlerdir. Özel bir cDNA'yı yüksek miktarda ekprese eden farelerin kemiklerinde osteoklastların olmamasına bağlı olarak osteopetroz gelişmiştir. Bu proteini kodlayan gene osteoprotegerin "*kemik koruyucu"* ismi verilmiştir (Simonet ve ark. 1997). OPG osteoklastik kemik rezorbsiyonunu sınırlandırarak iskeleti kemik rezorbsiyonundan korumuştur. Bu çalışmadan bağımsız olarak bazı araştırmacılar standart yaklaşımlar kullanarak fibroblastlardan osteoklastogenezisi inhibe eden faktörü saflaştıran Rodan ve Martin'in hipotezini test ederlerken, özdeş bir molekül bulduklarını bildirmişler ve hemen arkasından OPG cDNA'sını klonlamışlardır (Yasuda ve ark. 1998).

İki grup OPG'nin ligandını sırasıyla OPG ligand ve osteoklast farklılaşma faktörü olarak tanımladı (Lacey ve ark. 1998). Bu ligand önceki yıl RANKL (Anderson ve ark. 1997) ve TNF ile ilişkili aktivasyonla tetiklenen sitokin olarak adlandırılırken daha sonra TNF ligand ailesinin üyesiyle özdeş bir molekül olarak tanımlanmıştır (Wong ve ark. 1997). Bir süre sonra OPG ligandı olarak tanımlanan bu molekülün hücresel reseptörünün Anderson ve ark. (1997) tarafından başka bir şirkette tanımlanan RANK ile özdeş bir molekül olduğu ortaya çıkarıldı.

RANK'ın insan CD40 hücre-dışı parçasının bir bölümüyle kısmi homoloji yaptığı gösterilmiştir. CD40, TNF reseptör üst familyasının bir üyesidir ve immün sistemdeki T hücrelerinin aktivasyonuna katılır. RANKL'ın dendritik hücrelerce uyarılmış T hücresi proliferasyonunu ve RANK eksprese eden hücrelerin yaşam sürelerini arttırdıkları tespit edilmiştir (Wong ve ark. 1997). RANKL'ın osteoklastogenezis ve T hücresi aktivasyonuna katıldığını gösteren bu çalışmalar gelişen osteoimmünoloji alanında birçok çalışmaya öncülük etmeye devam etmektedirler (Taubman ve ark. 2007).

1.5.1. RANKL

RANKL osteoklast farklılaşma faktörü (ODF), osteoprotegerin ligand (OPGL), TNF ilişkili aktivasyonca indüklenmiş sitokin (TRANCE) ve TNF

süperailesi (TNFSF)11 olarak da isimlendirilmektedir. RANKL kalsiterol (Vit. D), PTH, TNF, glukokortikoidler, PGE_2, IL-1, IL-11, tiroid hormonu, lipopolisakkarit, bakteriyel CpGp-DNA, viral çift iplikli DNA, histamin, fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2, insulin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 ve düşük yerçekimi gibi çeşitli sinyallere cevap olarak osteoblastlar ve stromal hücrelerce üretilen membrana bağlı bir faktördür. Lenf nodlarında, timusta ve akciğerde yüksek oranlarda eksprese edilirken, dalak ve kemik iliğini içeren çeşitli diğer dokulardan daha düşük seviyelerde eksprese edilir (Wada ve ark. 2006). RANKL kaynakları romatoid artritli hastalardaki eklem yıkımının yönlendirilmesinden sorumlu olabilirler (Schett ve ark. 2005). TNF aynı zamanda sistemik olarak dolaşan osteoklast öncülerinin sayıca artmasına ve kemik iliğini terk edip periferal kana ve oradan enflame eklemlere geçişine destek vererek eklemde doku yıkımına aracılık eder. Eklemlere geçişi takiben RANKL, IL–1 ile birlikte osteoklast öncülerinin bir araya gelmelerine ve osteoklastlara dönüşmelerine yardımcı olur (Nagasawa ve ark. 2007).

TNF gibi RANKL da olgunlaşmamış projenitör hücrelerin dolaşıma katılmalarını uyarmaktadır fakat RANKL, tirozin fosfataz-ε proteininden yoksun, defektli osteoklastlara sahip farelerde aynı etkiyi gösterememiştir (Kollet ve ark. 2006). Böylece RANKL tarafından tetiklenmiş osteoklast aktivasyonu, konak savunmasının ve homeostazın birer parçası olan projenitör hücrelerin ortamda tutulmalarını düzenler. Farelerdeki pre-klinik çalışmalar RANKL'ın aynı zamanda hamilelik sırasında meme bezine ait epitel hücreleri tarafından da eksprese edildiklerini ortaya koymuştur. RANKL meme bezi epitel hücrelerinin laktasyonel hiperplazisinde ve süt üretiminde de aktif rol oynamaktadır (Fata ve ark. 2000). Bazı malign tümör hücrelerinin de RANKL eksprese ettikleri gösterilmiştir ve RANKL'ın tümör hücrelerinin çoğalmalarında etkili olabileceği düşünülmektedir (Kim ve ark. 2006), fakat otokrin mekanizmayla mı, yoksa aktive olmuş T hücreleri gibi yardımcı hücrelerle parakrin biçimde mi hücre çoğalmasına katıldıkları bilinmemektedir. Bununla beraber, T hücreleri tarafından üretilen RANKL IFN-β ekspresyonunu tetikler (Takayanagi ve ark. 2002). TRAF6'yı yıkıma uğratan bu mekanizma T hücreleri tarafından üretilen interferon-γ ile arttırılabilir. TRAF6, RANK'a katılan ve RANK sinyallemesinde rol alan çok önemli bir adaptör proteindir (Takayanagi ve ark. 2000).

1.5.2. RANK

RANK osteoklast öncü hücrelerden, olgun osteoklastlardan ve dendiritik hücrelerden eksprese edilen tip 1 homotrimerik transmembran proteinidir. RANKL gibi RANK proteini de meme bezleri (Fata ve ark. 2000), göğüs ve prostat kanserleri gibi kemik metastazı yapabilme potansiyeli yüksek kanser hücreleri tarafından eksprese edilebilir (Kim ve ark. 2006, Chen ve ark. 2006). RANK'ın ekson 1'deki mutasyonları aktive etmesiyle RANK ile yönlendirilen NF-κB sinyallemesi artar ve osteoklast aktivitesinin artışıyla sonuçlanır. Bu artış ailesel Paget hastalığına sahip bazı bireylerdeki osteolizisten sorumludur (Hughes ve ark. 2000). RANK'ın tümör hücrelerinin çoğalmasındaki potansiyel rolü araştırılmaktadır ve eğer ispatlanırsa RANK gelecekteki tümör tedavilerinin hedefleri arasında olacaktır (Kim ve ark. 2006).

1.5.3. Osteoprotegerin

OPG RANKL'ı bağlayan çözünür bir tuzak reseptördür. Aynı zamanda osteoklast inhibe edici faktör (OCIF) olarak da bilinen OPG, osteoblastlardan başka kalp, böbrek, karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi birçok dokuda eksprese edilir (Wada ve ark. 2006). OPG ekspresyonu RANKL ekspresyonunu tetikleyen pek çok faktör tarafından düzenlenir. Çelişkili veriler olmasına rağmen genellikle RANKL'ın artışı OPG'nin azalmasıyla ilişkilidir veya en azından OPG'nin daha az uyarılmasına bağlıdır. Sonuç olarak RANKL/OPG oranı arttıkça osteoklastogenezis de artmaktadır. Birçok çalışma RANKL/OPG oranının kemik kütlesinin esas belirleyicisi olduğu iddasını desteklemektedir (Hofbauer ve Schoppet 2004). Otozomal resesif bir rahatsızlık olan ve artmış kemik remodelasyonu, osteopeni, kemik kırıklarıyla karakterize olan iki juvenil Paget hastasının OPG genlerinde homozigot 100 kilobaz uzunluğunda silinmeler olduğu rapor edilmiştir (Whyte ve ark. 2002). Aynı zamanda otozomal resesif bir kemik rahatsızlığı olan ve artmış kemik remodelasyonu, uzun kemiklerde deformiteler, kifozis ile karakterize idiyopatik hiperfosfatazi hastalığına sahip üç kerdeşte de OPG geninin üçüncü eksonunda silinme olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar OPG'nin insanlarda kemiği koruyan bir rol üstlendiğini desteklemektedir (Cundy ve ark. 2002). Osteoblastlardaki Wnt/β-katenin sinyallemesi de osteoblastik kemik oluşumunu düzenlemektedir (Boyce ve ark. 2005). Kemik kütlesi osteoblastlar ve osteoklastların

kombine etkileriyle belirlenmektedir ve osteoklastlardaki iki temel sinyalleme yoluyla düzenlenir: RANKL/RANK ve Wn/β-kantetin (Boyce ve Xing 2007).

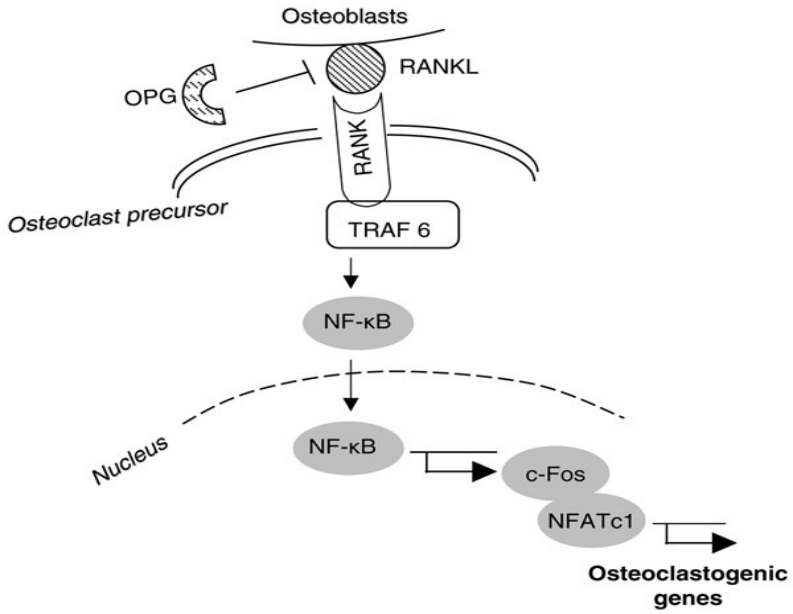
OPG'den yoksun farelerde görülen renal ve aortik kalsifikasyonlara dayanarak, OPG'nin aynı zamanda büyük kan damarlarını kalsifikasyondan koruduğu söylenebilir (Bucay ve ark. 1998). Ayrıca, hem OPG hem de apolipoprotein E'den yoksun farelerde OPG'nin olmayışı sadece apolipoprotein E'den yoksun olanlara oranla kalsifik atheresklerozu arttırmıştır (Bennet ve ark. 2006). Osteoprotegerin ve RANKL sinyallemelerinin kardiyovasküler rahatsızlıklardaki rolleri çelişkilidir ve bununla ilgili çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Örneğin kardiyovasküler hastalıklarda, kronik böbrek yetmezliklerinde ve diabetli hastalarda serum OPG düzeyleri yüksektir (Collin-Osdoby 2004). Bu tip hastaların serumlarındaki OPG, plazma proteinlerine bağlandığı için aktivitesini yitirmiş olabilir fakat bunun tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Rogers ve Eastell 2005).

1.6. Osteoklastlarda RANKL/RANK ile Transkripsiyon Faktör Aktivasyonu

RANKL/RANK sinyallemesinin osteoklast oluşumundaki hayati önemi anlaşıldıktan sonra, RANKL'ın osteoklast biyolojisindeki ve kemik rahatsızlıklarındaki rolünün daha kapsamlı olarak belirlenebilmesi için çalışmalar yapılmaya başlamıştır (Khosla ve ark. 2001). RANKL'ın, RANK'a bağlanmasından sonra sinyallemenin bir sonraki aşamasında, TRAF'ların RANK'ın sitoplazmik bölgesinde yer alan spesifik alanlara bağlanmaları gerekmektedir. TNF reseptörleri gibi transmembran protein olan RANK'ın sinyallemeyi gerçekleştirmek üzere protein kinazları aktive etmeye yönelik kabiliyeti yoktur. TRAF2, TRAF5, TRAF6 RANK'a bağlanır fakat TRAF6 ile olan bağlanma diğerlerinden daha önemli gibi gözükmektedir. Yapılan bir çalışmada sadece TRAF6'dan yoksun farelerde osteopetroz geliştiği gözlemlenmiştir. Birbirinden bağımsız üretilen iki mutant TRAF6 farede osteopetroz gelişmesine rağmen, bunlardan birisi şaşırtıcı bir şekilde normal osteoklast sayılarına (aktif olmayan osteoklastlara) sahiptir (Lomaga ve ark. 1999), diğeri ise osteoklast içermemektedir. TRAF6 etkinliğinin ortadan kaldırılmasına rağmen iki farklı osteoklast fenotipinin nasıl meydana geldiği tam olarak anlaşılamamıştır. RANK'ın aracılık ettiği protein kinaz sinyallemesi, en az yedi yolla aktive edilir. Bunlardan dördü (NF-κB kinaz/ NF-κB'nin inhibitörü, c-jun

amino-terminal kinaz/aktivatör protein-1, c-myc ve kalsinürin/ aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFATc1)) osteoklastogenezise doğrudan aracılık ederlerken, diğer üçü ise osteoklast aktivasyonuna (src ve MKK6/p38/MITF) ve bu hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerine (src ve hücre-dışı sinyali düzenleyen kinaz) öncülük ederler (Boyce ve Xing 2007).

Bazı adaptör moleküller TRAF'larla birlikte sinyallemeye aracılık etmek için RANK'a bağlanırlar. Bunlardan birisi Grb-2 ilişkili bağlayıcı protein-2'dir. Bu molekül tirozin kalıntılarında fosforilize olur src homoloji 2 parçalarını içeren çeşitli sinyalleme moleküllerine katılır. Grb-2 ilişkili bağlayıcı protein 2'nin kaybıyla RANKL/RANK tarafından farklılaşmaya uğratılan osteoklastlar azalır ve kemik rezorbsiyonu da azalarak hafif osteoporoz gelişir. RANKL tarafından tetiklenen osteoklastogeneziste bu molekülün önemli rol oynadığı söylenebilir (Wada ve ark. 2005).



Şekil 1.4. Normal osteoklastogenezis için gerekli sinyalleme yolu. Fizyolojik koşullar altında osteoblastlarca üretilen RANKL osteoklast öncülerinin yüzeyindeki RANK'a bağlanır ve adaptör protein TRAF6'yı bağlar. Böylece NF-κB aktivasyonuna ve çekirdeğe doğru yer değiştirmeye öncülük edilmiş olur. NF-κB c-Fos ekspresyonunu arttırır ve c-Fos osteoklastojenik genlerin transkripsiyonunu tetiklemek için NFATc1 ile etkileşime geçer. OPG RANKL'a bağlanarak bu sürecin başlatılmasını engeller (Boyce ve Xing 2007).

NF-κB/aktivatör protein-1/NFATc1 sinyallemesinin osteoklastogenezisteki önemi NF-κB ve c-Fos'un alt üniteleri olan p50 ve p52'nin hedef alındığı delesyonların (silinmelerin) yapıldığı farelerde gösterilmiştir. NFATc1$^{-/-}$ hematopoetik kök hücrelerinin Fos$^{-/-}$ farelerde osteoklast oluşumunu tetiklemelerinden sonra bu önem daha da iyi anlaşılmıştır. M-CSF uygulanan Fos $^{-/-}$ vaya NFKB p50/p52$^{-/-}$ osteoklast öncü hücrelerinde RANKL olmadığı halde NFATc1'in aktif formu osteoklast oluşumunu tetikler (Şekil 1.4), (Boyce ve Xing 2007).

Bu çalışmalar sonucunda NFATc1, osteoklastogenezisin temel düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Takayanagi ve ark. 2002). RANKL'a spesifik osteoklast farklılaşma mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için araştırmacılar kemik iliği monosit/makrofajlarında, özellikle RANKL tarafından tetiklenen genlerin belirlenmesi için genom taramaları yapmışlardır. NFAT ailesinin üyesi olan NFATc1'in, RANKL uyarısını takiben tetiklenen en güçlü transkripsiyon faktör geni olduğu tespit edilmiştir (Takayanagi ve ark. 2002). Önceleri T hücresi aktivasyonu ile ilişkili oldukları bilinen NFAT ailesinin transkripsiyon faktörlerinin aynı zamanda diğer biyolojik sistemlerdeki çeşitli hücrelerin gelişmesine ve fonksiyonuna da katılmaktadırlar. (Takayanagi ve ark. 2005d).

RANKL aynı zamanda NFATc1'i kalsiyum sinyallemesiyle uyarır ve aktive eder (Thielbaud ve ark. 1996) ve FK506, siklosporin A gibi kalsinürin inhibitörleri osteoklastogenezisi engeller. FK506'nın aracılık ettiği NFATc1 aktivitesinin inhibisyonu, NFATc1'in mRNA'sının defektli bir biçimde tetiklenmesiyle sonuçlanır. Bu sonuç NFATc1 indüksiyonun kendi aktivitesine bağlı olabileceğini göstermektedir yani NFATc1 muhtemelen kendi promotoruna bağlanarak kendi genini otoamplifiye etmektedir. NFATc1 geninin otoamplifikasyonu osteoklast farklılaşmasındaki en spesifik olaydır (Takayanagi ve ark. 2005b, Koga 2005).

NFATc1 geninin osteoklastogenezisteki rolü NFATc1$^{-/-}$ embriyonik kök hücrelerinin osteoklastlara farklılaşamamalarının gözlemlenmesiyle ortaya konmuştur. Kemik iliği monosit/makrofajları, RANK yoksunluğunda dahi NFATc1'in ektopik ekspresyonuyla farklılaşmaya gidebilmişlerdir. Bu yüzden NFATc1'in osteoklastların farklılaşmasında çok önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (Takayanagi ve ark. 2005b, 2005d).

1.7. Osteoimmünoloji

Fizyolojik koşullar altında, kemik periyodik olarak osteoklastlar tarafından rezorbe edilirken osteoblastlar tarafından tekrar oluşturulur. Osteoblastlar, osteoklastların kümelenmesini ve olgun osteoklastların aktivasyonunu içeren osteoklastik kemik rezorbsiyonunu düzenler (Suda ve ark. 1999). RANKL'ın ve tuzak reseptör OPG'nin keşfiyle osteoklastların farklılaşmalarının ve fonksiyonlarının osteoblastlar tarafından düzenlenebileceği fikri geçerlilik kazanmaya başlamıştır. Osteoklastların kümelenmesi osteoblastlardaki RANKL ve OPG dengesine bağlıdır. Genetiği oynanmış farelerde osteoblastların osteoklastlogenezisi desteklememesine bağlı olarak azalmış osteoklastik aktivite ve şiddetli osteopetroz gözlenmiştir. RANKL geni bozulmuş farenin aynı zamanda T hücre gelişiminde de anormallikler vardır. Bu durum RANKL'ın immün cevaplardaki önemine işaret etmektedir. T lenfositleri de aynı zamanda RANKL üretmektedir, ancak T hücrelerinden yoksun farelerde normal kemik metabolizmasının gözlemlenmesi belki de fizyolojik şartlar altında bu hücrelerin kemik rezorbsiyonuna katkıda bulunduklarının bir kanıtıdır. (Kong ve ark. 1999).

Enflamatuvar kemik rezorbsiyonunda aktif T lenfositleri yüksek miktarda çözünür RANKL üreterek kemik rezorbsiyonunu kontrol etmeye çalışmaktadırlar. RANKL osteoblastlarda membrana bağlı bir proteindir, fakat T hücresi üzerinden membrana bağlı RANKL ekspresyonu sınırlıdır ve T hücreler tarafından üretilen RANKL proteinin büyük çoğunluğu çözünür formda aktiftir (Kanamaru ve ark. 2004). Romatoid artrit hastalarından elde edilen T lenfositlerinde RANKL mRNA'sı saptanmıştır (Horwood ve ark. 1999). Artritli farelerde RANKL üreten T hücrelerinin meydana getirdiği kemik yıkımı OPG'nin ortama eklenmesiyle azalmıştır (Kong ve ark. 1999). Ayrıca, *Aa* ile enfekte olmuş agresif periodontitis hastalarından izole edilmiş T lenfositlerinin bu bakteriye cevap olarak RANKL eksprese ettikleri gösterilmiştir (Teng ve ark. 2000). Dışarıdan verilen T lenfositleriyle çökmüş bağışıklık mekanizması düzeltilen fareler oral yoldan *Aa* ile enfekte edilmişlerdir. Periodontitis hastalarından transfer edilen bu T lenfositleri şiddetli kemik yıkımına yol açmıştır ve bu yıkım da OPG ile baskılanmıştır. Meydana gelen yıkımın transfer edilen T lenfositlerinden eksprese olan RANKL tarafından kontrol edildiği düşünülmüştür (Kanamura ve ark. 2004, Nagasawa ve ark.

2002). Periodontitis hastalarının periferal kanındaki periodontopatojenlere spesifik T hücreleri (Mahononda ve ark. 1989) antijenlerle karşılaşarak RANKL üretebilmektedirler (Nagasawa ve ark. 2007). Aynı zamanda B lenfositlerinin de RANKL eksprese edip osteoklastogenezisi yönetebilecekleri bildirilmiştir (Choi ve ark. 2001).

T hücresinin aracılık ettiği osteoklast oluşumunun moleküler mekanizmasında RANKL ve IFN-γ karşılıklı etkileşir. IFN-γ yoluyla üretilen T hücreleri RANKL/RANK sinyallemesini engelleyerek osteoklastogenezisi baskılar. IFN-γ, RANK adaptör proteini olan TRAF6'nın hızlı bir biçimde yıkımını tetikler. Böylece, RANKL'ın indükleyeceği transkripsiyon faktörü NF-κB ve c-Jun N-terminal kinaz'ın aktivasyonu da engellenmiş olur (Takayanagi ve ark. 2000). Transkripsiyon 1'in aktivatörü ve sinyal dönüştürücüsü (STAT1), tip-1 IFN (IFN-α/β) gen transkripsiyonun önemli bir mediyatörüdür. Bu sinyal mekanizması virüslere karşı çok önemli bir konak savunması oluşturur (Takayanagi ve ark. 2005c). STAT1-defektli fareler IFN-β kaybına bağlı olarak osteoklastogeneziste artışa neden olmaktadırlar. Ancak, bu farelerdeki kemik yoğunluğu, osteoblast farklılaşmasındaki artışa bağlı olarak artmıştır (Kim ve ark. 2003). STAT1-defektli farelerdeki bu beklenmeyen fenotipler, interferonlar gibi immün-düzenleyici sitokinlerin RANKL sinyallemelerine katıldıklarını göstermiştir (Takayanagi ve ark. 2005a, Takayanagi ve ark. 2005b). Kemik biyolojisi ve immünolojisini içeren bu disiplinler-arası alan "osteoimmünoloji" olarak tarif edilmiştir (Arron ve Choi 2000).

Periodontitis lezyonlarında lenfositler, makrofajlar ve nötrofiller dişeti bağ dokusunda birikirler ve stromal hücrelerle ilişkiye girerler. Stromal hücreler (osteoblastlar, periodontal ligament fibroblastları, dişeti fibroblastları) ile enflamatuvar infiltratların (T ve B lenfositleri, makrofajlar) arasındaki ilişkiyi anlamak çok önemlidir. Makrofajlar ve T lenfositleri IL-1, IL-6, TNF-α, PGE_2 gibi enflamatuvar mediyatörler üreterek osteoblastlardan RANKL üretimini tetiklerler ve indirekt olarak kemik yıkımı meydana getirirler. T lenfositleri aynı zamanda RANKL'ı direkt üreterek osteoklast farklılaşmasına öncülük eder. Alveoler kemik rezorbsiyonu periodontal lezyonlardaki enflamatuvar infiltrat tarafından direkt veya indirekt biçimde gerçekleşebilir (Taubman ve Kawai 2001, Taubman ve ark. 2007).

1.8. Periodontitisli Dokulardaki RANKL ve OPG Ekspresyonu

Osteoimmünolojideki son gelişmelerle birlikte RANKL ve OPG'nin periodontitis patogenezindeki rolleri daha ayrıntılı biçimde araştırılmaya başlamıştır. Periodontitisli dokulardaki RANKL mRNA ekspresyonlarının reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada, RANKL eksprese eden bölgelerde RANKL-negatif bölgelere oranla daha derin periodontal ceplerin bulunduğu tespit edilmiştir (Nagasawa ve ark. 2002). Bu sonuçlara paralel olarak bir başka çalışmada, şiddetli periodontitis grubundaki RANKL mRNA düzeylerinin orta şiddetli periodontitis ve sağlıklı gruplara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada *in situ* hibridizasyon tekniğiyle RANKL mRNA seviyeleri hücresel düzeyde incelenmiştir. RANKL RNA'sının lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere daha çok enflamatuvar hücrelerce eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca enflamatuvar hücrelerin çevresinde prolifere olan epitelin de yüksek miktarda RANKL mRNA'sı eksprese ettiği saptanmıştır (Liu ve ark. 2003).

Periodontitisli hastaların kemik kaybı gözlenen alanlara komşu granülamatöz dokuları ve periodontitis olmayan hastalardan elde edilen dokular immünohistokimyasal yöntemle incelenmiştir. Periodontitisli dokulardaki RANKL protein seviyeleri daha yüksek, OPG protein seviyeleri ise daha düşük bulunmuştur, bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. RANKL proteini lenfositler ve makrofajlarla, OPG proteini ise endotel hücreleriyle ilişkilendirilmişlerdir (Crotti ve ark. 2003).

Mogi ve ark. (2004) periodontitis hastalarından ve sağlıklı bireylerden topladıkları DOS örneklerinde RANKL ve OPG konsantrasyonlarını değerlendirmişlerdir. Periodontitisli hastaların DOS örneklerinde yüksek RANKL, düşük OPG konsantrasyonlarına rastlamışlardır. Dişeti oluğu sıvısı RANKL ($RANKL^{DOS}$) konsantrasyonunun DOS OPG (OPG^{DOS}) konsantrasyonuna oranı ($RANKL/OPG^{DOS}$) periodontitisli grupta daha yüksek tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, artan RANKL üretiminin alveoler kemik yıkımıyla ilişkili olduğunu ve lenfositlerin periodontal dokularda RANKL eksprese eden majör hücrelerden biri olduğunu göstermektedir. Osteoblastlar, periodontal ligament

fibroblastları, dişeti fibroblastları gibi fibroblastik hücreler üzerinden eksprese olan RANKL ve OPG proteinleri genellikle *in vitro* ortamda hücre kültürü yöntemiyle incelenmektedir (Nagasawa ve ark. 2007).

1.8.1. PTH ile Uyarılmış Osteoblastlardaki RANKL ve OPG Ekspresyonu

PTH fizyolojik kemik remodelasyonunun major mediyatörü gibi fonksiyon görür. PTH ilişkili peptid, kötü huylu tümörlerde görülen hümöral hiperkalsemi sendromlarının çoğundan sorumludur (Philbrick 1998). PTH genellikle kemik rezorbsiyonunu aktive eder fakat belirli aralıklarla PTH uygulaması kemik oluşumuna yol açmaktadır. Ligatür bağlanarak periodontitis modeli oluşturulan sıçanlara, belirli aralıklarla PTH uygulanmış ve PTH'ın periodontitisle ilişkili kemik kaybını önlediği gözlenmiştir (Barros ve ark. 2003). Overektomi yapılmış sıçanlara uygulanan aralıklı PTH uygulaması alveoler kemik kaybını azaltmıştır (Marques ve ark. 2004). PTH ve PTH ilişkili protein (PTHrP)'nin periodontitis üzerine olan etkilerini araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde sekonder hiperparatiroidizmin hemodiyalizdeki hastaların periodonsiyumu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Sekonder hiperparatiroidizmin klinik ataşman seviyesi, sondlanabilir cep derinliği, gingival indeks, alveoler kemik kaybı gibi periodontal bulgular üzerinde fark edilebilir bir etkisi olmadığı görülmüştür (Frankenthal ve ark. 2002).

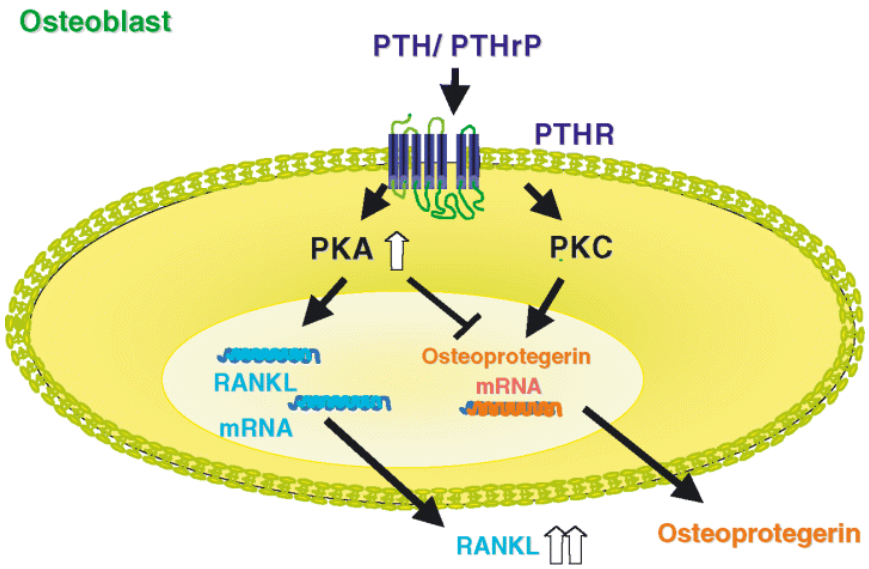
PTH reseptörünün osteoklastogenezisteki rolünün anlaşılabilmesi için PTH bağımlı osteoklastogenezisi destekleyecek osteoblast hücre soyu oluşturulmuştur. PTH reseptöründen yoksun farelerden elde edilen osteoklast öncüleriyle osteoblast hücre soyu birlikte kültür edildiklerinde PTH'a cevap olarak osteoklastlar oluşmuştur. Bu sonuç PTH reseptörlerinin osteoklastlarda değil osteoblastlarda bulunduklarını göstermektedir. PTH stromal/osteoblastik hücreler üzerinde bulunan kendi reseptörüne bağlanarak ve RANKL üretimini arttırarak, OPG üretimine engel olarak osteoklast oluşumunu uyarmaktadır (Huang ve ark. 2004).

PTH/PTHrP tarafından oluşturulan sinyaller siklik adenozin monofosfat (cAMP)/protein kinaz A (PKA) ve fosfolipaz C/protein kinaz C'dir (PKC). PTH reseptörü yoluyla sinyallenen cAMP/PKA, RANKL bağımlı osteoklastogenezisin kontrol edilmesindeki birincil mekanizmadır (Kondo ve ark. 2002) . Osteoblastlarda

PKA aktivasyonuyla RANKL ekspresyonu, PKC aktivasyonuyla ise OPG ekspresyonunu tetiklenmektedir (Fu ve ark. 2002), (Şekil 1.5).

1.8.2. Periodontal Ligament Fibroblastlarından RANKL, OPG Ekspresyonu

Dişeti keratinositleri, periodontal ligament fibroblastları, dişeti fibroblastları ve pulpa hücrelerindeki RANKL, OPG mRNA ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada dişeti keratinositleri dışındaki tüm hücrelerde OPG mRNA'sı saptanmıştır. RANKL mRNA'sı bu hücrelerde tespit edilememiştir. IL–1 ve TNF-α periodontal ligament fibroblastlarındaki OPG mRNA'sını arttırmıştır fakat IL–6 ve TNF-β'nın bu hücrelerdeki OPG mRNA seviyesi üzerine etkisi çok az bulunmuştur. Dental mezanşimal hücreler tarafından sentezlenen OPG'nin alveoler kemik, sement, dentin gibi sert dokulardaki rezorbsiyonu lokal olarak düzenlediği öne sürülmüştür (Sakata ve ark. 1999).



Şekil 1.5. PTH ile uyarılmış osteoblastlardaki RANKL ve OPG ekspresyonu (Nagasawa ve ark. 2007).

Periodontal ligament (PL), ortodontik ve periodontal tedavilerdeki kemik oluşumunda ve rezorbsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Uygun koşullarda bekletilen PL fibroblastları fare kemik iliği kültürüne eklendiğinde $1\alpha25(OH)_2D3$ varlığına rağmen osteoklast oluşumunu engellemişlerdir. Periodontal ligament

fibroblastları tarafından üretilen OPG pre-osteoklastların farklılaşmasını ve fonksiyonlarını bozmuştur (Wada ve ak. 2001). Deksametazon ve 1α25$(OH)_2$D3 uygulamaları sonucu PL fibroblastlarındaki OPG mRNA seviyeleri azalmıştır. Tersine aynı uygulamayla RANKL mRNA seviyeleri artmıştır. Periodontal ligament fibroblastlarının RANKL ve OPG'nin her ikisini de sentezleyebileceği belirtilmiştir. OPG aktivasyonunun önlenmesinin, osteoklast oluşumunda anahtar rol oynayabileceği düşünülmektedir (Hasegewa ve ark. 2002).

Osteoklastogenezis sırasında periferal tek çekirdekli kan hücreleriyle PL fibroblastları arasındaki hücre-hücre ilişkileri incelenmiştir. Birlikte kültür edilen grup, periferal tek çekirdekli kan hücrelerinin tek başına kültür edildiği gruptan daha fazla osteoklast oluşturmuştur. PL fibroblastlarının RANKL ve OPG mRNA'sı eksprese ettikleri gösterilmiştir. PL fibroblastlarının hücre-hücre kontakları kurarak osteoklastogenezisi desteklemiş olabileceği belirtilmiştir (Kanzaki ve ark. 2001).

Ortodontik diş hareketi sırasında, dişin kronuna uygulanan ortodontik kuvvet periodontal ligament ve alveoler kemiğe doğru iletilir ve bunun sonucunda basınç altındaki bölgede osteoklast oluşumu gözlenir. Mekanik stresin PL fibroblastları ve osteoklastogenezis üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada sürekli basınç altında tutulan PL fibroblastları periferal kan monositleriyle kültür edilmiş ve RANKL mRNA ekspresyonları karşılaştırılmıştır. PL fibroblastlarındaki RANKL mRNA ekspresyonu sıkıştırma kuvvetiyle birlikte artmıştır ve bu artış osteoklast oluşumundaki artışla paraleldir. Sıkıştırma kuvvetinin etkisiyle PL fibroblastlarından siklooksijenaz-2 mRNA ekspresyonu da başlamıştır. Sıkıştırma sonucu artış gösteren RANKL seviyeleri indometazin uygulamasıyla inhibe edilmiştir. PL fibroblastlarının PGE_2 sentezi yoluyla RANKL miktarının artması sonucu osteoklastogenezisi tetikleyebileceği belirtilmiştir (Kanzaki ve ark. 2002).

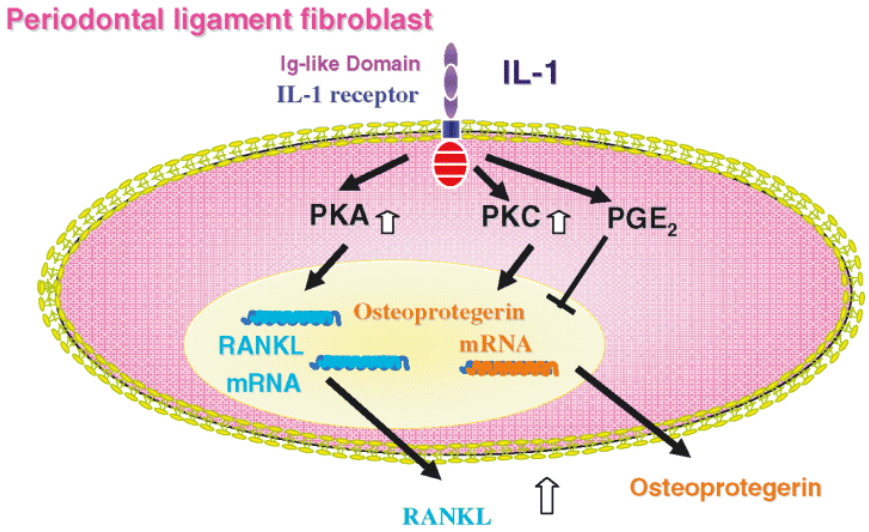
1.8.3. Dişeti Fibroblastlarından RANKL ve OPG Ekspresyonu

Deksametazon ve 1α25$(OH)_2$D3 varlığında farelerin çeşitli dokularındaki fibroblastlardan eksprese edilen RANKL, tüm fibroblastik hücrelerin osteoklastogenezisi destekleyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte dişeti dokusunda osteoklastlara rastlanmaz, bu durum diğer dokulardaki fibroblastik

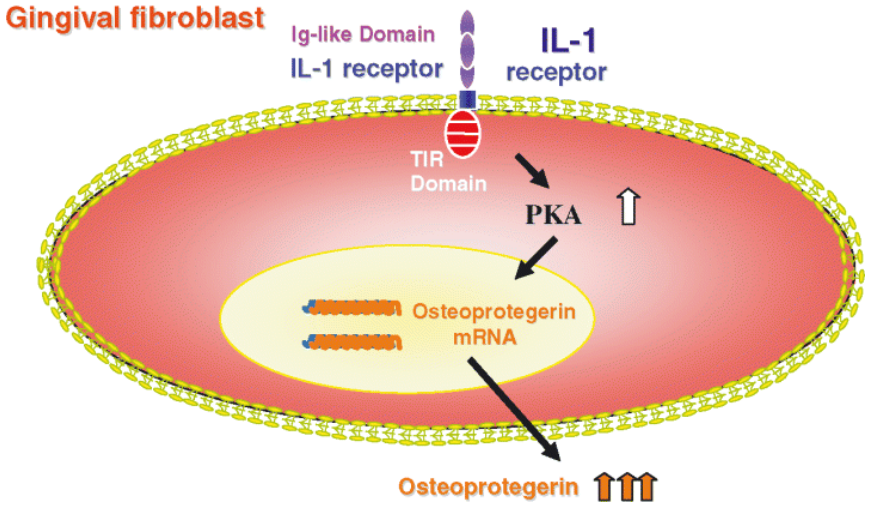
hücrelerin osteoblastlardan farklı fonksiyonlara sahip olabileceklerini ortaya koymaktadır (Quinn ve ark. 2000).

Lipopolisakkarit ile uyarılan dişeti fibroblastları OPG üretip osteoklastogenezise engel olurlar fakat bu komponentler doku derinliklerinde PL fibroblastlarına ve osteoblastlara ulaşırsa, bu hücrelerce osteoklastogenezis uyarılır (Nagasawa ve ark. 2002). Lipopolisakkarit ve bakteriyel DNA osteoblastlardaki RANKL ekspresyonunu tetikler (Kikuchi ve ark. 2003, Zou ve ark. 2003). *Aa* ile uyarılmış PL fibroblastları RANKL üretirler ve RANKL ekspresyonu PGE_2 tarafından düzenlenir (Tiranathanagul ve ark. 2004). *Porphyromonas gingivalis*, *Td* ve *Treponema socranskii* gibi bakterilerin osteoblastları RANKL üretimi için uyardıkları gösterilmiştir (Choi ve ark. 2005).

Herhangi bir uyaranın olmadığı durumlarda da, dişeti fibroblastları PL fibroblastlarından daha fazla OPG ve daha az RANKL üretmiştir. Her iki hücre IL-1 ile uyarıldığında durum yine değişmemiş ve dişeti fibroblastları PL fibroblastlarına oranla daha fazla OPG üretmişlerdir (Hormdee ve ark. 2005). PKA inhibitörü IL-1 ile uyarılmış dişeti fibroblastlarındaki OPG üretimine engel olmuştur fakat PL fibroblastlarında aynı etkiyi gösterememiştir. PKA aktivatörü dişeti fibroblastlarında OPG üretimini arttırmış fakat PL fibroblastlarında etkin olamamıştır. PKC inhibitörü IL-1 ile uyarılmış PL fibroblastlarında OPG üretimini baskılamıştır, PKC aktivatörüyse PL fibroblastlarındaki OPG üretimini arttırmıştır. Dişeti fibroblastlarındaki PKC-bağımlı OPG üretimi osteoblastlardakine benzemektedir (Kondo ve ark. 2002). PL fibroblastlarının osteoblastların bazı özelliklerini sergilediği saptanmıştır (Şekil 1.6). Dişeti fibroblastlarındaki PKA-bağımlı OPG üretiminin ise bu hücrelerinkinden farklı olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.7), (Nagasawa ve ark. 2007).



Şekil 1.6. IL-1 ile uyarılmış PL fibroblastlarındaki RANKL ve OPG ekspresyonu: IL-1 reseptörü Ig-like domain ve toll-like (TIR) domain olmak üzere iki parçadan oluşur. IL-1 reseptörü PL fibroblastları üzerinden eksprese olur ve IL-1 dişeti fibroblastlarını PKA ve PKC yollarını aktive etmeleri için uyarır. PKA aktivasyonu PL fibroblastlarında RANKL ekspresyonunu arttırırken OPG ekspresyonunu azaltır. PKC aktivasyonu osteoblastlardan OPG üretimini arttırır (Nagasawa ve ark. 2007).



Şekil 1.7. Il-1 ile uyarılmış dişeti fibroblastlarındaki OPG ekspresyonu: IL-1 reseptörü Ig-like domain ve TIR domain olmak üzere iki parçadan oluşur. IL-1 reseptörü dişeti fibroblastları üzerinden eksprese olur ve IL-1 dişeti fibroblastlarını PKA yolunu aktive etmeleri için uyarır. PKA'nın aktivasyonu, dişeti fibroblastlarındaki OPG ekspresyonunu arttırır (Nagasawa ve ark. 2007).

1.8.4. Spesifik Periodontopatojenik Bakterilerin RANKL ve OPG Ekspresyonundaki Rolleri

Hem *Pg* hem de *Aa* periodontitiste sık gözlenen periodontopatojen bakterilerdir (Ishikawa ve ark. 1997). Okahashi ve ark (2004) *Pg* ile oluşturulan enfeksiyonun osteoblastlardaki RANKL üretimi üzerine olan etkisini incelemişlerdir. *Pg* osteoblastlardan RANKL üretimini tetiklemiştir. Arjinin ve lizin spesifik sistein proteinazlardan yoksun "*Pg* KDP136" RANKL üretimini arttıramamıştır. Bu nedenle sistein proteinazların RANKL üretimine katıldıkları düşünülmektedir (Okahashi ve ark. 2004). *Pg*'nin RANKL üretiminin yanında OPG'nin azalmasında da etkili olabileceği belirtilmiştir (Kobayashi-Sakamato ve ark. 2004).

Lipopolisakkarit ile uyarılmış dişeti fibroblastları RANKL üretememelerine rağmen (Nagasawa ve ark. 2002) *Aa*'nın virülan faktörlerinden olan "cytolethal distending toxin (CDT)" dişeti fibroblastlarından RANKL üretimine sebep olmuştur (Belibasakis ve ark. 2005). Bu sonuçlara bakarak *Pg*'nin ve *Aa*'nın dişeti fibroblastları, periodontal ligament fibroblastları ve osteoblastlardan RANKL ekspresyonunu tetikleyebilen mekanizmalara sahip olabilecekleri belirtilmiştir.

1.9. İnterlökin-17

Sitokinler olarak da bilinen interferonlar ve interlökinler, Th hücrelerin kaderinin belirlenmesinde rol alan moleküllerdir. Memelilerde çeşitli biyolojik aktivitelerden sorumlu 200'den fazla sitokin saptanmıştır. Sitokinler öncelikle reseptör yapılarına bakılarak alt gruplara ayrılırlar. Tanımlanan en yeni grup IL-17 süper-ailesidir (Aggarwall ve Gurney 2002). IL-17 ve IL-17R (IL-17 reseptörü) ailesi üyelerinin amino asit sıralamaları diğer sitokin sınıflarıyla çok az bir benzerlik gösterir. Kemirgenlerde ve insanlarda altı IL-17 ailesi üyesi (IL-17A-F) ve beş reseptör tanımlanmıştır (Kramer ve Gaffen 2007).

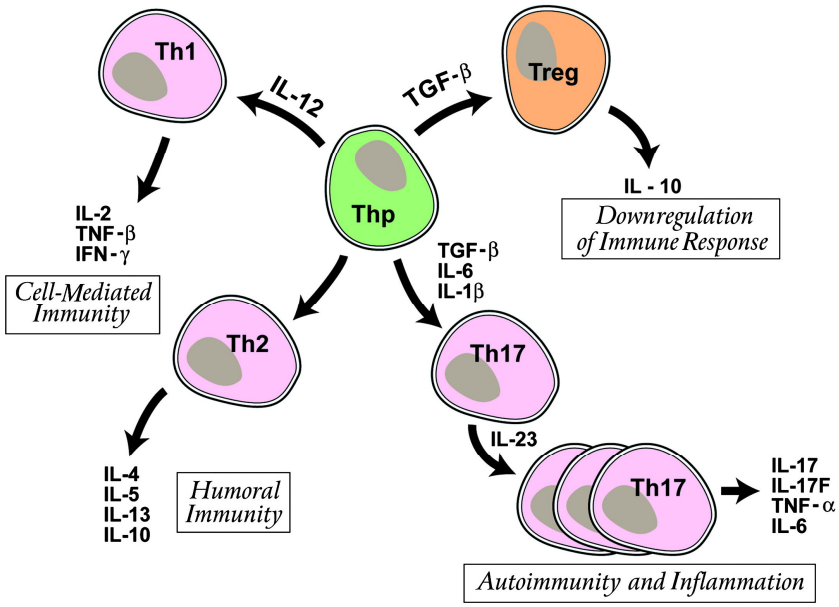
1.10. Th17 Hücreleri

$CD4^+$ Th hücrelerinin farklı tipteki immün cevapları düzenleyen ve farklı sitokinler salgılayan fonksiyonel alt gruplara ayrıldıkları bilinmektedir. Th projenitör (Thp) hücreleri IL-12 varlığında Th1, IL-4 varlığında ise Th2 hücrelerine farklılaşırlar. Th1 hücreleri IL-2, TNF-β, IL-12 ve IFN-γ salgılayıp hücresel

bağışıklığa aracılık ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 üretip hümöral bağışıklığa aracılık eder. Son olarak Th1'den ve Th2'den farklı yeni bir Th hücresi alt grubu keşfedilmiştir. Th17 olarak adlandırılan bu alt grup Th1/Th2 modelinin bazı eksik noktalarını açıklamaktadır. IL-12 ailesi sitokini olan IL-23'ün T hücrelerini IL-4 veya IFN-γ üretimi için uyarması beklenirken, IL-17 üretiminin arttığı görülmüştür (Hapel ve ark. 2003). Daha sonra yapılan bazı çalışmalar (Veldhoen ve ark. 2006, Bettelli ve ark. 2006) Th17 hücrelerinin, transforme edici büyüme faktörü (TGF) -β, IL-6 ve IL-1β varlığında ortaya çıktıklarını ve özellikle IL-23 tarafından sayıca arttırıldıklarını göstermiştir (Şekil 1.8). Th17 hücreleri, düzenleyici T (Treg) hücrelerinin gelişimine antagonistik etki gösterir. Böylece proenflamatuvar cevap artar ve otoimmüniteye öncülük edilmiş olunur (Mangan ve ark. 2006). Bu eşsiz alt-grup enflamatuvar ve otoimmün rahatsızlıkların ilerlemesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Th17 hücreleri IL-17 dışında IL-17F, IL-22, IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerin sentezlenmelerine neden olurlar (Liang ve ark. 2006). Enflamasyonla kanser arasında bir ilişki olduğu ve IL-23, IL-17 gibi sitokinlerin kansere neden olabilecekleri bildirilmiştir. IL-23 ve IL-17'nin insanlardaki tümör hücrelerinde arttığı rapor edilmiştir (Langowski ve ark. 2006).

Th hücre yolu üzerinde bulunan ve antijen sunan hücreler olarak da bilinen dendritik hücreler enfeksiyona karşı başlangıç reaksiyonu oluşmasını sağlarlar. Bu cevap, özel T hücresi popülasyonlarına farklılaşmaya yol açan ilgili sitokin sinyallerinin iletilmesini içermektedir (Kramer ve Gaffen 2007). IL-17'nin periodontal lezyonlardaki önemi tam olarak anlaşılamamasına karşın, periodontitis hastalarında tespit edilen IL-17 varlığı bu sitokinin periodontal enflamasyona aracılık ettiğine işaret ediyor olabilir. Th17 hücreleri tarafından üretilen sitokin profili periodontal lezyonlarda tespit edilen sitokin profiliyle benzerlik göstermektedir. Periodontitis hastalarının dişeti dokularından izole edilen $CD4^+$ T hücre klonlarının büyük çoğunluğu IL-17 eksprese etmektedir (Ito ve ark. 2005). IL-17 aynı zamanda periodontal cerrahi sırasında biyopsi amaçlı alınan periodontal dokularda tespit edilmiştir (Takahashie ve ark. 2005). Periodontitis hastalarından elde edilen DOS örneklerinde ve kültür süpernatanlarında periodontitisli olmayanlardan toplanan örneklere oranla çok daha yüksek bir DOS IL–17 ($IL\text{-}17^{DOS}$) düzeyi saptanmıştır (Vernal ve ark. 2005). Gingivitisli ve periodontitisli hastalardan izole edilen periferal

tek-çekirdekli kan hücreleri *Pg* antijeniyle uyarıldıklarında IL-17 eksprese etmişlerdir (Oda ve ark. 2003).



Şekil 1.8. Th hücre farklılaşmasında ve fonksiyonunda yeni bir paradigma. Thp hücreleri ortamdaki sitokinlere göre çeşitli alt gruplara farklılaşırlar. Th1 hücreleri IL-12 varlığında meydana gelirler ve IL-2, TNF-β (lenfotoksin, LT), IL-12 ve IFN-γ gibi hücresel bağışıklığa yön veren faktörler salgılarlar. Alternatif olarak IL-4 varlığında, Thp hücreleri Th2 hücrelerine farklılaşırlar ve IL-4, IL-5, IL-13 üretimiyle hümöral bağışıklığa aracılık ederler. Th17 hücreleri, enflamasyonda ve otoimmünitede hayati rol alan CD4+ T hücrelerinin yeni bir alt grubudur. Bu alt grup TGF- β, IL-6 ve IL-1β varlığında ortaya çıkar ve IL-12 ailesinin bir üyesi olan IL-23 varlığında sayıca artmaya başlar. Th17 popülasyonunun gelişimi Treg hücreleri tarafından baskılanmaktadır. Treg hücreleri TGF-β varlığında ortaya çıkarlar ve IL-10, TGF-β gibi bağışıklığı baskılayan sitokinler salgılarlar. Bu alt-gruplar arasındaki etkileşim immün cevabın düzenlenmesinde çok önemli yer tutar (Kramer ve Gaffen 2007).

IL-17'nin kemik remodelasyonunu ve kemik yıkımını kontrol ettiğini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. IL-17 RANKL ekspresyonunu arttırarak RANKL/OPG oranını değiştirmiştir. Osteoblastik hücrelerden *in vivo* ve *in vitro* şartlarda OPG ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Farelerde oluşturulan artrit modelinde IL-17 bu yolla osteoklast oluşumunu arttırmış ve kemik yıkımına neden olmuştur. Th17 hücreleri Th1 hücrelerden daha fazla RANKL eksprese etmektedirler (Lubberts ve ark. 2003).

Periodontal hastalığın başlatılmasının ve ilerleyişinin sadece Th1 ve Th2 hücre cevabıyla karakterize olmadığı artık anlaşılmıştır. Th17 hücrelerinin periodontal hastalıkta gerçekleşen doku yıkımına katkıda bulundukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Lubberts ve ark. 2003, Kramer ve Gaffen 2007). Th17 alt-grubunun keşfi hastalığın temelinin anlaşılabilmesi için yeni bir bakış açısı yaratmıştır (Kramer ve Gaffen 2007).

1.11. Cerrahisiz Periodontal Tedavi

Genel anlamda periodontal durumun değerlendirilmesinin ardından cerrahi uygulamaksızın diş ve kök yüzeylerinin eklentilerinden arındırılması işlemini kapsar. Hastanın durumu daha sonra tekrar değerlendirilir ve eğer gerekli görülürse cerrahi periodontal tedavi planı yapılır. Cerrahisiz periodontal tedavi temelde periodontal olarak hastalıklı dişlerin kök yüzeylerindeki mikrobiyal biyofilmin uzaklaştırılmasını içermektedir. Bu tedavinin amacı mikrobiyal biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin ya da kalsifiye olmuş biyofilmdeki bakterilerin (örnek: diştaşı) uzaklaştırılmasıdır. Diş çevresindeki yumuşak dokular cerrahi olarak kaldırılmaz ve bu durum minumum görüş açısıyla çalışılmasını gerektirir. Cerrahisiz tedaviyle mikrobiyal biyofilm içerisindeki mikrorganizmalar sayıca azalır ve biyofilm ekolojisi değişir. Böylece konak dokuları kalan mikrorganizmalarla daha rahat başa çıkabilir, dişetindeki enflamatuvar değişiklikler kaybolmaya başlar ve periodontal cep derinlikleri değişen oranlarda azalmaya başlar (Claffey ve ark. 2004).

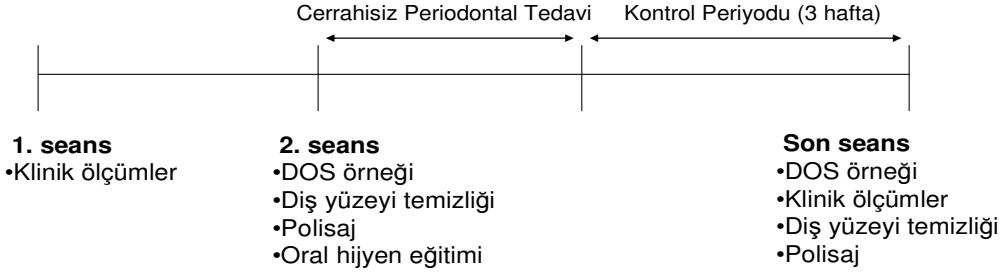
Kronik periodontitis en sık gözlenen periodontitis tipi olarak bilinmektedir. Periodontitiste ağızdaki tüm dişler hastalıktan aynı derecede etkilenmez, bazı bölgelerde çok daha şiddetli bir yıkım gözlenebilir. IL–17, RANKL ve OPG'nin periodontal dokular üzerine olan etkileri ve doku yıkımındaki rolleri yukarıda da anlatıldığı gibi yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Bu sitokinlerin çeşitli periodontal hastalıklardaki DOS düzeylerini tespit etmek amacıyla birçok diagnostik çalışma yapılmıştır, fakat başlangıç periodontal tedavinin bu sitokinler üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Bu çalışmada generalize kronik periodontitis tanısı konulmuş bireylerin a) DOS'unda IL–17, RANKL ve OPG düzeylerini belirlemek, ve b) başlangıç periodontal tedavinin bu sitokinler üzerine olan etkisini incelemek ve c) klinik parametreler ile $IL–17^{DOS}$, $RANKL^{DOS}$ ve OPG^{DOS} düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi saptamak amaçlanmıştır.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Çalışma Grubu:

Araştırma grubumuza, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne Nisan 2007 ile Ocak 2008 tarihleri arasında müracaat eden, klinik ve radyografik olarak generalize kronik periodontitis teşhisi konulan (Plancak ve ark. 2001), yaşları 35 ile 59 arasında değişen 13'ü kadın, 23'ü erkek toplam 36 gönüllü hasta katıldı. Hastalara araştırmanın amacı, içeriği anlatıldı ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına dair araştırmanın detaylarını içeren bilgilendirilmiş onay formu imzalatıldı. Çalışmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Etik Kurulu'na başvuru yapıldı ve onay alındı (Etik kurul rapor no: 2007/2-3).

Generalize kronik periodontitis tanısı konan hastalarda araştırmaya katılma kriterleri şunlardı; a) son 1 yıl içerisinde herhangi periodontal tedavi görmemiş, b) son altı ay içerisinde antibiyotik kullanmamış olmak, c) herhangi bir sistemik probleminin bulunmaması, d) bayanlar için hamilelik ve laktasyon döneminde olmamak, e) sigara içmemek, f) her bir yarım çenesinde en az beş dişi olacak şekilde tüm ağzında en az yirmi daimi dişe sahip olmak.



Şekil 2.1. Klinik uygulamalar ve zaman aralıkları

2.2. Klinik Periodontal Değerlendirme

Klinik periodontal parametreler olarak ağızda bulunan bütün doğal dişlerden Sondlama Cep Derinliği (SCD), Klinik Ataşman Seviyesi (KAS), Plak İndeksi (Pİ) ve Gingival İndeks (Gİ) ölçümleri yapıldı. Protetik restorasyonlu, endo-periodontal lezyonlu dişler, subgingival alana, mine-sement sınırına uzanan restorasyon ve çürük bulunan diş bölgeleri ve yeni çekilen dişlerin komşulukları ölçümlere dahil edilmedi. Bireylere ilk ölçümlerin yapılmasından bir hafta sonrasına tedavinin ilk seansı için randevu verildi. Tüm ölçümler ve DOS örneklemeleri cerrahisiz periodontal tedavi sona erdikten üç hafta sonra tekrarlandı (Şekil 2.1).

2.2.1. Sondlama Cep Derinliği

Williams periodontal sondu* yardımıyla dişeti kenarı ile sulkus/cep tabanı arası mesafe, vestibül ve palatinalde, mezial, orta ve distal olmak üzere, dişin altı noktasından ölçüldü. Ölçüm esnasında sondun, dişin uzun aksına paralel olmasına ve aşırı kuvvet uygulanmamasına dikkat edildi.

2.2.2. Klinik Ataşman Seviyesi

Williams periodontal sond kullanılarak mine-sement sınırından sulkus/cep tabanına olan mesafe, vestibul ve palatinalde, mezial, orta ve distal olmak üzere, dişin altı noktasından milimetrik olarak ölçüldü.

2.2.3. Plak İndeksi (Silness ve Löe 1964)

Plak indeksi ölçümü için değerler her dişin mezial, distal, vestibül ve palatinal olmak üzere dört yüzeyinden elde edildi. Değerler toplanıp dörde bölünerek her bir dişe ait Pİ skoru saptandı. Skorlama şu şekilde yapıldı;

0: Diş yüzeyinin dişeti bölgesinde hiç bakteri plağı yok.

1: Göz ile dişin yüzeyinde bakteri plağı görülmemekte fakat sondlama işleminden sonra sondun ucunda bakteri plağı izlenmektedir.

2: Dişeti bölgesi ince ve orta düzeyde bakteri plağı ile kaplıdır ve bu birikinti göz ile seçilebilmektedir.

* Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

3: Fazla miktarda yumuşak birikinti vardır, bunun kalınlığı dişeti oluğunu tamamen doldurmuştur ve interdental bölge yumuşak birikinti ile doludur.

2.2.4. Gingival İndeks (Löe ve Silness 1963)

Bütün dişlerin vestibul, lingual, mezial ve distal yüzeylerine bakıldı.

0: Sağlıklı dişeti.

1: Hafif enflamasyon, hafif renk değişikliği ve ödem var ama sondlama işleminden sonra kanama yok.

2: Orta dereceli enflamasyon, ödem, kırmızılık ve parlaklık, sondlamada kanama var.

3: Şiddetli enflamasyon ve kızarıklık, ödem, ülserasyon ve spontan kanamaya eğilim var.

2.3. Örnek Alınacak Dişlerin Tespiti

Hastalardan tedavi öncesi ve başlangıç periodontal tedavi tamamlandıktan bir ay sonra DOS örnekleri toplandı. Her bireyde alt çenede dört, üst çenede dört dişten olmak üzere toplam sekiz dişten örnek alındı. Alt ve üst çenede seçilen dörder dişin ikisi sağ, ikisi sol yarım çeneye aitti. Sağ ve sol çenede örneklenen iki bölgeden birisi sondlama cep derinliğinin en fazla olduğu (≥5mm), sondlamada kanayan derin cep bölgesi, diğeri ise sondlama cep derinliğinin en az olduğu (≤3mm) ve nispeten sağlıklı sığ cep bölgesiydi. Daha rahat olacağı düşünülerek DOS örnekleri öncelikle dişlerin meziyal aproksimal bölgelerinden alınmaya çalışıldı.

2.4. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklemesi

Dişeti oluğu sıvısı örnekleri muayene seansından sonraki seansta kağıt şeritler kullanılarak herhangi bir işlem uygulanmadan önce tüm hastalardan sabah saatlerinde (09:00-11:00 arasında) alındı. Toplama işlemi dişlerin vestibül yüz interproksimal bölgelerinden yapıldı. Örnekleme yapılmadan önce örneklemenin yapılacağı diş yüzeyi pamuk rulo tamponlarla izole edildi ve basınçlı hava ile kurutuldu. Supragingival plak dişetine değmeden bir küret yardımı ile uzaklaştırıldı.

Kağıt şeritlerin* kan ve salya ile kontamine olmamasına dikkat edildi. Kan ve salya bulaşan kağıt şeritler çalışmaya dahil edilmedi. Şeritler dişeti cebi içine hafif bir direnç hissedilinceye kadar yerleştirilirken mekanik travma oluşturulmamasına dikkat edildi. Standardizasyonu sağlayabilmek için şeritler, dişeti oluğunda 30 saniye bekletildikten sonra her bir şeritin DOS hacmi µl cinsinden elektronik cihazΩ ile ölçüldü. Toplanan şeritler, 300µl fosfatla tamponlanmış salin içeren (PBS) Eppendorf tüplerine konuldu ve önce -20ºC'de daha sonra analiz gününe kadar -80ºC'de saklandı.

2.5. Cerrahisiz Periodontal Tedavi

Başlangıç seansında kronik periodontitisli bireylerden DOS örneklerinin alınmasından sonra, ultrasonik kazıyıcı aletΨ kullanılarak tüm ağıza diş yüzeyi temizliği yapıldı. Bireylere Modifîye Bass fırçalama tekniği ve arayüz temizliği hem ayna karşısında hem de model üzerinde anlatıldı. Bunu izleyen seanslarda, lokal anestezi altında Gracey küretlerλ kullanılarak, her yarım çenede gözle görülen ve dokunmayla hissedilebilen birikinti kalmayana kadar kök yüzeyi düzleştirmesi yapıldı. Her seansın sonunda polisaj lastiği ile temizleme patları kullanılarak dişler cilalandı. Kök yüzeyi düzleştirmesi işlemleri, sağ üst yarım çeneden başlayarak sağ alt yarım çenede sonlanacak şekilde saat yönünde bir sıra izlenerek bir hafta içinde her biri yaklaşık 80 dakika süren iki seansta tamamlandı. Bu seanslarda, bireylerin diş fırçalama ve arayüz temizliği uygulamaları kontrol edildi ve gerektiğinde düzeltmeler yapıldı.

Cerrahisiz periodontal tedavi kapsamında oklüzal travma yaratabilecek erken temas noktaları ortadan kaldırıldı, plak birikimine neden olabilecek hatalı restorasyonların (dolgu ve kuron köprü protezleri gibi) düzeltilmesi sağlandı. Cerrahisiz periodontal tedaviyi takiben kontrol süresi boyunca, subgingival bölgedeki florayı etkileyebileceği için herhangi bir protetik işlem yapılmadı.

Cerrahisiz periodontal tedaviye ek olarak herhangi bir antimikrobiyal ajan, destekleyici ilaç veya tedavi uygulanmadı. Gerekli görülen dişlerde diş çekimi ve

* Periopaper®, ProFlow, Inc., Amityville, NY, USA
Ω Periotron 8000, Harco Electronics, Winnipeg, CANADA
Ψ Satelec®, Suprasson P5 booster, FRANCE
λ Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

kök kanal tedavisi gibi işlemler cerrahisiz periodontal tedavi kapsamı dışında tutulmuş ve çalışmaya başlamadan önce yapılmıştır.

2.6. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin Analizi

Analizler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Endokrinoloji Laboratuar'ında **"**Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay" (ELISA) yöntemi ile ticari kitler kullanılarak gerçekleştirildi.

2.6.1. Total RANKL^{DOS} Miktarının Belirlenmesi

Dişeti oluğu sıvısındaki RANKL düzeyleri ticari total sRANKL ELISA kit[*] kullanılarak "Sandwich ELISA" yöntemiyle belirlendi. Analizde kullanılan çözeltiler, kitte bildirilen prosedüre uygun olarak hazırlandı. RANKL için spesifik olan monoklonal antikorlarla kaplı kuyucuklar, kitin içinde bulunan yıkama solüsyonu ile yıkandı. Standartların hazırlanması amacıyla kit içerisindeki stok standart, üreticinin direktiflerine uygun olarak sulandırıldı. Plak üzerindeki yerleri daha önceden belirlenmiş olan kuyucuklara 50µl standart ve DOS örnekleri eklendi. Daha sonra tüm kuyucuklara 50µl OPG solüsyonu eklendi ve mikrotitrasyon plağının üzeri kapatılarak 16-24 saat 2-8°C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı ve kurutuldu. Bütün kuyucuklara "biotinylated detection antibody" solüsyonundan 100µl konuldu ve plağın üzeri kapatılarak oda ısısında iki saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırıldı ve yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı. Yıkama solüsyonları uzaklaştırılıp kurutulmuş olan tüm kuyucuklara hazırlanan "Streptavidin-peroxidase conjugate" solüsyonundan 100µl eklendi ve plağın üzeri kapatılarak 2-8°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa 100µl TMB (Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu eklendi ve plak karanlık bir ortamda plağın üzeri kapatılmadan 20-30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450nm'lik plak optik okuyucusunda okunarak abzorbans ölçümleri yapıldı. Standart değerlerin optik okuma sonunda elde edilen verilerine göre standart eğri oluşturuldu. Örneklere ait

[*] Immundiagnostik AG, Bensheim, GERMANY

değerler RANKL konsantrasyonunu yansıtacak şekilde bilgisayar yazılımı ile hesaplandı. Bu değerler sulandırma katsayısı olan 300 ile çarpılarak dişeti oluğu sıvısındaki konsantrasyon hesaplandı. Total RANKL miktarı (pg) belirlenirken konsantrasyon değeri toplam dişeti oluğu sıvısı hacmi ile çarpıldı ve her bir tüpe dört strip atıldığı için de dörde bölündü..

2.6.2. Osteoprotegerin^{DOS} Miktarının Belirlenmesi

Dişeti oluğu sıvısındaki OPG düzeyleri ticari Osteoprotegerin ELISA kit$^{\Omega}$ Biomedica, Vienna, Austria kullanılarak belirlendi. Analizde kullanılan çözeltiler, kitte bildirilen prosedüre uygun olarak hazırlandı. Standartların hazırlanması amacıyla kit içerisindeki stok standart, üreticinin direktiflerine uygun olarak sulandırıldı. Kuyucuklardan hangilerine standartların ve DOS örneklerinin ekleneceği, hangisinin blank olarak bırakılacağı protokol kağıdı üzerinde işaretlendi. Plak üzerindeki tüm kuyucuklara 100µl "Assay buffer" solüsyonu eklenirken Blank'a 100µl daha ilave edildi. Blank hariç tüm kuyucuklara 50µl standart ve DOS örnekleri eklendi. Daha sonra blank hariç tüm kuyucuklara 50µl "polyclonal biotinylated anti-OPG" solüsyonu eklendi ve mikrotitrasyon plağının üzeri kapatılarak 18-24 saat 4°C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı ve kurutuldu. Yıkama solüsyonları uzaklaştırılıp kurutulmuş olan tüm kuyucuklara hazırlanan "Streptavidin-HRPO conjugate" solüsyonundan 200µl eklendi ve plağın üzeri kapatılarak 18-26°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa 200µl TMB (Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu eklendi ve plak karanlık bir ortamda plağın üzeri kapatılmadan 20 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450nm'lik plak optik okuyucusunda okunarak abzorbans ölçümleri yapıldı. Standart değerlerin optik okuma sonunda elde edilen verilerine göre standart eğri oluşturuldu. Örneklere ait değerler pmol/l cinsinden OPG konsantrasyonunu yansıtacak şekilde bilgisayar yazılımı ile hesaplandı. Bu değerler sulandırma katsayısı olan 300 ile çarpılarak dişeti oluğu sıvısındaki konsantrasyon hesaplandı. Osteoprotegerin miktarı (pg) belirlemek için

$^{\Omega}$ Biomedica, Vienna, AUSTRIA

konsantrasyon değeri toplam dişeti oluğu sıvısı hacmi ile çarpıldı ve her bir tüpe dört strip atıldığı için de dörde bölündü.

2.6.3. İnterlökin-17^{DOS} Miktarının Belirlenmesi

Dişeti oluğu sıvısındaki IL-17 düzeyi ticari IL-17 ELISA kit[*] kullanılarak belirlendi. Analizde kullanılan çözeltiler, kitte bildirilen prosedüre uygun olarak hazırlandı. Standartların hazırlanması amacıyla kit içerisindeki stok standart, üreticinin direktiflerine uygun olarak sulandırıldı. Kuyucuklardan hangilerine standartların ve DOS örneklerinin ekleneceği protokol kağıdı üzerinde işaretlendi. Plak üzerindeki tüm kuyucuklara önce 50µl B solüsyonu (tampon çözeltisi)) ilave edildi, 100µl standart ve DOS örnekleri eklendi. Daha sonra 50µl "Biotin conjugate" solüsyonu eklendi ve mikrotitrasyon plağının üzeri kapatılarak 700±100 rpm'lik devir yapan bir vibratör üzerinde oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki solüsyonlar uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan yıkama solüsyonu ile üç defa yıkandı ve kurutuldu. Yıkama solüsyonları uzaklaştırılıp kurutulmuş olan tüm kuyucuklara hazırlanan "Streptavidin-HRP conjugate" solüsyonundan 100µl eklendi ve plağın üzeri kapatılarak 700±100 rpm'lik devir yapan bir vibratör üzerinde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa 100µl "tetramethylbenzidine" substrat solüsyonu (kromojenik solüsyon) eklendi ve plak karanlık bir ortamda 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450nm'lik plak optik okuyucusunda okunarak absorbans ölçümleri yapıldı. Standart değerlerin optik okuma sonunda elde edilen verilerine göre standart eğri oluşturuldu.

2.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Veriler, bilgisayar ortamında istatistik paket programı[Ω] kullanılarak değerlendirilmiştir. Klinik periodontal parametrelerin ve DOS verilerinin normal dağılım gösterip göstermedikleri Anderson-Darling normallik testi kullanılarak tespit edildi. Normal dağılım gösteren klinik periodontal parametrelerin istatistiksel

[*] IBL, Hamburg, GERMANY
[Ω] SPSS for Windows 13.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA

analizinde parametrik testlerden yararlanıldı. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplar arasındaki farkın önem kontrolüne eşleştirilmiş iki grup arası farkların "t" testiyle (paired-sample "t" test), derin ve sığ cepler arasındaki farkın önem kontrolüne ise bağımsız iki grup arası farkların "t" testi (independent-samples "t" test) kullanılarak bakıldı. Osteoprotegerin ve RANKL düzeyleri normal dağılım göstermedikleri için bu verilerin istatistiksel analizinde non-parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası farkların önem kontrolü Mann-Whitney Testi ile gerçekleştirildi. Grup içi karşılaştırmalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası ölçümler arasındaki farkların önem kontrolü Wilcoxon İşaretli Sıra Testi ile yapıldı. Klinik periodontal indeksler ile DOS'daki RANKL ve OPG düzeyleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için Spearman sıra korelasyon analizi kullanıldı.

3. BULGULAR

Çalışmaya 36 gönüllü hastayla başlandı, fakat iki hasta cerrahisiz periodontal tedavi sonrası takip döneminde randevularına gelmeyerek çalışma dışı kaldı. Böylece 12'si kadın 22'si erkek toplam 34 hastayla araştırma tamamlandı. Hastaların yaş ortalaması 44.35±5.63'tür (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışma grubunu oluşturan generalize kronik periodontitis hastalarının demografik verileri ve başlangıç klinik periodontal değerlendirme sonuçları.

Cinsiyet	12 Kadın	22 Erkek
Yaş aralığı	35-59	
	Ort±Ss	
Pİ	2.25±0.47	
Gİ	1.93±0.33	
SCD (mm)	3.41±0.58	
KAS (mm)	3.98±0.61	

IL-17^{DOS} düzeylerini belirlemek üzere yapılan analizde kullanılan ticari kitte belirtilen protokole sadık kalınmasına rağmen toplanan örneklerdeki IL–17 düzeyi hazırlanan standartların altında kalmış ve bu sitokin saptanamamıştır.

3.1. Tedavi Öncesi Klinik Bulgular ve RANKL^{DOS}, OPG^{DOS} Düzeyleri

Derin cep (DC) ve sığ cep (SC) gruplarının tedavi öncesi (TÖ) klinik periodontal parametreleri, toplanan DOS hacimleri, RANKL^{DOS} ve OPG^{DOS} düzeyleri ve RANKL/OPG^{DOS} oranı Çizelge 3.2, Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8'de gösterilmiş ve gruplar arasındaki farkların anlamlılığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Tedavi Öncesi Klinik Periodontal Parametreler, DOS Hacmi ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri.

	SC (Ort±Ss)	**DC** (Ort±Ss)	**p değerleri**
Pİ	1.55±0.40	2.68±0.35*	.000
Gİ	1.43±0.32	2.53±0.37*	.000
SCD (mm)	2.71±0.33	5.60±0.51*	.000
KAS (mm)	2.78±0.33	5.71±0.44*	.000
DOS (µl)	0.63±0.19	1.20±0.25*	.000
	Med(Min-Maks)	**Med**(Min-Maks)	
RANKL (pg/µl)	165.64 (52.32-424.09)	264.95 (90.16-518.02) #	.001
OPG (pg/µl)	85.78 (19.48-406.15)	45,80 (10.27-254.75) #	.002
RANKL(pg/30s)	106.65 (38.63-222.08)	308.18 (123.53-484.2) #	.000
OPG (pg/30sn)	58.50 (15.45-228.55)	48,08 (16.95-179.70)	.811
RANKL/OPG	1.73 (0.25-6.87)	5.62 (0.84-9.87) #	.000

** Bağımsız iki grup arası farkların "t" testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Tedaviden önce; DC grubuna ait klinik periodontal parametreler, DOS hacmi, OPG^{DOS} konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı SC grubuyla karşılaştırıldığında; gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Sığ gruptaki OPG^{DOS} total miktarı derin gruptan fazla olmasına rağmen gruplar arasındaki bu fark anlamlı değildi ($p>0.05$) (Çizelge 3.2).

3.2. Tedavi Sonrası Klinik Bulgular ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri

Diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirmesinden oluşan periodontal tedavi sonrası (TS) iyileşmede, herhangi bir komplikasyon görülmedi. Bazı hastalarda dişeti çekilmesine bağlı olarak şiddetli olmayan hassasiyetlerle karşılaşıldı. Topikal flor uygulamalarıyla bu şikayetler giderilebildi.

Çizelge 3.3. Tedavi Sonrası Klinik Periodontal Parametreler, DOS Hacmi ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri.

	SC (Ort±Ss)	**DC** (Ort±Ss)		**p değerleri**
Pİ	0.52±0.39	0.78±0.41 *		.011
Gİ	0.63±0.40	1.14±0.41 *		.000
SCD (mm)	2.27±0.23	3.16±0.51 *		.000
KAS (mm)	2.64±0.34	5.32±0.43 *		.000
DOS (µl)	0.23±0.07	0.63±0.20 *		.000
	Med(Min-Maks)	**Med**(Min-Maks)		
RANKL (pg/µl)	77.51 (0-214.58)	82.11 (40.63-303.64)		.219
OPG (pg/µl)	397.25 (63.75- 682.31)	96.8 (16.30-434.60)	#	.000
RANKL (pg/30sn)	15.41 (0- 47.10)	53.93 (26.70-110.70)	#	.000
OPG (pg/30sn)	83.03 (15.31-154.35)	63.98 (12.6-152.30)		.146
RANKL/OPG	0.25 (0.23-3.14)	1.03 (0-0.58)	#	.000

** Bağımsız iki grup arası farkların "t" testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Derin cep ve SC gruplarının TS klinik periodontal parametreleri, toplanan DOS hacmi, $RANKL^{DOS}$ ve OPG^{DOS} düzeyleriyle $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı Çizelge 3.3, Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8'de gösterilmiş ve gruplar arasındaki farkların anlamlılığı değerlendirilmiştir.

Derin cep grubuna ait klinik periodontal parametreler, DOS hacmi, OPG^{DOS} konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı SC grubuyla karşılaştırıldığında; tedavi öncesinde var olan gruplar arası anlamlı farkların tedavi sonrasında da devam ettiği görüldü ($p<0.05$). SC grubundaki OPG^{DOS} total miktarı DC grubundan fazla, $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu ise DC grubundan düşük olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$) (Çizelge 3.3).

3.3. Tedavinin Sığ Cep Örnekleme Alanlarına Etkisi

Çizelge 3.4. TÖ ve TS Sığ Ceplerdeki Klinik Periodontal Parametreler, DOS Hacmi ve $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} Düzeyleri.

	TÖ (Ort±Ss)	**TS** (Ort±Ss)		**p değerleri**
Pİ	1.55±0.40	0.52±0.39*		.000
Gİ	1.43±0.32	0.63±0.40*		.000
SCD (mm)	2.71±0.33	2.27±0.23*		.000
KAS (mm)	2.78±0.33	2.64±0.34*		.000
DOS (µl)	0.63±0.19	0.23±0.07*		.000
	Med(Min-Maks)	**Med**(Min-Maks)		
RANKL (pg/µl)	165.64 (52.32-424.09)	77.51(0-214.58)	#	.000
OPG (pg/µl)	85.78 (19.48-406.15)	397.25 (63.75-682.31)	#	.000
RANKL(pg/30sn)	106.65 (38.63-222.08)	15.41 (0-47.10)	#	.000
OPG (pg/30sn)	58.50 (15.45-228.55)	83.03 (15.31-154.35)		.114
RANKL/OPG	1.73 (0.25-6.87)	0.25 (0.23-3.14)	#	.000

** Bağımsız iki grup arası farkların "t" testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Sığ cep grubuna ait TÖ klinik periodontal parametreler, DOS hacmi, OPG^{DOS} konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı TS elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında aradaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). OPG^{DOS} total miktarı tedaviden sonra artmış olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Çizelge 3.4).

3.4. Tedavinin Derin Cep Örnekleme Alanlarına Etkisi

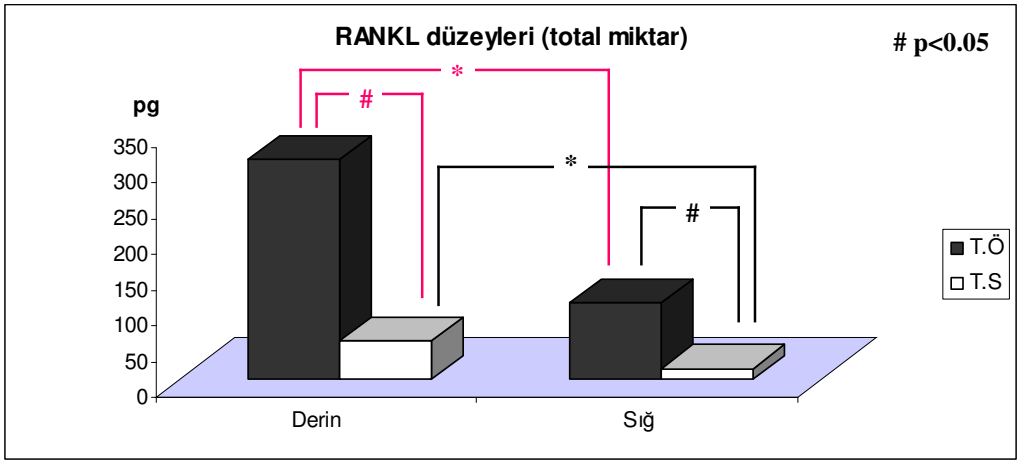
Derin cep grubuna ait TÖ klinik periodontal parametreler, DOS hacmi, OPG^{DOS} konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı TS elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında aradaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). OPG^{DOS} total miktarı tedaviden sonra artmış olmasına rağmen değişim anlamlı değildi ($p>0.05$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. T.Ö ve T.S Derin Ceplerdeki Klinik Periodontal Parametreler, DOS Hacmi ve RANKL^{DOS}, OPG^{DOS} Düzeyleri.

	TÖ (Ort±Ss)	**TS** (Ort±Ss)		**p değerleri**
Pİ	2.68±0.35	0.78±0.41 *		.000
Gİ	2.53±0.37	1.14±0.41 *		.000
SCD (mm)	5.60±0.51	3.16±0.51 *		.000
KAS (mm)	5.71±0.44	5.32±0.43 *		.000
DOS (µl)	1.20±0.25	0.63±0.20 *		.000
	Med(Min-Maks)	**Med**(Min-Maks)		
RANKL (pg/µl)	264.95 (90.16-518.02)	82.11 (40.63-303.64)	#	.000
OPG (pg/µl)	45.80 (10.27-254.75)	96,8 (16.30-434.60)	#	.000
RANKL(pg/30sn)	308.18 (123.53-484.20)	53.93 (26.70-110.70)	#	.000
OPG (pg/30sn)	48.08 (16.95-179.70)	63.98 (12.60-152.30)		.326
RANKL/OPG	5.62 (0.84-9.87)	1.03 (0-0.58)	#	.000

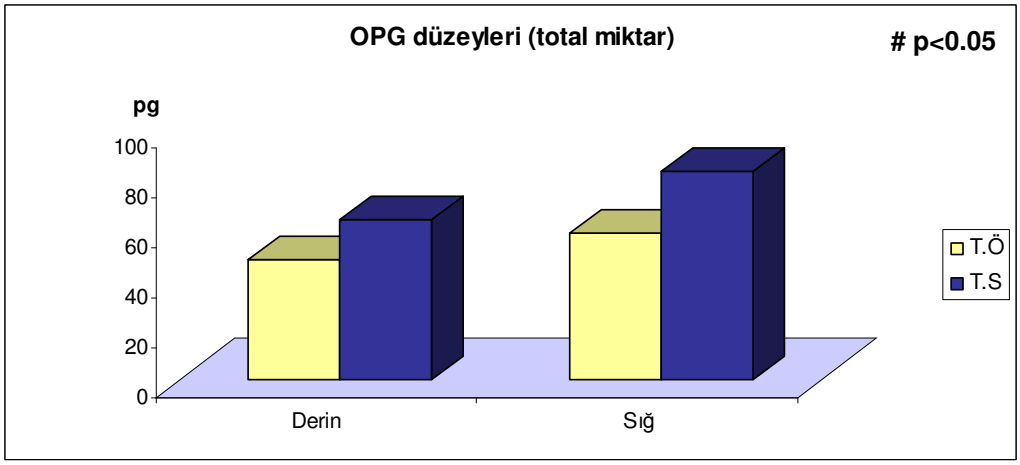
** Bağımsız iki grup arası farkların "t" testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Çizelge 3.6. T.Ö ve T.S Derin ve Sığ Ceplerdeki total miktar RANKL^{DOS} Düzeylerinin Karşılaştırılması



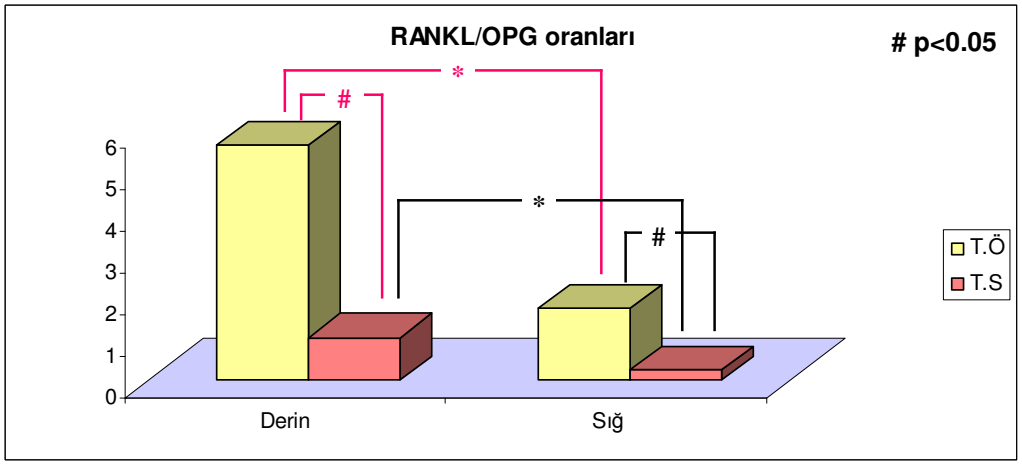
** Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Wilcoxon Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Çizelge 3.7. T.Ö ve T.S Derin ve Sığ Ceplerdeki total miktar OPG^{DOS} Düzeylerinin Karşılaştırılması



** Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Wilcoxon Testi, istatistiksel olarak anlamlı

Çizelge 3.8. T.Ö ve T.S Derin ve Sığ ceplerdeki total miktar $RANKL/OPG^{DOS}$ Oranlarının Karşılaştırılması



** Mann-Whitney Testi, istatistiksel olarak anlamlı*
 # Wilcoxon Testi, istatistiksel olarak anlamlı

3.5. Klinik Periodontal Parametreler ile $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} İlişkisi

3.5.1. Sondlama Cep Derinliği ile İlişki

Çizelge 3.6. SCD ile DOS Biyokimyasal Bulguları Arası İlişki (Spearman Sıra Korelasyon katsayıları).

	SCD	
	SC (n=68)	**DC (n=68)**
RANKL (pg/µl)	0.257*	0.577**
OPG (pg/µl)	-0.439**	-0,518**
RANKL (pg/30sn)	0,498**	0,765**
OPG (pg/30sn)	-0,218	-0,205
RANKL/OPG	0,435**	0,617**

*p<0.05, **p<0.01

Sığ cep grubunda SCD ile OPG^{DOS} konsantrasyonu ($p<0.01$) ve OPG^{DOS} total miktarı ($p>0.05$) arasında negatif bir ilişki vardır. $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu ($p<0.05$), $RANKL^{DOS}$ total miktarı ($p<0.01$) ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranıyla ($p<0.01$) SCD arasındaysa anlamlı derecede pozitif bir ilişki söz konusudur (Çizelge 3.6).

Derin cep grubunda OPG^{DOS} total miktarıyla SCD arasında anlamlı bir ilişki yoktur ($p>0.05$). SCD ile OPG^{DOS} konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki vardır ($p<0.01$). $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı SCD ile pozitif ilişkilidir ($p<0.01$) (Çizelge 3.6).

3.5.2. Klinik Ataşman Seviyesiyle İlişki

Çizelge 3.7. KAS ile DOS Biyokimyasal Bulguları Arası İlişki (Spearman Sıra Korelasyon katsayıları).

	KAS	
	SC (n=68)	**DC (n=68)**
RANKL (pg/µl)	0,168	0,242*
OPG (pg/µl)	-0,178	-0,320**
RANKL (pg/30sn)	0,222	0,340**
OPG (pg/30sn)	-0,193	-0,190
RANKL/OPG	0,206	0,362**

*p<0.05, **p<0.01

Sığ cep grubunda KAS ile $RANKL^{DOS}$ düzeyleri, OPG^{DOS} düzeyleri ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p>0.05) (Çizelge 3.7).

Derin cep grubunda ise sadece OPG^{DOS} total miktarıyla KAS arasında anlamlı ilişki yoktur (p>0.05). KAS ile OPG^{DOS} konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki varken (p<0.01), $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu (p<0.05), $RANKL^{DOS}$ total miktarı (p<0.01) ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı ile pozitif ilişki bulunmuştur (Çizelge 3.7).

3.5.3. Gingival İndeksle İlişki

Çizelge 3.8. Gİ ile DOS Biyokimyasal Bulguları Arası İlişki (Spearman Sıra Korelasyon katsayıları).

	Gİ	
	SC (n=68)	**DC (n=68)**
RANKL (pg/µl)	0,372**	0,587**
OPG (pg/µl)	-0,633**	-0,380**
RANKL (pg/30sn)	0,672**	0,723**
OPG (pg/30sn)	-0,293*	-0,108
RANKL/OPG	0,676**	0,498**

*p<0.05, **p<0.01

Sığ cep grubunda Gİ ile $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı arasında pozitif ilişki varken, OPG^{DOS} konsantrasyonu ve OPG^{DOS} total miktarıyla negatif ilişki söz konusudur ($p<0.01$), (Çizelge 3.8).

Derin cep grubunda ise OPG^{DOS} total miktarıyla Gİ arasında anlamlı bir ilişki gözlenememiştir ($p>0.05$). Gİ ile OPG^{DOS} konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki varken, $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu, $RANKL^{DOS}$ total miktarı ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı ile pozitif ilişki bulunmuştur ($p<0.01$), (Çizelge 3.8).

3.5.4. Dişeti Oluğu Sıvısı Hacmiyle İlişki

Çizelge 3.9. DOS Hacmi ile DOS Biyokimyasal Bulguları arası İlişki (Spearman Sıra Korelasyon katsayıları).

	DOS Hacmi	
	SC (n=68)	**DC (n=68)**
RANKL (pg/µl)	0,258*	0,306*
OPG (pg/µl)	-,761**	-0,676**
RANKL (pg/30sn)	0,758**	0,670**
OPG (pg/30sn)	-0,184	-0,264*
RANKL/OPG	0,674**	0,597**

*p<0.05, **p<0.01

Sığ cep grubunda DOS hacmi ile $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu ($p<0.05$), $RANKL^{DOS}$ total miktarı ($p<0.01$) ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı ($p<0.01$) arasında pozitif ilişki varken, OPG^{DOS} konsantrasyonuyla DOS hacmi arasındaki ilişki negatiftir ($p<0.01$). DOS hacmi ile OPG^{DOS} total miktarı arasında ise anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0.05$) (Çizelge 3.9).

Derin cep grubunda OPG^{DOS} total miktarı ($p<0.05$) ve OPG^{DOS} konsantrasyonu ($p<0.01$) ile DOS hacmi arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir. DOS hacmi ile $RANKL^{DOS}$ konsantrasyonu ($p<0.01$), $RANKL^{DOS}$ total miktarı ($p<0.05$) ve $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı ($p<0.01$) arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Çizelge 3.9).

4. TARTIŞMA

Periodontitis hastalarında periodontal cep içerisindeki bakteri sayısı çok yüksek düzeylere ulaşmaktadır. Bu mikroorganizmalara verilen konak yanıtına bağlı olarak sitokin ve enflamatuvar ürünler açığa çıkmakta, enflamasyon dişeti dokusu boyunca yayılmakta ve doku yıkımı gerçekleşmektedir (Socransky ve ark. 1998). Enflamatuvar cevap dişeti dokusu içerisinde sınırlandırılamazsa komşu alveoler kemiğe kadar yayılır ve alveoler kemiğin yıkımına neden olur (Graves ve Cochran 2003, Garlet ve ark. 2006). Cerrahisiz periodontal tedaviyi takiben periodontitis hastalarının mikroflorasındaki mikroorganizma sayısı %99 oranında azalabilmektedir. Mikrobiyal floradaki bu olumlu değişim patojen mikroorganizmaların doğrudan ya da dolaylı yoldan oluşturdukları sistemik etkilerin de azalmasına neden olmaktadır (Marsh ve Martin 2000).

Periodontal hastalığa tanı koymak ve uygulanan tedavinin başarısını belirlemek amacıyla rutin olarak klinik ve radyografik parametreler kullanılmakta, ancak hastalık aktivitesini değerlendirebilmek, hastalık patogenezini daha iyi anlayabilmek amacıyla serum, dişeti dokusu, bakteri plağı ve DOS gibi örneklerden de yararlanılmaktadır. Periodontal hastalık gelişirken arttığı kabul edilen enflamatuvar mediyatörleri, konak kaynaklı enzimleri ve doku yıkım ürünlerini içeriğinde bulunduran DOS, sık kullanılan örnekleme kaynaklarından birisidir (Jin ve ark. 2002, Champagne ve ark. 2003). Cerrahisiz periodontal tedavinin periodontal hastalık patogenezinde rol alan çeşitli sitokinlerin DOS düzeyleri üzerine etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma vardır (Kurtiş ve ark. 2007, Figueredo ve ark. 2004, Holmlund ve ark. 2004, Tüter ve ark. 2005).

Osteoimmünolojideki son gelişmelerle birlikte alveoler kemik rezorbsiyonunda aktif rol oynayan RANKL'ın ve kemik koruyucu faktör olarak da bilinen OPG'nin periodontitis patogenezindeki rolleri daha ayrıntılı biçimde araştırılmaya başlanmıştır. Yeni bir sitokin ailesi olan IL-17'nin pek çok enflamatuvar hastalık patogeneziyle ilişkilendirilmesi ile bu sitokinin popülaritesi de giderek artmaktadır. Bu sitokinlerin çeşitli periodontal hastalıklardaki DOS düzeylerini tespit etmek amacıyla birçok diagnostik çalışma yapılmıştır (Mogi ve ark. 2004, Bostanci ve ark. 2007a, Johnson ve ark. 2004, Vernal ve ark. 2005), fakat bilgilerimiz kapsamında cerrahisiz periodontal tedavinin bu sitokinler üzerine olan

etkisini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada generalize kronik periodontitis tanısı konulmuş bireylerin hastalıktan farklı derecede etkilenmiş bölgelerinden toplanan DOS örneklerindeki IL–17, RANKL ve OPG düzeylerini belirlemek, cerrahisiz periodontal tedavinin bu sitokinler üzerine olan etkisini incelemek ve klinik parametreler ile $IL–17^{DOS}$, $RANKL^{DOS}$ ve OPG^{DOS} düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi saptamak amaçlanmıştır.

Bu çalışmada IL-17, RANKL ve OPG'nin DOS düzeylerini belirlemek üzere ticari ELISA kitleri kullanılmış, elde edilen örneklerde RANKL ve OPG saptanırken, hiçbir DOS örneğinde IL-17 tespit edilememiştir. Örnekler ticari kitin protokolüne sadık kalarak analiz edilmiş, örneklerin taşınması veya saklanması sırasında herhangi bir problem ile karşılaşılmamıştır. Aynı örneklerde RANKL ve OPG düzeylerinin sorunsuz şekilde tespiti bu savımızı destekler niteliktedir. Örneklerin yaklaşık 300 kat PBS ile seyreltilmiş olması ve kullanılan kitin sensitivitesinin nispeten düşük olması IL-17'nin tespit edilememesinin olası nedenleri arasında sayılabilir.

Diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirmesi işlemleri ile enflamasyon şiddeti azalır ve periodontal hastalığın ilerleyişi önlenir. Bunun sonucunda da SCD'de azalma ve klinik ataşman kazancı sağlanır (Cobb 1996, Greenstein 1992). Başlangıç SCD ≥5mm olan bölgelerde cerrahisiz periodontal tedaviden sonra SCD'de belirgin azalma ve klinik ataşman kazancı sağlandığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Cobb 1996, Cobb 2002). Başlangıçta 4-6mm olan periodontal ceplerde cerrahisiz periodontal tedavi sonrasında 0.23-0.82mm arasında ataşman kazancı elde edildiğini bildiren çalışmalar vardır (Pihlstrom ve ark. 1983, Hammerle ve ark. 1991, Hung ve Douglas 2002). Bu çalışmada da periodontal tedavi sonrası, tüm bölgelerin Gİ skorlarında ve SCD değerlerinde anlamlı azalmalar olmuş, klinik ataşman kazancı elde edilmiştir. Tedavi sonrası klinik periodontal parametrelerin tüm hastalarda olumlu olarak değişmiş olması uygulanan cerrahisiz periodontal tedavinin klinik açıdan başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak periodontal sondlama işlemi sırasında bazen hatalı ölçümler de yapılabilmektedir. Kullanılan periodontal sondun özellikleri, sondlama sırasında uygulanan kuvvet, sondlama açısı, sondlanan bölgedeki enflamasyonun derecesi sonuçları büyük ölçüde etkiler (Armitage 1996, Armitage ve ark. 1977, Listgarten ve ark. 1976). Sağlıklı bir bölge sondlanırken sondun ucu birleşim epitelinin koronalinde konumlanır (Polson ve ark. 1980), eğer

doku enflamasyonlu ise sonda karşı direnç azalır ve sond birleşim epitelini geçip bağ dokusuna penetre olabilir (Listgarten ve ark. 1976). Bunun tersine kök yüzeyi temizliği ve düzleştirmesini takiben iyileşen dişeti dokusu periodontal sondlamaya karşı gerek cep tabanında, gerekse cebin lateral duvarı olarak daha fazla direnç göstermektedir (Magnusson ve Listgarten 1980). Nitekim, cerrahisiz periodontal tedavi sonrası iyileşmenin, genellikle klinik ataşman kazancı ile değil, dişetindeki büzülme sonucu çekilme ile elde edildiği bildirilmiştir (Hung ve Douglass 2002, Listgarten 1980, Magnusson ve Listgarten 1980). Bu bilgilerin ışığı altında, bu araştırmada da SCD değişimlerinin, klinik ataşman kazancından çok dişetindeki enflamasyonun çözülmesi sonucu dokuda büzülmeye bağlı olarak elde edildiği düşünülmektedir.

Cerrahisiz periodontal tedaviyi takiben yumuşak dokuların iyileşebilmesi için gereken sürenin yaklaşık üç-dört hafta olduğu belirtilmiştir (Caton ve ark. 1982, Lowenguth ve Greenstein 1995). Diştaşı temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi işlemlerini takiben üç hafta sonra klinik ataşman kazancının meydana geldiği, daha sonraki üç aylık dönemde ise yeni bir klinik ataşman kazancının oluşmadığı bildirilmiştir (Proye ve ark. 1981). Cerrahisiz periodontal tedavi tamamlandıktan sonra bu çalışmada üç haftalık iyileşme dönemi beklenmiş, bu süre sonunda ağız içi klinik ölçümler tekrarlanmış ve tedavinin etkinliği değerlendirilmiştir.

Enflamatuvar cevap sonrası gelişen kemik yıkımının iki kritik faktöre bağlı olduğu bildirilmiştir. Bunlardan birincisi enflamatuvar mediyatörlerin dişeti dokusuna alveoler kemik yıkımı yapabilecekleri derinliklere kadar penetre olmalarıdır (Graves ve Cochran 2003). Bakterinin yerleşmiş olduğu alanla kemik arasında 2.5mm'den fazla mesafe bulunduğunda kemik yıkımının gerçekleşmediği bildirilmiştir. Bakteriler dişeti bağ dokusuna kadar ilerlediğinde enflamatuvar hücreler kemiğe yakınlaşır, osteoklastik aktivite artar ve daha büyük miktarda kemik yıkıma uğratılır (Schroeder ve Lindhe 1980, Page ve Schroeder 1981, Graves 2008). *Porphyromonas gingivalis'*in ve *Aa*'nın periodontal ligament fibroblastlarından ve osteoblastlardan RANKL ekspresyonunu tetikleyebilen mekanizmalara sahip oldukları bildirilmiştir (Belibasakis ve ark. 2005, Nagasawa ve ark. 2002, Kobayashi-Sakamato ve ark. 2004, Okahashi ve ark. 2004, Tiranathanagul ve ark. 2004). Kronik periodontitis hastalarından ve sağlıklı bireylerden toplanan dişeti, plak

örneklerinde RANKL mRNA ekspresyonu ve RANKL/OPG oranı ile *Pg* sayısı arasında pozitif bir ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wara-aswapati ve ark. 2007).

Enflamatuvar kemik yıkımında ikinci kritik faktör ise dişeti dokusunda bulunan enflamatuvar mediyatörlerin yıkıma yol açabilecek konsantrasyonlarda üretilmesidir. Enflamatuvar mediyatörlerin kemik yıkımına neden olacak kritik konsantrasyonlara ulaşmaları proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarına bağlıdır. Periodontitis lezyonlarında enflamatuvar hücreler (T ve B lenfositleri, makrofajlar) dişeti bağ dokusunda birikirler ve stromal hücrelerle (osteoblastlar, periodontal ligament ve dişeti fibroblastları) ilişkiye girerler. Makrofajlar ve T lenfositlerinin IL-1, IL-6, TNF-α, PGE_2 gibi enflamatuvar mediyatörler üreterek osteoblastlardan RANKL üretimini tetikledikleri ve dolaylı olarak da kemik yıkımı meydana getirebildikleri bildirilmiştir (Cochran, 2008). Enflamatuvar cevap sırasında sitokinler, kemokinler ve diğer mediyatörler periosteal osteoblastları uyarırlar ve osteoblast yüzeyinden RANKL ekspresyon düzeyini değiştirirler (Lerner 2006, Boyle ve ark. 2003). Klinik ataşman kaybının ve kemik yıkımının görüldüğü alanlarda IL-1, IL-6, IL-17, gibi proenflamatuvar sitokinlerin DOS düzeylerinin arttığını, IL-11, IL-13, IFN-γ gibi anti-enflamatuvar sitokin düzeylerininse azaldığını gösteren çalışmalar vardır (Lee ve ark. 1995, Figueredo ve ark. 1999, Delima ve ark. 2002, Johnson ve ark. 2004, Holmlund ve ark. 2004, Vernal ve ark. 2005, Kramer ve Gaffen 2007, Johnson ve Serio 2007, Yetkin Ay ve ark. 2008). Enflamatuvar cevap sırasında proenflamatuvar sitokinler osteoblastlar/stromal hücrelerden RANKL ekspresyonunu arttırırken, OPG ekspresyonunu düşürürler ve osteoklastogenezisi uyarabilirler. Tersine anti-enflamatuvar mediyatörlerin RANKL ekspresyonunu azalttıkları veya OPG ekspresyonunu arttırarak osteoklastogenezi inhibe edebildikleri bildirilmiştir (Nakashima ve ark. 2000). Deneysel periodontitis çalışmasında enjekte edilen proenflamatuvar sitokin antagonistlerinin enflamatuvar hücre birikimini %80, osteoklast oluşumunu %67, kemik kaybını ise %60 oranda azalttıkları gösterilmiş, enflamatuvar mediyatörlerin enflamasyonun kemiğe ulaşmasına yol açarak alveoler kemik yıkımını arttırabilecekleri bildirilmiştir (Asuma ve ark. 1998).

Dokuda RANKL ekspresyonu OPG ekspresyonuna oranla arttığında, RANKL osteoklasta farklılaşabilen hücreler üzerinde yer alan RANK'a bağlanır ve osteoklast oluşumu ile dengeyi kemik rezorbsiyonu tarafına doğru bozar. OPG

ekspresyonu RANKL ekspresyonuna oranla fazlaysa, OPG RANKL'a bağlanır. RANK-RANKL bağlantısının engellenmesiyle osteoklast oluşumu azalır ve osteoklastların apoptozisi hızlanır (Boyle ve ark. 2003). Kemik remodelasyonunda temel RANKL kaynağı osteoblastlardır, fakat lokal yıkımın söz konusu olduğu romatoid artrit, periodontitis gibi enflamatuvar hastalıklarda RANKL ekspresyonu lenfoid hücrelerden, aktive olmuş makrofajlardan ve özellikle de T ve B lenfositlerden köken almaktadır. Diğer anlamda, fizyolojik rezorbsiyonda osteoblastlar, patolojik rezorbsiyonda ise genellikle enflamatuvar hücreler RANKL proteinini eksprese ederler. (Crotti ve ark. 2002, 2004). Periodontitisli bireylerden izole edilen dişeti dokularında aktive olmuş T ve B lenfositlerinin çok önemli birer RANKL kaynağı oldukları gösterilmiştir (Taubman ve Kawai 2001, Kawai ve ark. 2006, Han ve ark. 2006). Ayrıca bu hücrelerin dişeti dokusundaki baskın tek-çekirdekli hücreler oldukları (tek-çekirdekli hücrelerin %45'i T hücreleri, %50'si B hücreleri, %5'i monositler) ve büyük ölçüde RANKL eksprese edebildikleri (T hücrelerinin %50'si, B hücrelerinin %90'ı RANKL eksprese etmiş) bildirilmiştir (Kawai ve ark. 2006). Bu çalışmada; derin periodontal ceplere sahip alanlar sığ ceplere sahip alanlara oranla daha yüksek $RANKL^{DOS}$ düzeyleri sergilerken, her iki grubun OPG^{DOS} düzeyleri birbirine yakındı. Derin periodontal ceplerde sığ ceplere oranla daha fazla miktarda enflamatuvar granülasyon dokusu ve daha yoğun enflamatuvar hücre bulunmaktadır. Patolojik kemik rezorbsiyonunda da temel RANKL kaynağı monositler, T ve B hücreleri gibi tek-çekirdekli enflamatuvar hücreler olduğundan, derin alanlara ait $RANKL^{DOS}$ düzeyinin sığ alanlardaki $RANKL^{DOS}$ düzeyinde yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Periodontitis hastalarının dişeti dokusu ve DOS'unda sağlıklı bireylerden daha yüksek RANKL düzeyleri tespit eden, fakat her iki grubun OPG düzeylerinin benzer olduğunu bildiren çalışmalar vardır (Kawai ve ark. 2006, Wara-aswapati ve ark. 2007, Lu ve ark. 2006). Buna karşılık hastalıklı dokularda sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek RANKL ve daha düşük OPG ekspresyonlarının tespit edildiğini bildiren çalışmalar da vardır (Crotti ve ark. 2003, Mogi ve ark. 2004, Bostanci ve ark. 2007a).

Birçok çalışma periodontitis hastalarının dişeti dokusundaki veya DOS'daki RANKL/OPG oranını saptayabilmek için RANKL ve OPG konsantrasyonlarını incelemiştir (Liu ve ark. 2003, Bostanci ve ark. 2007a, 2007b). DOS içeriği düzeyinin konsantrasyon olarak ifade edilmesi özellikle dişeti oluğu sıvısı hacminin

oldukça düşük olduğu sağlıklı bölgelerde "yanlış" yüksek değerlerin saptanmasına neden olabilir (Curtis ve ark. 1988). DOS hacminin oldukça az ve değişken olması nedeniyle, içerik düzeyinin değerlendirilmesinde total miktarın kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir (Adonogianaki ve ark. 1993, Lamster ve ark. 1986). Bu araştırmada $RANKL^{DOS}$, OPG^{DOS} düzeyleri hem total miktar hem de konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Lamster ve ark. (1986)'nın da belirtmiş olduğu gibi sonuçlarımızın total miktar üzerinden tartışılmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz. Literatürdeki çalışmaların çoğunluğu $RANKL^{DOS}$ ve OPG^{DOS} düzeylerini konsantrasyon olarak belirtmiş ve tartışmış olmakla birlikte, sonuçların konsantrasyon veya total miktar cinsinden ifade edilmiş olmalarının $RANKL/OPG^{DOS}$ oranını değiştirmeyeceği de bir gerçektir. Bu nedenle $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı, sonuçların değerlendirilmesi sırasında üzerinde duracağımız değerli bir bulgudur.

Değişik araştırmalarda saptanan RANKL ve OPG düzeyleri çeşitlilik gösterse de; bu çalışmaların ortak noktası periodontitis hastalarında belirlenen RANKL/OPG oranının sağlıklı bireylerden her zaman daha yüksek çıkmasıdır (Kawai ve ark. 2006, Wara-aswapati ve ark. 2007, Mogi ve ark. 2004, Bostanci ve ark. 2007a, Lu ve ark. 2006, Bostanci ve ark. 2007b, Liu ve ark. 2003). Literatürde bu oranın periodontitis hastalarında genellikle 1'den büyük, sağlıklı bireylerde ve gingivitis hastalarında ise 1'den küçük olduğu görülmektedir (Liu ve ark. 2003, Mogi ve ark. 2004, Bostanci ve ark. 2007a, 2007b, Wara-aswapati ve ark. 2007). Bostanci ve ark. (2007a) kronik periodontitis ve agresif periodontitis hastalarına ait $RANKL/OPG^{DOS}$ oranlarının 3'ün üzerinde olduğunu tespit etmiştir. Gingivitis hastalarından ve sağlıklı bireylerden elde edilen $RANKL/OPG^{DOS}$ oranları ise 0'a yakın bulunmuştur (Mogi ve ark. 2004, Bostanci ve ark. 2007a). Nitekim bu çalışmada da derin ceplerde $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı da sığ ceplerden yüksek bulundu. Tedaviden önce derin ve sığ ceplerin $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı sırasıyla 5.62 ve 1.73 gibi yüksek seviyelerde belirlenmiştir. Tedavi sonrası bu oran ağız genelinde oldukça azalmış, derin ceplerde 1.03'e, sığ ceplerde ise sağlıklı bireylerde rastlanan seviyelere, 0.25'e düşmüştür. Hastalığın belirteci olabilecek herhangi bir parametrenin periodontal doku sağlığının değerlendirilmesinde kullanılan klinik parametreler ile ilişkili olması beklenir. Bostanci ve ark. (2007a) $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı ile SCD ve KAD arasında pozitif bir ilişki saptarken, Pİ ve Gİ ile ilişki olmadığını saptamıştır. Araştırmamızın

istatistiksel verileri ise RANKL/OPG^{DOS} oranı ile hastalığın klinik durumunu belirleyen parametreler arasında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya koydu. Hatta bu ilişki tüm örnekleme alanlarında tedavi öncesi ve sonrasında geçerliydi ve derin ceplerde bu ilişki daha da güçlüydü. Bu çalışmanın sınırları içerisinde RANKL/OPG oranının periodontal doku kaybı ile ilişkili ve osteoklast aktivitesinin bir belirtisi olabileceği verilerine dayanarak, uyguladığımız cerrahisiz periodontal tedavi sonrası hastalığın kontrol altına alındığından bahsedebiliriz.

5-SONUÇ ve ÖNERİLER

1- Kronik periodontitis hastalarında hastalıktan belirli derece etkilenmiş ve ataşman kaybının geliştiği alanlarda dişeti oluğu sıvısındaki RANKL düzeyi henüz etkilenmemiş veya az etkilenmiş alanlara göre daha yüksektir.

2- Kronik periodontitis hastalarında hastalıktan etkilenmiş ve henüz etkilenmemiş alanlarda dişeti oluğu sıvısındaki OPG düzeyleri açısından fark yoktur.

3- RANKL/OPG^{DOS} oranı hastalıktan etkilenen alanlarda henüz etkilenmemiş alanlara göre daha yüksektir.

4- Çalışmada kullanılan yöntem ve kit ile hastalardan elde edilen dişeti oluğu sıvısında IL-17 tespit edilemedi.

5- Generalize kronik periodontitis hastalarında cerrahisiz periodontal tedavi tüm klinik parametrelerde düzelme sağlarken, dişeti oluğu sıvısı RANKL düzeyleri ve RANKL/OPG oranının anlamlı şekilde azalmasına neden oldu.

6- RANKL/OPG^{DOS} oranı periodontal dokuların klinik durumunun değerlendirilmesinde kullanılan SCD, KAS, Gİ gibi parametreler ile ilişkili bulundu ve hastalığın klinik durumunu yansıtabilen bir parametre olabileceği sonucuna varıldı.

Osteoimmünolojik bilgilere yenilerinin eklenmesiyle periodontal hastalıkta kemik rezorbsiyonunun altında yatan mekanizmalar ve birçok enflamatuvar hastalığın patogenezi daha da iyi anlaşılmaya başlayacaktır. RANKL/OPG^{DOS} oranının periodontal hastalıklar için diagnostik değeri olabilir. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ışığında, şüphesiz daha kapsamlı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmakla birlikte, RANKL/OPG^{DOS} oranının periodontal hastalık ilerleyişini, aktivitesini gösterebileceği kanısına varılmıştır. OPG füzyon proteini ve diğer RANK aracılı osteoklastogenez inhibitörlerinden yararlanılarak RANKL-RANK-OPG ekseninin modülasyonu yakın gelecekte mümkün olabilir. Periodontal hastalıklarda yapılacak tedavi girişimleri, bir yerde RANKL düzeyini düşürmek, OPG seviyesini arttırmak, dolayısıyla RANKL/OPG oranını azaltmak amaçlı olmalıdır.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kronik Periodontitisli Bireylerde Cerrahisiz Periodontal Tedavinin, Dişeti Oluğu Sıvısı OPG ve RANKL Düzeyleri Üzerine Olan Etkisi

Dt. Bahadır ŞATANA

Prof. Dr. Tamer ATAOĞLU

Periodontoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2009

Bu çalışmanın amaçları, kronik periodontitisli hastalarının cerrahisiz periodontal tedavi öncesi ve sonrasındaki dişeti oluğu sıvısı (DOS) IL–17, OPG ve RANKL düzeylerini belirlemek, ve bu sitokinler ile klinik parametreler arasındaki olası ilişkiyi açıklığa kavuşturmaktır.

Araştırma grubu generalize kronik periodontitis teşhisi konulmuş (yaşları 35 ile 59 arasında değişen, 12 kadın ve 22 erkek) toplam 34 gönüllüden oluşmaktadır. Çalışmanın başında, sondlama cep derinliği (SCD), klinik ataşman seviyesi, plak indeksi ve gingival indeks skorları kaydedildi. Her bir hastanın her bir yarım çenesinde bir derin cep bölgesi (SCD ≥5mm, DC) ve bir sığ cep bölgesi (SCD ≤3mm, SC) DOS örnekleme alanları olarak belirlendi. Kağıt şeritler kullanarak DOS örnekleri toplandı. Derin ve sığ ceplerden toplanan kağıt şeritler ayrı ayrı tüpler içerisinde havuzlandı ve saklandı. Başlangıç ölçümler ve DOS örneklemeleri tamamlandıktan sonra çalışmaya dahil edilen bütün bireylere diş taşı temizliği ve kök yüzeyi düşleştirilmesinden oluşan cerrahisiz periodontal tedavi yapıldı. Üç hafta sonra, klinik değerlendirmeler ve DOS örneklemeleri tekrarlandı. DOS IL-17, RANKL ve OPG düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi ve konsantrasyon ve total miktar olarak ifade edildi. DC bölgelerine ait $RANKL^{DOS}$ düzeyleri SC bölgelerine ait $RANKL^{DOS}$ düzeylerinden anlamlı derecede ($p<0.01$) daha yüksekken, her iki grubun OPG^{DOS} düzeyleri birbirine yakındı ($p>0.0$). Sonuç olarak DC'ye ait RANKL/OPG oranı SC'ninkinden daha yüksekti ($p<0.01$). Bununla beraber DOS örneklerinde IL-17 tespit edilemedi. Tedaviden sonra, bütün klinik parametrelerdeki belirgin iyileşme ($p<0.01$) ile beraber her iki grubun RANKL/OPG oranları anlamlı ($p<0.01$) olarak azalmıştır. $RANKL/OPG^{DOS}$ oranı klinik parametrelerle anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur ($p<0.01$).

Bu çalışmanın sınırları içerisinde, $RANKL/OPG^{DOS}$ oranının periodontal hastalığın ilerleyişini veya periodontal hastalığın aktivitesini yansıtabilecek potansiyele sahip olduğu ileri sürülebilir. Sonuç olarak, bulgularımız RANKL/OPG oranının diagnostik değerini daha da güçlendirmektedir.

Anahtar kelimeler: Dişeti oluğu sıvısı, RANKL, Osteoprotegerin.

7.SUMMARY

Effect of Non-surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid Levels of OPG and RANKL in Chronic Periodontitis

Dt. Bahadır ŞATANA

Prof. Dr. Tamer ATAOĞLU

The objectives of this study were to identify and quantify gingival crevicular fluid (GCF) IL-17, OPG and RANKL levels of chronic periodontitis patients before and after non-surgical periodontal therapy, and to clarify possible correlations of these cytokines with clinical parameters.

Study population consisted of 34 volunteers (22 males and 12 females, aged between 35 to 59 years) who were diagnosed as generalized chronic periodontitis. At baseline, probing depth (PD), clinical attachment level, plaque index and gingival index were recorded. A deep pocket site (PD $\geq$5mm, DP) and a shallow pocket site (PD $\leq$3mm, SP) in each quadrant of each patients were determined as gingival crevicular fluid sampling sites. GCF samples were collected using a paper strips. The paper strips from deep and shallow pockets were pooled and stored in tubes (a total of 68 tubes) seperately. Following baseline measurements and GCF sampling, non-surgical periodontal treatment including scaling and root planning was performed on all participants. Three weeks after, clinical measurements and GCF sampling were repeated. GCF levels of IL-17, RANKL and OPG were determined by ELISA method and defined as concentrations and total amounts. GCF levels of RANKL was significantly higher in DP sites than SP sites ($p<0.01$), while GCF levels of OPG was similar in both groups ($p>0.05$). Consequently, RANKL/OPG ratio was higher in DP than SP ($p<0.01$). However, IL-17 could not be detected in GCF samples. After treatment, all clinical parameters showed a significant improvement ($p<0.01$) which was accompanied by a significant reduction in RANKL/OPG ratio for both groups ($p<0.01$). RANKL/OPG ratio was significantly correlated with clinical paramaters ($p<0.01$).

Within the limits of this study, we suggest that GCF RANKL/OPG ratio may have a potential to reflect the progression of periodontal disease or activity. In conclusion, our findings strengthens further the diagnostic value of the RANKL/OPG ratio for chronic periodontitis.

Key words: Gingival crevicular fluid, RANKL, Osteoprotegerin.

8. KAYNAKLAR

Adonogianaki, E., Moughal, N.A., Kinane, D.F. Lactoferrin in the gingival crevice as a marker of polymorphonuclear leukocytes in periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1993;20:26-31.

Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: A prototype member of an emerging family. J Leukoc Biol. 2002;71:1-8.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature. 1997;390:175-79.

Armitage GC. Periodontal disease: Diagnosis. Ann Periodontol. 1996;1:37.

Armitage GC, Svanberg GK, Löe H. Microscopic evaluation of clinical measurements of connective tissue attachment levels. J Clin Periodontol. 1977;4:173.

Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. Nature. 2000;408:535–36.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol. 1998;160(1):403-9.

Attström R, Egelberg J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. J Periodontal Res. 1970;5:48–55.

Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Medscape Womens Health. 2000;5:5.

Barros SP, Silva MA, Somerman MJ, Nociti FH Jr. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. J Dent Res. 2003;82:791–95.

Battaglino R, Kim D, Fu J, Vaage B, Fu XY, Stashenko P. C-myc is required for osteoclast differentiation. J Bone Miner Res. 2002;17:763–73.

Beck JD, Koch GG, Rozier RG, Tudor GE. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. J Periodontol. 1990;61:521–28.

Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C, Kalfas S, Lerner UH. The cytolethal distending toxin induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. Infect Immun. 2005;73:342–51.

Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME: Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:2117-24.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. Nature. 2006;441:235-38.

Boyce BF, Xing L, Chen D: Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. Cell Metab. 2005;2:344-45.

Boyce B.F, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Research & Therapy. 2007;9(Suppl 1) [cited 2007 Jun 29]. Available from URL: http://arthritis-research.com/content/9/S1/S1.

Boyce BF, Yoneda T, Lowe C, Soriano P, Mundy GR. Requirement of pp60c-src expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice. J Clin Invest. 1992;90:1622–27.

Boyle W.J, Simonet W.S, Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003;423:337-42.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. J Clin Periodontol. 2007a;34(5):370-6.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Berdeli A, Atilla G, McKay IJ, Hughes FJ, Belibasakis GN Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. J Periodontal Res. 2007b;42(4),287-93.

Brown LJ, Löe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontology 2000. 1993;2:57–71.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 1998;12:1260-68.

Campos-Xavier AB, Saraiva JM, Ribeiro LM, Munnich A, Cormier-Daire V. Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutation in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. Hum Genet. 2003;112:186–89.

Caton J, Proye M, Polson A. Maintenance of healed periodontal pockets after a single episode of root planing. J Periodontol. 1982;53(7):420-24.

Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. Periodontology 2000. 2003;31:167–80.

Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA: Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer. 2006;107:289-98.

Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, Kwon BS. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. Eur J Immunol. 2001;31:2179-88.

Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Treponema socranskii. J Periodontol. 2005;76:813–20.

Cimasoni G. The crevicular fluid. Monogr Oral Sci. 1974;3:1–12.

Claffey N, Polyzois I, Ziaka P. An overview of nonsurgical and surgical therapy Periodontology 2000. 2004;36:35–44.

Cobb, C.M. Non-surgical pocket therapy: Mechanical. Ann Periodontol. 1996;l:443-90.

Cobb, C. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing, J Clin Periodontol. 2002;29(Suppl 2):6-16.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J. Periodontol. 2008;79:1569-76.

Collin-Osdoby P: Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. Circ Res. 2004;95:1046-57.

Crotti TN, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Findlay DM, Kraan M, Tak PP, Haynes DR. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. Ann Rheum Dis. 2002;61(12):1047-54.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res. 2003;38:380–87.

Crotti TN, Smith MD, Findlay DM, Zreiqat H, Ahern MJ, Weedon H, Hatzinikolous G, Capone M, Holding C, Haynes DR. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. Biomaterials. 2004;25(4):565-73.

Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawkner M, et al.: A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. Hum Mol Genet. 2002;11:2119-27.

Curtis, M.A., Griffllths, G.S., Price, S.J., Coulthurst, S.K., Johnson, N.W. The total protein concentration of gingival crevicular fluid. Variation with sampling time and gingival inflammation, J Clin Periodontol. 1988;15:628-32.

Delima AJ, Karatzas S, Amar S, Graves DT. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. J Infect Dis. 2002;186:511-16.

Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. Periodontology 2000. 2003;31:55–76.

Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. Periodontology 2000. 1997;14:54–78.

Ebersole J. Humoral Immune Responses in Gingival Crevicular Fluid: Local and Systemic Implications. Periodontology 2000. 2003;31:135–66.

Ensig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaissé JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. J Cell Biol. 2000;151:879–89.

Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell. 2000;103:41-50.

Feng S, Novack DV, Faccio R, Ory DS, Aya K, Boyer MI. A Glanzmann's mutation in ß3 integrin specifically impairs osteoclast function. J Clin Invest. 2001;107:1137–44.

Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. J Periodontol. 1999;70:1457-63.

Frankenthal S, Nakhoul F, Machtei EE, Green J, Ardekian L, Laufer D, Peled M. The effect of secondary hyperparathyroidism and hemodialysis therapy on alveolar bone and periodontium. J Clin Periodontol. 2002;29:479–83.

Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem. 2002;277:48868–75.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:12-20.

Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. Curr Opin Periodontol. 1994;94:28–38.

Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. J Dent Res. 1998;77:16–26.

Giannobile WV. C-telopeptide pyridinoline cross-links. Sensitive indicators of periodontal tissue destruction. Ann N Y Acad Sci. 1999;30: 404–12.

Graves DT, Jiang Y, Valente AJ. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. Front Biosci. 1999;4:571–80.

Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, Kakouras A, Jiang Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to P. gingivalis infection. J Dent Res. 2001;80:1875–79.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2003;74:391-401.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2008;79(8Suppl):1585-91.

Greenstein, G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: A review. J Periodontol. 1992;63:118-30.

Hammerle CH, Joss A, Lang NP. Short-term effects of initial periodontal therapy (hygienic phase). J Clin Periodontol. 1991;18(4):233-39.

Han X, Kawai T, Eastcott JW, Taubman MA. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. J Immunol. 2006;176(1):625-31.

Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Cutting edge: Roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. J Immunol. 2003;170:4432-36.

Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuiri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A, Oguchi H, Shirakawa T. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2002;37:405–411.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med. 2001;79:243–53.

Hofbauer LC, Schoppet M: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. JAMA. 2004;292:490-95.

Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol. 2004;31:475–82.

Hormdee D, Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Kobayashi H, Koshy G, Noguchi K, Nitta H, Ishikawa I. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on IL-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. Clin Exp Immunol. 2005;142:490–97.

Horwood NJ, Kartsogannis V, Quinn JMW, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1999;265:144–50.

Huang JC, Sakata T, Pfleger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. Parathyroid hormone differentially regulates expression of RANKL and OPG. J Bone Miner Res. 2004;19:235–44.

Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. Nat Genet. 2000;24:45-48.

Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss, J Clin Periodontol 2002;29:975-86.

Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, et al. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. J Biol Chem. 2001;276:13065–71.

Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000. 1997;14:79–111.

Ito H, Honda T, Domon H, Oda T, Okui T, Amanuma R, Nakajima T, Yamazaki K. Gene expression analysis of the CD4+ T-cell clones derived from gingival tissues of periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 2005;20:382-86.

Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Söder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2002;29:604-14.

Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the Pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol. 2004;75:37-43.

Johnson RB, Serio FG. The contribution of interleukin-13 and -15 to the cytokine network within normal and diseased gingiva. J Periodontol. 2007;78(4):691-95.

Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human T cells. Immunol Lett. 2004;94:239–46.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. J Dent Res. 2001; 80:887–91.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. J Bone Miner Res. 2002;17:210–20.

Kawai T, Shimauchi H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA. Antigen direction of specific T-cell clones into gingival tissues. Immunology. 1998;93:11–19.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. Am J Pathol. 2006;169(3),987-98.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology. 2001;142:5050-55.

Kikuchi T, Yoshikai Y, Miyoshi J, Katsuki M, Musikacharoen T, Mitani A, Tanaka S, Noguchi T, Matsuguchi T. Cot/Tpl2 is essential for RANKL induction by lipid A in osteoblasts. J Dent Res. 2003;82:546–50.

Kim S, Koga T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karesenty G, Taniguchi T, Takayanagi H. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in transcriptional program of osteoblast differentiation. Genes Dev. 2003;17:1979–91.

Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY: Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. Mol Cell Biol. 2006;26:1002-13.

Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE,. Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. Periodontology 2000. 2007;43:294–15.

Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Isogai E, Chiba I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by Porphyromonas gingivalis in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004;315:107–12.

Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugghe B, Nakashima K, Takayanagi H: NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. Nat Med. 2005;11:880-85.

Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. Nat Med. 2006;12:657-64.

Kondo H, Guo J, Bringhurst FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. J Bone Miner Res. 2002;17:1667–79.

Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature. 1999;397:315–23.

Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. Cell. 2001;104:205–15.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontology 2000. 1997;14:33–53.

Kramer J.M, Gaffen S.L. Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. J Periodontol. 2007; 78; 1083-93.

Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, Pinar S, Demirel I, Toyman U. Gingival crevicular fluid prostaglandin E2 and thiobarbituric acid reactive substance levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis following phase I periodontal therapy and adjunctive use of flurbiprofen. J Periodontol. 2007;78(1):104-11.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998;93:165-76.

Lamster IB, Oshrain RL, Gordon JM. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: Considerations in data reporting based on anlysis of individual crevicular sites. J Clin Periodontol. 1986;13:799-804.

Langowski J.L, Zhang X, Wu L, Mattson J.D, Chen T, SmithK, Basham B, McClanahan T, Kastelein R.A, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. Nature. 2006;442:461-65.

Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. J Clin Periodontol. 1995;22:885-90.

Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for phsiological and pathological bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(2):64-81.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. J Dent Res. 2006;85(7):596-07.

Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. Nat Genet. 1999;23:447–51.

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med. 2006;203:2271-79.

Listgarten MA. Electron microscopic study of the gingivodental junction of man. Am J Anat. 1966;119:147–77.

Listgarten MA, Mao R, Robinson PJ. Periodontal probing and the relationship of the probe tip to periodontal tissues. J Periodontol. 1976;47:511.

Listgarten MA. Periodontal probing: What does it mean? J Clin Periodontol. 1980;7:165.

Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. Int J Mol Med. 2003;11:17–21.

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. Genes Dev. 1999;13:1015-24.

Lowenguth RA, Greenstein G. Clinical and microbiological response to nonsurgical mechanical periodontal theraphy: Periodontology 2000. 1995;9:14-22.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy, Acta Odontol Scand. 1963;21:533.

Löe H, Holm-Pedersen P. Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae. Periodontics. 1965;3:171–77.

Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2006;41(4),354-60.

Lubberts E, Van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. J Immunol. 2003;170:2655-62.

Magnusson I, Listgarten MA. Histological evaluation of probing depth following periodontal treatment. J Clin Periodontol. 1980;7:26.

Mahamed DA, Marleau A, Alnaeeli M, Singh B, Zhang X, Penninger JM, Teng YT. G(−) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. Diabetes. 2005;54:1477–86.

Mahanonda R, Seymour GJ, Powell LW, Good MF, Halliday JW. Limit dilution analysis of peripheral blood T lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. Clin Exp Immunol. 1989;75:2450–51.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 2006;441:231-34.

Marques MR, de Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. Arch Oral Biol. 2004;50:421–29.

Marsh P, Martin MV. Oral microbiology, 4.ed, p.1, 170, Wright, Oxford, 2000.

Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. Nat Genet. 2000;24:184–87.

McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL. Mice lacking ß3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. J Clin Invest. 2000;105:433–40.

Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. J Periodontol. 1991;62:761–74.

Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. J Dent Res. 2004;83:166–69.

Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Aramaki M, Mahanonda R, Kojima T, Murakami Y, Saito M, Morotome Y, Ishikawa I. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. Clin Exp Immunol. 2002;130:338–44.

Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, He L, Kunze M, Suda T, Koshy G, Kobayashi H, Oda S, Nitta H. Ishikawa I. Roles of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. Periodontology 2000. 2007;43:65-84.

Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T, Inoue J. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. Genes Cells. 1999;4:353-62.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 275(3):768-75.

Nanci A, Bosshardts DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontology 2000. 2006;40:11–28.

Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:30-36.

Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol. 1996;1:821– 78.

Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K, Hamada S, Amano A. Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. Infect Immun. 2004;72:1706–14.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. Laboratory Invest. 1976;3:235– 49.

Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. J Periodontol. 1981;52(9):477-91

Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. Int Dent J. 1997;47:61– 87.

Philbrick WM. Parathyroid hormone-related protein is a developmental regulatory molecule. Eur J Oral Sci. 1998;106:32–37.

Pihlström, BL, McRugh RB, Oliphant TH, Ortiz-Campos C. Comparison of surgical and non-surgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 and 1/2 years, J Clin Periodontol. 1983;10:524-41.

Plancak D. Jorgic-Srdjak K. Curilovic Z. New classification of periodontal diseases. Acta Stomatol Croat 2001;35:89-93.

Polson AM, Caton JG, Yeaple RN, Zander HA. Histological determination of probe tip penetration into gingival sulcus of humans using an electronic pressure-sensitive probe. J Clin Periodontol 1980;7:479.

Proye M, Caton J, Polson A. Initial healing of periodontal pockets after a single episode of root planning monitored by controlled probing forces. J Periodontol 1981;53:296-301.

Quinn JM, Horwood NJ, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation. J Bone Miner Res. 2000; 15:1459–66.

Rogers A, Eastell R: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:6323-31.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998,10;95(23):13453-58.

Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. J Bone Miner Res. 1999;14:1486–92.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000. 1997;14:173–201.

Schenkein HA, Gunsolley JC, Best AM, Harrison MT, Hahn CL, Wu J, Tew JGm. Antiphosphorylcholine antibody levels are elevated in humans with periodontal diseases. Infect Immun. 1999;67:4814–18.

Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS: Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. Nat Clin Pract Rheumatol. 2005;1:47-54.

Schroeder HE. Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva. Helv Odontol Acta. 1969;13:65–83.

Schroeder HE, Lindhe J. Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs. J Periodontol. 1980;51(1):6-19.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontology 2000. 1997;13:91–120.

Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PGE2, IL-1β, IL-6 and TNFα by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. J Periodontol. 1994;65:139–46.

Silness P, Löe H. Periodontal disease in pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition, Acta Odontol Scand. 1964;22:112-35.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89:309-19.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134–44.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev. 1999;20:345–57.

Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med. 2001;12:125–35.

Taubman MA, Kawai T, Han X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. J Clin Periodontol. 2007;34(5):367-9

Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. Nature. 2000;408:600-605

Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. Nature. 2002;416:744-49.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. J Clin Periodontol. 2005;32:369-74.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodontal Res. 2005a;40:287–93.

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. J Mol Med. 2005b;83:170–79.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Taniguchi T. Stat1-mediated cytoplasmic attenuation in osteoimmunology. J Cell Biochem. 2005c;94:232–40.

Takayanagi H. Mini review: Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodont Res. 2005d;40:287–93.

Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP, Penninger JM. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest. 2000;106:59–67.

Thiebaud D, Krieg MA, Gillard-Berguer D, Jacquet AF, Goy JJ, Burckhardt P. Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. Eur J Clin Invest. 1996;26:549-55.

Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Pavasant P. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells. J Periodontol. 2004:75:1647–54.

Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. Nature. 1997;386:81–84.

Tonetti MS, Imboden M, Gerber L, Lang NP. Compartmentalization of inflammatory cell phenotypes in normal gingiva and peri-implant keratinized mucosa. J Clin Periodontol. 1995;22:735–42.

Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. J Periodontol. 1998;69:1139–47.

Tsai CC, Hong YC, Chen CC, Wu YM. Measurement of prostaglandin E_2 and leukotriene B_4 in the gingival crevicular fluid. J Dent. 1998;26:97– 103.

Tüter G, Kurtiş B, Serdar M, Yücel A, Ayhan E, Karaduman B, Ozcan G. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. J Clin Periodontol. 2005;32(9):1011-15.

Uchida M, Shima M, Shimoaka T, Fujieda A, Obara K, Suzuki H, Nagai Y, Ikeda T, Yamato H, Kawaguchi H. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. J Cell Physiol. 2000;185:207–14.

Uitto V.J. Gingival crevice fluid–an introduction. Periodontology 2000. 2003;31:9–11.

Van Dyke TE, Hoop GA. Neutrophil function and oral disease. Arch Oral Biol. 1990;1:117–33.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity. 2006;24:179-89.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:383-89.

Wada N, Maeda H, Tanabe K, Tsuda E, Yano K, Nakamuta H, Akamine A. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. J Periodontal Res. 2001;36:56–63.

Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, Gasser J, Hara H, Schett G, Penninger JM: The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. Nat Med. 2005;11:394-99.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM: RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006;12:17-25.

Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. Nature. 1992;360:741–45.

Wang Q, Xie Y, Du QS, Wu XJ, Feng X, Mei L, McDonald JM, Xiong WC. Regulation of the formation of osteoclast actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin. J Cell Biol. 2003;160:565–75.

Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. J Periodontol. 2007;78(6):1062-69.

Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S: Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. N Engl J Med. 2002;347:175-84.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS III, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem. 1997;272:25190-94.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology. 1998;139:1329-37.

Yetkin Ay Z, Sütçü R, Uskun E, Bozkurt FY, Berker E. The impact of the IL-11:IL-17 ratio on the chronic periodontitis pathogenesis: a preliminary report. Oral Dis. 2008;15(1):93-99.

Zhang Z, Neff L, Bothwell AL, Baron R, Horne WC. Calcitonin induces dephosphorylation of Pyk2 and phosphorylation of focal adhesion kinase in osteoclasts. Bone. 2002;31:359–65.

Zou W, Amcheslavsky A, Bar-Shavit Z. CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via Toll-like receptor 9. J Biol Chem. 2003;278:16732–40.

9-ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Mardin'de doğdu. İlköğrenimini İzmir Dokuzeylül İlkokulu'nda 1992'de, ortaokul öğrenimini İzmir Türk Koleji Anadolu Lisesi'nde 1996'da, lise öğrenimini İzmir Fatih Koleji Fen Lisesi'nde 1999 yılında tamamladı. Aynı yıl öğrenime başladığı Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden 2004'de mezun oldu. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. 2005 yılında atandığı Sağlık Bilimleri Enstitüsü tahsisli araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaya devam etmektedir.