T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AGRESİF PERİODONTİTİS HASTALARINDA MONOSİT KEMOATRAKTAN PROTEİN (MCP)-1 ve CC KEMOKİN RESEPTÖR-2 POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞININ ve BU POLİMORFİZMİN GEN EKSPRESYONU ve DİŞETİ OLUĞU SIVISI MCP-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Şadiye COŞKUNER

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AGRESİF PERİODONTİTİS HASTALARINDA MONOSİT KEMOATRAKTAN PROTEİN (MCP)-1 ve CC KEMOKİN RESEPTÖR-2 POLİMORFİZMLERİNİN SIKLIĞININ ve BU POLİMORFİZMİN GEN EKSPRESYONU ve DİŞETİ OLUĞU SIVISI MCP-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Şadiye COŞKUNER

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11102024 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ii. ÖNSÖZ

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük emeği olan canım aileme,

Doktora eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim başta danışman hocam Prof. Dr. Nilgün Özlem Alptekin olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Tamer Ataoğlu, Prof. Dr. Mihtikar Gürsel, Prof. Dr. İsmail Marakoğlu, Prof. Dr. Sema Hakkı ve Prof. Dr. İsmet Duran'a,

Çalışmamız boyunca bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan ACAR ve B.A.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Said Bodur'a,

Çalışmamızın gen ekspresyonu kısmındaki istatistiksel değerlendirmelerin yapılmasındaki katkılarından dolayı S.Ü. Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Seyit Ali Kayış ve gen ekspresyonu sonuçlarının değerlendirilmesindeki değerli yorumları için S.Ü. Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aydın Güzeloğlu'na,

Her konuda yapmış olduğu karşılıksız yardımları ve sabrı için Dt. Ahmet Afşin Erbeyoğlu'na,

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan canım arkadaşım ve dostum Dt. Gülşah Tatar'a,

Genetik analizlerin laboratuvar aşamalarında, bilgilerini benimle paylaşan S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Betül Uçar'a,

Bölümdeki tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlara,

Doktora eğitimim süresince verdiği maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a,

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

Teşekkürlerimi sunarım.

iii. İÇİNDEKİLER

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

1.1. Periodontal Hastalık 1

1.2. Sitokinler 3

1.3. Kemokinler 4

1.3.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı 5

1.3.2. Kemokin Reseptörleri 8

1.4. Monosit Kemoatraktan Protein (MCP)-1 9

1.4.1. Yapısı 9

1.4.2. Biyolojik Fonksiyonu 10

1.4.3. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Enflamatuvar Hastalık 11

1.4.4. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Kronik Periodontitis 12

1.4.5. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Agresif Periodontitis 13

1.5. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2) 14

1.5.1. CC Kemokin Reseptör 2 ve Enflamatuvar Hastalık 14

1.5.2. CC Kemokin Reseptör 2 ve Periodontal Hastalık 15

1.6. Hastalıkların Genetik Temelleri 15

1.6.1. Basit Mendel Kalıtımı Hastalıkları 17

1.6.2. Kompleks Genetik Hastalıklar 17

1.6.3. Polimorfizm ve Mutasyon 18

1.6.4. Gen Ekspresyonunun Temelleri 19

1.7. MCP-1 Geni, Polimorfizmi ve Ekspresyonu 21

1.7.1. MCP-1 Gen Lokalizasyonu ve Gen Polimorfizmleri 21

MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi ve enflamatuvar hastalık 22

MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi ve periodontal hastalık 23

1.7.2. MCP-1 Gen Ekspresyonu 23

MCP-1 gen ekspresyonu ve enflamatuvar hastalık 24

MCP-1 gen ekspresyonu ve periodontal hastalık 24

1.8. CCR2 Geni, Polimorfizmi ve Ekspresyonu 25

1.8.1. CCR2 Gen Lokalizasyonu ve Gen Polimorfizmleri 25

CCR2 -190 G/A polimorfizmi ve enflamatuvar hastalık 25

1.8.2. CCR2 Gen Ekspresyonu 26

CCR2 gen ekspresyonu ve enflamatuvar hastalık 26

CCR2 gen ekspresyonu ve periodontal hastalık 27
2. GEREÇ ve YÖNTEM 28
2.1. Çalışma Grubu 28
2.2. Klinik Periodontal Değerlendirme 28
2.2.1. Plak İndeksi 28
2.2.2. Gingival İndeks 29
2.2.3. Sondlama Cep Derinliği 29
2.2.4. Klinik Ataşman Kaybı 29
2.2.5. Periodontal Teşhis 30
2.3. Biyokimyasal Değerlendirme 30
2.3.1. Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin Elde Edilmesi 30
2.3.2. Dişeti Oluğu Sıvısı MCP-1 Düzeylerinin Belirlenmesi 31
Biyokimyasal değerlendirme 31
2.4. Genetik Değerlendirme 32
2.4.1. DNA İzolasyonu 32
İzolasyon için gerekli malzemeler 32
İzolasyon basamakları 32
Polimeraz zincir reaksiyonu 33
2.4.2. MCP-1 -2518 A/G Polimorfizminin Belirlenmesi 34
Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları 34
Jel elektroforezi 35
Restriksiyon enzim kesimi ve genotipleme 35
2.4.3. CC Kemokin Reseptör 2 -190 G/A Polimorfizminin Belirlenmesi 36
Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları 36
Jel elektroforezi 36
Restriksiyon enzim kesimi ve genotipleme 37
2.5. MCP-1 Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi 38
2.5.1. Kandan Total RNA İzolasyonu 38
Lökosit izolasyonu 38
RNA izolasyonu 39
2.5.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Oluşturulması 39
2.5.3. Uygun Housekeeping Gen Seçimi 40
2.5.4. RT-PCR ile MCP-1 Sekansının Amplifikasyonu 40
2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi 42

3. BULGULAR 43
3.1. Klinik Bulgular 43
3.2. Biyokimyasal Bulgular 46
3.2.1. Biyokimyasal-Klinik Bulgular 48
3.3. Genetik Bulgular 51
3.3.1. Genetik-Klinik Bulgular 55
3.3.2. Genetik-Biyokimyasal Bulgular 60
3.4. MCP-1 Gen Ekspresyon Bulguları 63
4. TARTIŞMA 66
4.1. Klinik Parametreler 66
4.2. Biyokimyasal Parametreler 67
4.3. Genetik Bulgular ve Agresif Periodontitis 71
4.4. MCP-1 Gen Ekspresyon Bulguları 76
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 79
6. ÖZET 80
7. SUMMARY 81
8. KAYNAKLAR 82
9. EKLER 94
9.1. EK A: Etik Kurul Kararı 94
9.2. EK B: Hasta Onam Formu 95
10. ÖZGEÇMİŞ 96

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

A. actinomycetemcomitans: *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*

aa: Aminoasit

A: Adenin

AP: Agresif periodontitis

AP-1: Aktivatör protein-1

bç: Baz çifti

C. rectus: *Campylobacter rectus*

C: Sitozin

cDNA: Komplementer deoksiribonükleik asit

CCR2: CC kemokin reseptör 2

DAG: Diasilgliserol

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOS: Dişeti oluğu sıvısı

E. corrodens: *Eikenella corrodens*

ELISA: "Enzyme linked immuno sorbent assay"

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

FGF: Fibroblast büyüme faktörü "fibroblast growth factor"

G: Guanin

GAP: Generalize agresif periodontitis

GAPDH: "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"

Gİ: Gingival indeks

Glu-Leu-Arg: Glutamik asit-lösin-arjinin

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü "human immunodeficiency virus"

HLA: Spesifik insan lökosit antijen "human leukocyte antigen"

HS: Dimetil sülfat hipersensitif "dimethylsulfate hypersensitive"

I: İzolösin

IL: İnterlökin

IP: İnositol trifosfat

KAK: Klinik ataşman kaybı

kb: Kilobaz

kDa: Kilodalton

LAP: Lokalize agresif periodontitis

L: Ligand

mRNA: Mesajcı "messenger" ribonükleik asit

MCP: Monosit kemoatraktan protein "monocyte chemoattractant protein"

MCPIP: MCP-1'in uyardığı protein "MCP-1-induced protein"

MI: Miyokard enfarktüsü "Myokardial infarction"

ml: Mililitre

MIP: Monosit/makrofaj enflamatuvar protein "monocyte/macrophage inflammatory protein"

MMP: Matriks metalloproteinaz

mm: Milimetre

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

NK-kB: Nüklear faktör-kappa B

NMR: Nükleer manyetik rezonans

Ox-LDL: Okside olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein "oxidized low density lipoprotein"

P. intermedia*: Prevotella intermedia*

P. gingivalis*: Porphyromonas gingivalis*

PBMC: Periferal kan mononükleer hücreleri "peripheral blood mononuclear cells"

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu ''polimerase chain reaction"

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü "platelet-derived growth factor"

PG: Prostoglandin

pg: Pikogram

PIP: Fosfotidilinositol-bifosfat

Pİ: Plak indeksi

PKC: Protein kinaz C

PLC: Fosfolipaz C

qPCR: Quantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RE: Rölatif gen ekspresyonu

RPL32: Ribozomal protein L32

rpm: Dakikadaki devir sayısı "revolutions per minute"

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu "real-time polimerase chain reaction"

S: Sağlıklı

SCD: Sondlama cep derinliği

SDF: Stromal hücre türevi faktör “stromal cell derived factor”

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi “single nucleotide polymorphism”

sn: Saniye

T. denticola*: Treponema denticola*

T: Timin

tRNA: Transfer ribonükleik asit

T. forsythia*: Tannerella forsythia*

TAE: Tris, asetik asit ve EDTA

TNF: Tümör nekroz faktör

UBB: Ubiquitin B

UV: Ultra violet

V: Valin

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü “vascular endothelial growth factor”

1. GİRİŞ

1.1. Periodontal Hastalık

Periodontitis, dişin yüzeyine yerleşen bakteriyel biyofilm ile konak savunma mekanizması arasındaki etkileşim sonucunda dişin destek dokularının kaybıyla karakterize enflamatuvar bir hastalıktır (Berezow ve Darveau 2011). Sağlıklı periodonsiyum periodontal hastalığın gelişmesiyle birlikte mevcut klinik özelliklerini kaybeder ve dişetinde renk, kıvam, şekil ve yüzey özelliklerinde değişimler, sondlamada kanama, periodontal cep ve/veya dişeti çekilmesi gibi hastalığın klinik bulguları ortaya çıkmaya başlar. Daha sonrasında dişlerde mobilite, migrasyon görülebilir ve dişin kaybıyla da sonuçlanabilir (Flemmig 1999).

Periodontal hastalıkların başlamasında birincil etiyolojik ajan olan bakteriyel biyofilm oldukça karmaşık özelliktedir ve içerisinde birbirinden farklı çok sayıdaki mikroorganizmalar organize olmuş topluluklar halinde yaşamaktadır. Bu yapı, dişeti oluğu sıvısı (DOS) veya tükürük içinde bulunduğundan planktonik ortamda yaşayan benzer mikroorganizmalardan faklı olarak çok fazla çeşitlilik gösterir ve her bir mikroorganizmanın farklı özellikler sergilemesini sağlayan bir bariyer matriks olarak görev yapar (Costerton ve ark. 1995). Ağız boşluğunda yaklaşık 700 türden fazla bakteri çeşidi bulunmaktadır (Aas ve ark. 2005). Periodontitis gelişiminde bu ağız mikroflorası gram pozitif aerobik durumdan gram negatif anaerobik ortama doğru geçiş göstermektedir. Periodontal hastalık gelişiminde hastalığa özel farklı düzeylerde hastalık yapma gücüne sahip yeşil "green" kompleks olarak tanımlanan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans), Campylobacter rectus (C. rectus), Eikenella corrodens (E. corrodens) ve* portakal rengi "orange" kompleks olarak adlandırılan gram negatif anaerobik bakteri olan *Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)* ve *Prevotella intermedia (P. intermedia)* sorumlu olmaktadır. Hastalık ilerledikçe mikrobiyal florada kırmızı "red" kompleks olarak tanımlanan *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis), Treponema denticola (T. denticola),* ve *Tannerella forsythia (daha önceki ismi Tannerella forsythensis, T. forsythia)* baskın olarak bulunmaktadır (Socransky ve ark. 1998, Socransky ve Haffajee 2005, Berezow ve Darveau 2011).

Konak savunma sistemi, enfeksiyona karşı konağın korunmasında rol oynayan dokular, hücreler ve moleküllerden oluşan karmaşık bir mekanizmaya

sahiptir. Bağışıklık "immun" sisteminde oluşan yanıt doğal ve adaptif olmak üzere iki ana bölümden oluşur. Doğal bağışıklık "innate immunity", doğumla birlikte vardır, özelleşmemiş "spesifik olmayan" yapıdadır ve hastalığa neden olan mikroorganizmalar ile önceden herhangi bir temas olmadan gelişerek enfeksiyon/enflamasyona karşı ilk savunma hattını oluşturur. Ancak, konağın korunmasında oldukça hızlı gelişen bu savunma sistemi dokularda hasara neden olabilir (Kinane ve ark. 2001, Van Dyke ve Kornman 2008). Doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanmasında, kompleman sistemin aktivasyonunda, yabancı maddelerin tanınmasında ve ortadan kaldırılmasında, adaptif bağışıklık sisteminin aktivasyonunda rol oynar. Çok çekirdekli lökositler (veya nötrofiller), monosit ve makrofaj gibi fagositik hücreler, interlökin (IL), tümör nekroz faktör (TNF) gibi kimyasal belirteç "mediatör"lerin salınımını tetikler. Bu belirteçler kompleman sistemi ve akut faz yanıtı gibi sistemleri aktive eder. Bu sistemler, hem patojenlerin temizlenmesinde antikorlara yardımcı olur, hem de patojenleri işaretleyerek onların diğer hücreler tarafından yok edilmesini sağlar (Van Dyke ve Kornman 2008).

Sulkuler ve birleşim epitelindeki epitelyal bariyerin bozulmamış olması bakterilerin periodontal dokulara geçişini engellemekte, aynı zamanda bakteri ürünleri ve bileşenlerine karşı da etkili bir fiziksel bariyer oluşturmaktadır. Ayrıca, tükürük salgısı da devamlı olarak ağız boşluğunu yıkayarak temizlemekte ve diğer taraftan spesifik antikorların teminini sağlayarak konak savunmasında görev almaktadır (Kinane ve ark. 2001). Ağız boşluğundaki mikroorganizmalar konağa ait olan proteinlerin hücre dışı sindirimi için birçok çözünebilir enzim, amonyak, indol, hidrojen sülfid ve bütirik asidi içeren konak dokuya zararlı birçok metaboliti üretebilirler. Bakteriler tarafından ortama salınan proteazlar, epitelyal ve bağ dokusu bileşenleri olan kollajen, elastin, fibronektin ve fibrinin yıkımına neden olarak doğrudan doku yıkımından sorumlu olmaktadır. Mikrobiyal metabolitlerin salınımının yanında mikroorganizmalar konak dokularına da yayılabilirler (Abe ve ark. 1991, Kinane ve ark. 2001).

Vücudun kendi doğal florası, beslenme yarışı veya baskılayıcı ürünlerin salınımıyla hastalık yapma gücü yüksek mikroorganizmaları engeller ve böylece enfeksiyon gelişimi durdurulmuş olur. Kanda ve dokuda bulunan bakteri ve ürünleri, yayılmış olan nötrofiller, monosit/makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler gibi fagositik hücreler tarafından ortadan kaldırılabilirler. Bu hücresel cevabın yanında

genel olarak koruyucu fonksiyon görmekte ve bakteri hücre duvarına zarar vererek fagositozu da sağlamaktadır. Bununla birlikte hücrelerin enfeksiyon/enflamasyon alanına teminini kolaylaştıran lizozimler, antimikrobiyal peptidler, sitokinler, akut faz proteinleri, kompleman bileşenleri ve interferonlar da doğal bağışıklığın bileşenleri içinde yer almaktadır (Kinane ve ark. 2001).

Enfeksiyonun devam etmesi adaptif "adaptive" özelleşmiş "spesifik" bağışıklık yanıtını uyarmaktadır. Adaptif bağışıklık hastalığa etken olan patojenlere karşı konakta gelişen özelleşmiş bir yanıt olduğu için daha etkilidir. En önemli görevleri antijen sunumunda antijenleri tanımak, spesifik patojenleri ortadan kaldırmada uygun cevabı oluşturmak ve sonraki enfeksiyon durumlarında patojeni hatırlamaktır. T ve B lenfositler, adaptif bağışıklık yanıtında önemli bir role sahiptir. Bir hasar oluştuğunda, antijen spesifik T ve B lenfositleri prolifere olur. T hücreleri antijeni tanır, özel olarak onu hedef alır ve antijene karşı B hücrelerinin antikor üretimi için plazma hücrelerine dönüşümünü uyarır. Adaptif bağışıklık yanıtında T ve B hücreleri, makrofajlara ve öldürücü hücre oluşumuna yardımcı olarak konak cevabını arttırır(Page ve ark. 1997, Van Dyke ve Kornman 2008).

Bakterilerin epitelyal hücrelere yapışması "adhezyonu" sonucunda IL-1, TNF-α, matriks metalloproteinaz (MMP)'ler, prostoglandin (PG)'ler, gibi çeşitli enflamatuvar belirteçler ortama salınmaktadır (Abe ve ark. 1991). Mikroorganizmaların bağ dokusuna yayılması ile birlikte konak savunma hücreleri olan monosit/makrofajlar, fibroblastlar ve mast hücreleri aktive olur. Böylece, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12 gibi proenflamatuvar sitokinlerin, monosit kemoatraktan protein "monocyte chemoattractant protein" (MCP)-1, MCP-5, monosit enflamatuvar protein "monocyte inflammatory protein" (MIP)-1α, MIP-2 ve IL-8 gibi kemotaktik moleküllerin, PGE_2, histamin, lökotrien ve matriks metalloproteinazların salınımı ile birlikte bağ dokusunda kollajen kaybı grçekleşmekte ve periodontal doku yıkımı şiddetlenmektedir (Madianos ve ark. 2005).

1.2. Sitokinler

Sitokinler, bağışıklık "immunite" ve enflamasyonun erken ve ilerleyen dönemlerinde yer alan, konak cevabının süresini ve büyüklüğünü düzenleyen düşük moleküler ağırlıklı (5-70 kDa) proteinlerdir (Bendtzen 1994). Geçici olarak üretilmelerine karşın pikomolar konsantrasyonlarda bile etkilidirler ve nispeten

düşük sayıda eksprese edilen spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar (Balkwill ve Burke 1989, Gemmell ve ark. 1997). Hücrelerin sitokinlere karşı cevabı; sitokinlerin lokal konsantrasyonu, hücre tipi ve hücrelerin kesintisiz olarak etkileşim içinde bulunduğu diğer düzenleyicilere bağlıdır. Çoğu farklı hücre tipleri üzerine etki eden anlamına gelen, pleotropik "pleiotropic" olarak tanımlanabilirler (Gemmell ve ark. 1997, Seymour ve Gemmell 2001). Birçok fizyolojik yanıtta önemli role sahip geniş bir hücre topluluğu tarafından üretilmekle birlikte ana kaynakları T lenfositler ve makrofajlardır (Seymour ve Gemmell 2001).

Sitokinler lokal veya sistemik olarak etki ederler. Bazıları klasik hormon gibi davranırken diğer sitokinler daha lokalize olmuş etki gösterir (Güneş 1999). Bu etkiler; kendilerinin üretildikleri hücrelerde "otokrin", üretildiği hücrenin yakınındaki hücrelerde "parakrin", daha uzak hücrelerde ise "endokrin" etkilerdir (Whicher ve Evans 1990, Genco 1992). "Enflamatuvar ve bağışıklık reaksiyonlarında rol alan" ile "doku gelişimi ve tamirinde rol oynayan" sitokinler olmak üzere iki ana grupta değerlendirilir: Birinci grup sitokinler lökositler arasında bilgi aktarımını sağlayan "interlökinler", lenfosit aktivitesini etkileyen "interferonlar" ve hücrelerin enflamasyon bölgesine yönlendirilmesinde rol oynayan yani kemotaksiste görevli olan "kemokinler" olarak alt gruplara ayrılır. İkinci grup sitokinler ise büyüme faktörleri ve koloni sitimüle edici faktörler olarak sınıflandırılabilirler (Kinane ve ark. 2001).

1.3. Kemokinler

Kemokinler, spesifik reseptörlere bağlanarak enflamasyon ve homeostazda spesifik lökosit alt gruplarının kemotaksisini uyaran "kemotaktik sitokin"lerdir (Baggiolini 2001). İnsan vücudunda birçok olayda merkezi rol oynayan, sitokinlere benzer şekilde hücrelerde hazır bulunan ya da uyarı sonucu üretilen salgı proteinleridir (Yadav ve ark. 2010). Yapılan ilk çalışmalar sonucunda, kemokinler lökosit trafiğinin düzenleyicileri olarak tanımlansalar da daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar kemokinlerin fibrozis, doku remodelingi ve anjiogenezis gibi birçok enflamatuvar süreçte rol oynadığına işaret etmektedir (Lukacs 2001).

Kemokinler nötrofillerin, lenfositlerin ve monosit/makrofaj kökenli birçok hücre ve dendritik hücreleri de içeren antijen sunan hücrelerin migrasyonunu düzenlemekte (Deshmane ve ark. 2009), enflamatuvar saldırıya yanıt olarak doğal

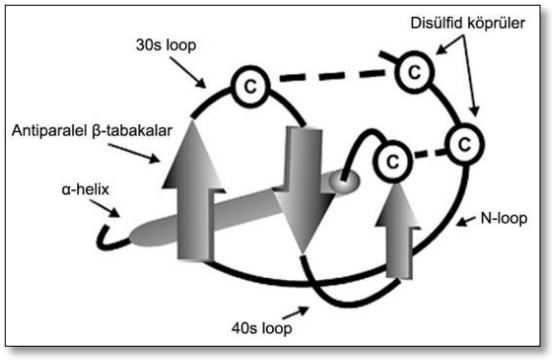
“innate immunity” ve adaptif bağışıklığın farklı basamaklarında lökositlerin toplanması, aktivasyonu ve yönlendirilmesini koordine etmektedir (Rot ve von Andrian 2004). Enflamasyonda bölgedeki koruyucu hücreler kemokinleri salgılayarak kan damarları etrafındaki kemotaktik eğilimi düzenlemektedir (Rot ve von Andrian 2004, Callewaere ve ark. 2007). Endotel hücrelerinin üzerindeki kemokinler lökositlerin yuvarlanma ve transendotelyal migrasyonunu uyarmaktadır. Kemokinlerin konsantrasyonundaki bu değişim migrasyon yapan hücrelerin yüzeyinde hücre içi sinyal moleküllerinin toplanmasını arttırırken, diğer taraftan kemokin reseptörleri migrasyon esnasında plazma membranında düzenli ve eşit oranda dağılmaktadır (Colditz ve ark. 2007, Yadav ve ark. 2010). Fonksiyonel olarak kemokinler enflamatuvar ve homeostatik kemokinler olmak üzere iki ana alt grupta toplanabilirler. Enflamatuvar kemokinler lökositlerin enflamasyon ve doku hasarının olduğu bölgeye toplanmasını kontrol ederken, homeostatik kemokinler hematopoez esnasında olgunlaşan antijen sunan hücrelerin, lökositlerin sekonder lenfoid organlara, kemik iliği ve timüse yönlendirilmesinden sorumludur. Homeostatik kemokinler hücrede hazır olarak bulunurken, enflamatuvar kemokinlerin açığa çıkması için enflamatuvar ve immun uyarılar gerekmektedir (Baggiolini ve Loetscher 2000, Moser ve ark. 2004).

Kemokinlerin ekspresyon veya fonksiyonlarındaki değişimler enflamatuvar reaksiyonun sürekliliğini sağlayarak kronik enflamasyonun yerleşmesi gibi birçok patojenik olayda anahtar role sahip olabilmektedir (Gerard ve Rollins 2001). Damarsal ve neoplastik hastalıklar, alerjik reaksiyon, organ reddi ve otoimmun hastalıklar gibi enfeksiyöz durumlarda kemokinler önemli rol oynamaktadır (Gerard ve Rollins 2001, Xia ve Frangogiannis 2007).

1.3.1. Kemokinlerin Moleküler Yapısı

Kemokinler, 8-14 kDa moleküler ağırlığa sahip protein yapısındaki moleküllerdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda insanlarda yaklaşık olarak 50 kadar kemokin ve 20 G-protein-bağlı “G-protein-coupled” kemokin reseptörü tanımlanmıştır (Gerard ve Rollins 2001). Çoğu kemokinler oldukça karmaşık yapıda en az dört sistein molekülü ve üç farklı alan “domain” içermektedir: (1) yüksek esneklikteki N-terminal alanı “N-terminal domain”, iki “N-terminal domain sistein”den meydana gelen disülfid bağları ile molekülün kalan kısmına bağlanır, (2) Bunu üç antiparalel β-kırmalı “pleated” tabakaya (Grek anahtarı) uzanan uzun bir

düğüm takip eder, (3) Bu da C-terminal α-"helix" sarmalına uzanan düz bir tabanı oluşturur (Baggiolini ve Loetscher 2000, Yadav ve ark. 2010), (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Monosit kemoatraktan protein-1'in moleküler yapısı (Yadav ve ark. 2010).

Kemokinler, genetik organizasyonlarına ve N-terminusta iki farklı korunmuş sistein kalıntıları "residue"lerinin pozisyonuna göre CC, CXC, C ve CX_3C aileleri olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır (Moser ve Loetscher 2001), (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Kemokinlerin sınıflandırılması (Deshmane ve ark. 2009).

CC KEMOKİNLER	CXC KEMOKİNLER	C KEMOKİNLER	CX_3C KEMOKİNLER
MCP-1-4			
Rantes	IL-8 (NAP-1)		
Eotaksin I, II, III	NAP-2		
MIP-1α, MIP-1 β	GR0-α,-β,-γ		
SLC	GCP-2		
ELC	B-tromboglobulin		
MEC	CTAP III	Lenfotaktin α	Fraktalkin
CTACK	Platelet faktör IV	Lenfotaktin β	
PARC	IP-10		
TARC	MIG		
MDC	ITAC		
MEC	SDF-1		
I-309	BLC		

CXC ve CC kemokinler (sırasıyla α ve β kemokinler) ilk keşfedilen kemokinlerdir ve en iyi tanımlanmış kemokin gruplarını oluşturur. Bu iki grup dört korunmuş sistein içermektedir; bunlardan iki sistein molekülü bir aminoasit ile ayrılmakta (CXC) veya iki sistein molekülü komşu olmaktadır (CC). Her iki kemokin ailesindeki disülfit köprüleri CXC kemokinlerde birinci ve üçüncü sistein molekülleri arasında, CC kemokinlerde ise ikinci ve dördüncü sistein molekülleri arasında oluşmaktadır (Van Coillie ve ark. 1999, Baggiolini 2001). Interlökin-8 CXC kemokinlerin ilk örneğidir, diğer taraftan MCP-1 ise CC kemokini en iyi şekilde tanımlamaktadır. Lenfotaktin iki korunmuş sistein molekülü içerir ve fraktalkin/nörotaktin ise membrana bağımlı glikoprotein yapısındadır; bunlar

sırasıyla C ve CX_3C kemokinlerinin örnekleridir (Van Coillie ve ark. 1999, Baggiolini 2001). CXC kemokin ailesi kodlayan gen 4q12-21 kromozoma komşudur (Zlotnik ve ark. 2006). Bu grupta sadece stromal hücre türevi faktör "Stromal cell derived factor" (SDF-1α) 10. kromozomdadır. CC kemokin ailesini kodlayan gen ise 17q11.2-12'de yerleşmiştir. Sadece makrofaj enflamatuvar protein "macrophage inflammatory protein" (MIP-3β) dokuzuncu kromozomda; MIP-3α ikinci kromozomda yerleşmiştir (Rollins 1997, Baggiolini ve Loetscher 2000).

CXC kemokinler yapısal olarak N terminallerinden birinci sistein molekülüne kadar glutamik asit-lösin-arjinin aminoasit "glutamatic acid-leucine-arginine" (Glu-Leu-Arg) dizilimi gösterenler (ELR motif+) ve göstermeyenler (ELR motif-) olarak da iki alt gruba ayrılırlar. Glutamik asit-lösin-arjinin diziliminin varlığı (ELR+) yapısal sınıflandırma ile sağlam fonksiyonel bağ kurmakta, (ELR+) CXC kemokinler nötrofiller için spesifik olmaktadır (Murphy ve ark. 2000). Birçok CXC kemokinleri nötrofil granüllerini aktive ederken, CC kemokinleri monositler, T lenfositler, doğal öldürücü "natural killer" hücreler, eozinofiller, bazofiller ve dentritik hücreler gibi birçok hücre üzerine etki etmektedirler (Van Coillie ve ark. 1999). Bununla birlikte CC kemokinleri sadece kendi etki spekturumlarında değil, kendi protein dizilimleri ve kromozomal yerleşimlerinde de geniş bir heterojenite göstermektedir. Monosit kemoatraktan proteinler ve eotaksin, yapısal ve fonksiyonel özellikleri esas alındığında CC kemokin ailesinin bir üyesidir. Günümüze kadar MCP'lerin beş üyesi tanımlanmıştır; MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) ve MCP-5 (CCL12) (Proost ve ark. 1996, Yadav ve ark. 2010). Kemokinlerin aminoasit dizilimleri, aynı zamanda sekonder ve tersiyer yapıları da birbirine çok benzemektedir. Yapılan yapı-fonksiyon ilişkisini inceleyen çalışmalar kemokinlerin reseptörlere bağlanmalarında ve aktivasyonlarında N-terminal bölgelerinin önemli olduğunu göstermektedir (Clark-Lewis ve ark. 1991). Tüm yapısal analizler kemokinlerin, kristalizasyonun gerekli olduğu şartlarda veya nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopi çalışmalarında multimer yapıda olduğunu göstermiştir. CC kemokinleri, MCP-1 gibi, dimer ara yüzeyi esas olarak N terminal alan "domain" (CC kemokin) veya iki α-"helix" sarmalı (CXC kemokin) yakınında sistein kalıntıları "rezidue"'leri ile birlikte antiparalel β- tabakasından oluşur.

1.3.2. Kemokin Reseptörleri

Kemokin reseptörleri heterodimerik G-proteinleri ile çiftler oluşturan 7-transmembran alan "domain" reseptörlerdir. Kemotaktik eğilim süresince hedef hücrelerin migrasyonunun uyarılması için heterodimerik G-proteinlerinden βγ alt ünitlerinin salınımının gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu salınım neticesinde fosfoinositit'e özgü fosfolipaz C izoenzimi aktive olmakta, inositol-1,4,5-trifosfat oluşumu ve hücre içi kalsiyum artışı ile sonuçlanmaktadır (Thelen 2001).

Kemokin/kemokin reseptör sistemlerinin gereğinden fazla olması nedeniyle birçok kemokin reseptörünün birden fazla kemokine bağlanması ve çoğu kemokinin de birçok farklı kemokin reseptörüne bağlanabilmesi, kemokinlerin önemli bir özelliğidir. Çoğu kemokin reseptörü birden fazla kemokini tanıyabilmesine karşın, neredeyse tamamı her zaman tek bir kemokin alt sınıfı ile sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle sınıflandırma sisteminde kemokin reseptörlerinin kemokin alt sınıflarına özgüllüğü esas alınmıştır. İnsan CC ve CXC kemokin reseptörleri, sırasıyla CCR ve CXCR olarak isimlendirilmekte ve devamında numaralandırılmaktadır. Lenfotaktin ve fraktalkin reseptörleri, sırasıyla XCR1 ve CX_3CR1 ile kodlanmaktadır. Reseptör isimlerine benzer olarak kemokinler sistein alt sınıflarını esas almakta devamında "Ligand" için bir "L" harfi ve sayı vererek numaralandırılmaktadır (Murphy ve ark. 2000). Çizelge 1.2.'de kemokin reseptörleri ve ligandları özetlendi.

Çizelge 1.2. Kemokin reseptörleri ve ligandları (Murdoch ve Finn 2000).

Reseptör	Ligand
XCR1	Lenfotaktin
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GRO-α, GRO-β, GRO-γ, NAP-2, ENA-78,GCP-2
CXCR3	IP-10, Mig, I-TAC
CXCR4	SDF-1α, SDF-1β
CXCR5	BCA-1
CX3CR1	Fraktalkin
CCR1	RANTES, MIP-1α, HCC-1, MCP-2, MCP-3
CCR2A	MCP-1, MCP-3, MCP-4
CCR2B	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	Eotaksin, Eotaksin-2, Eotaksin-3 RANTES,MCP-2,3,4, MIP-5
CCR4	TARC, MDC
CCR5	RANTES, MIP-1α, MIP-1β, MCP-2
CCR6	MIP-3α
CCR7	MIP-3β, 6C-KİNE
CCR8	I-309
CCR9	TECK
CCR10 (D6)	MCP-1, MCP-3
DARC (Duffy antijen)	IL-8, GRO-α, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-4, Eotaksin

1.4. Monosit Kemoatraktan Protein (MCP)-1

Monosit kemoatraktan protein-1 enflamasyonun başlamasında anahtar role sahip, β kemokin ailesinin üyesi olan bir CC kemokindir. Monositlerin yüzeyindeki CC kemokin reseptör 2 (CCR2) ile etkileşime geçerek monositlerin enflamasyon bölgesine kemotaksisi ve transendotelyal migrasyonunu tetiklemektedir (O'Hayre ve ark. 2008). Fibroblastlar, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, monositler, T hücreleri ve enflamasyon bölgesine hücre girişini sağlayan diğer birçok hücre tipi tarafından sentezlenir (Conti ve DiGioacchino 2001). Ateroskleroz (Shin ve ark. 2002), artrit (Taylor ve ark. 2000) ve kanser (O'Hayre ve ark. 2008) gibi enflamasyona bağlı hastalıklarda birçok doku tarafından eksprese edilmektedir. Makrofajların enflamasyon bölgesindeki dokulara akımı enflamatuvar hastalıkların alevlenmesinden sorumlu tutulmakta ve bu nedenle enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede MCP-1 ekspresyonunun çok sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir (Melgarejo ve ark. 2009).

1.4.1. Yapısı

Monosit kemoatraktan protein-1, farklı O-glikolizasyon sonucunda iki farklı predominant formda (moleküler ağırlığı 9 ve 13 kDa) sentezlenen CC sınıfına ait β kemokindir (Van Coillie ve ark. 1999). Disakkarit galaktoz-β-3D-N asetil galaktozamine "Disaccharide galactose-β-3D-N-acetylgalactosamin" 13 kDa moleküler ağırlığa sahip MCP-1'de bulunurken, 9 kDa moleküler ağırlığa sahip izoformunda bulunmaz. Bununla birlikte glikolizasyondaki bu farklılık, MCP-1'in monosit migrasyon kapasitesini etkilememektedir (Melgarejo ve ark. 2009).

Monosit kemoatraktan proteinlerin amino terminal bölgeleri, biyolojik aktivitelerin belirlenmesinde oldukça kritik öneme sahiptir. Kalıntı olarak tanımlanan "residue" 1-6, kemoatraktan aktivite için gereklidir ve özellikle aspartik asitin yan zincir karboksilik asit motifi olan "Asp-3"ün de anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark. 1996). Aynı zamanda proteinin birinci bölgesindeki aminoasit (aa) pozisyonu sekonder yapının oluşturulmasında ya da MCP'lerin reseptör ile direkt olarak bağlanmasında önemlidir. "Residue" 7-10 ise reseptörün duyarsızlaştırılması "desensitization"'da önemlidir (Melgarejo ve ark. 2009).

Kemokinlerin dimer oluşturmuş şekilleri yapısal olarak korunma eğilimindedir. Genel olarak CC kemokinler N terminal bölgelerinde iki sıkıştırılmış

antiparalel β tabaka oluşumu ile dimerleşirler (Zhang ve ark. 1996). Bunun yanında MCP-1'in CCR2'ye monomerik yapıda bağlanıp aktive ettiğini gösteren çalışmalar da vardır (Paavola ve ark. 1998).

1.4.2. Biyolojik Fonksiyonu

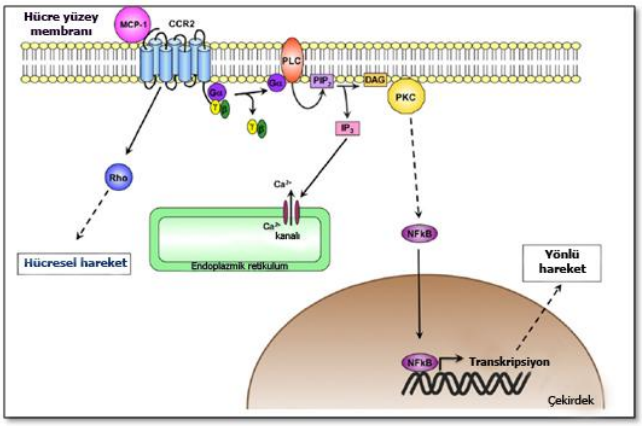
İsminden de anlaşıldığı gibi MCP-1 monositler için güçlü bir kemoatraktandır, aynı zamanda hafıza T hücreleri ve doğal öldürücü "naturel killer" hücreler için de çok önemlidir (Handel ve Domaille 1996). Ayrıca, IL-8 ile birlikte MCP-1'in, damarlarda kan akışı esnasında monositlerin vasküler endotel yüzeye sıkı adezyonunu sağladığı tespit edilmiştir (Gerszten ve ark. 1999). Aslında MCP-1 ekspresyonunun monositlerin vasküler endotel boyunca damar dışına çıkışında "extravasation"da önemli bir aşama olduğu görülmektedir (Weber ve ark. 1999).

Kemokinlerin biyolojik öneminin anlaşılmasında farklı hayvan modelleri kullanılmaktadır. Monosit kemoatraktan protein-1 sentezleyemeyen "knockout" farelerde yapılan çalışmalarda, monositlerin enflamasyon bölgesine gelmesinde sorun olduğu görülmüştür (Van Coillie ve ark. 1999).

Monosit kemoatraktan protein-1'in hem monosit hücre yüzeyinde β_2 integrin ekspresyonunu hem de monositlerin hücre dışı matriks proteinlerine adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda MCP-1, mast hücreleri ve bazofillerce kontrol edilen alerjik reaksiyonlarda da rol oynamakta ve lökotrien sentezi, histamin salınımı ve kemotaksis üzerine etki etmektedir (Van Coillie ve ark. 1999).

Kemokinler hedef hücre yüzeyindeki G protein-bağlı-reseptör ''G protein-coupled-reseptör"'ler ile bağlanarak aktivasyon ve migrasyon etkilerini gösterirler (O'Hayre ve ark. 2008). Bu reseptörler önce aktive olurlar ve böylece inositol trifosfat "inositol triphosphate" oluşumu, hücre içi kalsiyum salınımı ve protein kinaz C aktivasyonu gibi bir takım hücresel reaksiyonların başlamasına neden olurlar. Bu sinyal yolağının aktivasyonu hücrenin yönlü "directional" hareketini düzenlemektedir. Kemokin-reseptör bağlanması, guanozin trifosfat-bağlayıcı proteinler "guanosine triphosphate-binding proteins" olan Rho ailesi proteinlerinin aktivasyonunu da sağlamaktadır. Rho proteinleri, psödopod formasyonu ve membran dalgalanması "ruffling" gibi aktin bağımlı süreçlerin düzenlenmesinde ve hücre hareketinin "motion" sağlanmasında görev alır (Şekil 1.2.), (Melgarejo ve ark. 2009). Monosit kemoatraktan protein-1 hedef hücre yüzeyindeki CCR2 kemokin

reseptörüne bağlanmaktadır. Esas olarak CCR2 monositlerden eksprese olur, bunun T hücrelerinden ekspresyonu sadece onların aktivasyonundan sonra tespit edilebilmektedir (Loetscher ve ark. 1996). Bazı durumlarda CCR2 lipopolisakkaritler tarafından baskılanabilir ve böylece hücre MCP-1'e cevap verememiş olur (Sica ve ark. 1997).



Şekil 1.2. MCP-1'in CCR2 ile etkileşimi sonucunda fosfatidilinositol sinyal yolağının aktivasyonu **PLC**: Fosfolipaz C; **PIP2**: Fosfotidilinositol-bifosfat; **IP_3**: İnositol trifosfat; **DAG**: Diasilgliserol; **PKC**: Protein kinaz C; **NF-kB**: Nüklear faktör-kappa B (Melgarejo ve ark. 2009).

1.4.3. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Enflamatuvar Hastalık

Monosit kemoatraktan protein-1 birçok patolojik durumda önemli role sahiptir. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonları, bakteriyel enfeksiyon, artrit, ateroskleroz ve böbrek rahatsızlıkları gibi monositlerin görev aldığı pek çok enflamatuvar hastalıkta MCP-1 anahtar rol oynamaktadır (Van Coillie ve ark. 1999). Bazı çalışmalar miyokard enfarktüsü "myokardial infarction" (MI) sonrası ilk 24 saatte serum MCP-1 seviyesinin arttığını, aynı zamanda akciğer hasarı, karaciğer ve böbrek iskemilerinde de MCP-1 ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Shin ve ark. 2002).

Romatoid artrit, osteoartrit, gut ve travmatik artrit gibi artrit hastalarının sinoviyum ve sinoviyal sıvılarında MCP-1 düzeyi artmaktadır (Melgarejo ve ark. 2009). Ayrıca, monosit ve T lenfositleri gibi enflamatuvar hücrelerin migrasyonunu sağlayarak aterosklerozun patogenezinde yer almaktadır. Otoimmun hastalıklarda da MCP'lerin makrofaj ve lenfositlerin artışındaki rolü gösterilmiştir (Van Coillie ve ark. 1999).

Pek çok çalışmada MCP-1'in gliyom, ovaryum, meme ve özafagus kanserleri de dahil bir çok tümörde oldukça yüksek düzeyde eksprese edildiği tespit edilmiştir.

Ayrıca, tümör hücrelerinde MCP-1'in ekspresyonunun makrofaj infiltrasyonu ve tümör vaskülarizasyonu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bazı araştırıcılar MCP-1'in tümör neovaskülarizasyonu, hastalığın erken tekrarlaması ve tümör ilerlemesiyle ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir (O'Hayre ve ark. 2008).

Monosit kemoatraktan protein-1'in anjiyogenezle de ilişkisi vardır; ya doğrudan ya da vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleri ve anjiyogenik faktörler salan tümörlerle ilişkili-makrofajlar gibi dolaylı yollardan da anjiyogenezi arttırabilir. Son zamanlarda MCP-1'in sadece insan periferal kan mononükleer hücreleri "peripheral blood mononuclear cells" (PBMC)'sinde değil endotelyal hücrelerde de MCP-1'in uyardığı protein "MCP-1-induced protein"i (MCPIP) arttırdığı ve bu transkripsiyon faktörünün MCP-1 tarafından başlatılan anjiyogeneze aracılık ettiği gösterilmiştir (O'Hayre ve ark. 2008). İnsan kordon kanı endotelyal hücrelerindeki MCPIP ekspresyonu hücre proliferasyonu ve migrasyonunu teşvik ettiği ve VEGF'yi indükleyebildiği bildirilmiştir (Melgarejo ve ark. 2009).

1.4.4. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Kronik Periodontitis

Periodontitis bakteriyel patojenler tarafından başlatılan, lokal immun yanıtların sorumlu olduğu, dişlerin ve çevre dokuların kaybı ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır (Kinane ve ark. 2001). Konak cevabında bakteriyel atağa karşı MCP-1 düzeyinin artış gösterdiği ve bu artışın lipopolisakkaritler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi enflamatuvar cevabın artışı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (Navratilova 2006).

Yapılan çalışmalar MCP-1 miktarının periodontitisli bireylerde periodontal olarak sağlıklı bireylere göre DOS'da (Lee ve ark. 2003a, Kurtis ve ark. 2005, Pradeep ve ark. 2009a, Thunell ve ark. 2010, Tymkiw ve ark. 2011, Gupta ve ark. 2013), hastalıklı gingival dokularda (Yu ve ark. 1993, Yu ve Graves 1995, Gemmell ve ark. 2001, Garlet ve ark. 2003) ve serumda (Pradeep ve ark. 2009b, Anil ve ark. 2013, Gupta ve ark. 2013) arttığını göstermektedir. Diğer taraftan, Silva ve ark. (2008) hastalığın aktif olduğu bölgelerdeki DOS RANKL, IL-1β ve *P.gingivalis* düzeylerinin inaktif olan bölgelere göre daha fazla olduğunu, ancak MCP-1 miktarının her iki bölgede de önemli değişim göstermediğini rapor etmiştir.

1.4.5. Monosit Kemoatraktan Protein-1 ve Agresif Periodontitis

Agresif periodontitis (AP), ergen ve genç erişkin dönemindeki sistemik olarak sağlıklı bireyleri etkileyen periodontal dokuların hızlı kaybı ile karakterize bir hastalıktır ve periodontal hastalıkların heterojen bir grubunu oluşturur (Armitage 1999). Genel popülasyonda az bir oranda görülmesine rağmen (%0.1-5) (Albandar ve Tinoco 2002), hastalığın etiyoloji ve patogenezinin anlaşılmasını amaçlayan çalışmalar üzerine büyük ilgi duyulmaktadır. Literatürde periodontal hastalıkların agresif formlarının patogenezinde önemli olan risk faktörleri, patojenik oral biyofilm (Albandar ve ark. 1997), konak savunmasının hücresel fonksiyonlarındaki değişiklikler (Emingil ve ark. 2001c, Takahashi ve ark. 2001) sitokin-enflamatuvar belirteç "mediatör" düzeyinlerindeki düzensizlikler (Shapira ve ark. 1994, Emingil ve ark. 2001a, Emingil ve ark. 2001b) ve spesifik genetik risk faktörleri (Parkhill ve ark. 2000) olarak özetlenmiştir (Emingil ve ark. 2004).

Monosit kemoatraktan protein-1 monositlerin dişeti oluğuna selektif migrasyonu ve temininde kritik öneme sahiptir (Yu ve Graves 1995). Aktive olmuş monosit/makrofajlar, fazla miktarda monositlerin enflamasyon bölgesine toplanması için MCP-1 eksprese ederler. Spesifik makrofaj fenotipi enflamasyona ilave olarak, doku yenilenmesi "turnover" esnasında yıkım "degeneratif" ve yapım "reperatif" süreçlerinde rol oynamaktadır (Kreutz ve ark. 1992). Enflamasyon alanı ile özdeşleşmiş enflamatuvar makrofaj fenotipi birçok fonksiyona sahiptir (Sorg 1991). Bakteriyel uyarılar sonucu aktive olan monosit/makrofajlar çok çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri salgılarlar ve antijen sunan hücreler gibi fonksiyon görerek invaze olan bakterilerin fagositozunu sağlarlar (Page 1991, Kornman ve ark. 1997). Monosit fonksiyonlarının bireylerin periodontal hastalığa yatkınlığının arttırılmasında önemli olabileceği ilk defa Garrison ve Nichols (1989) tarafından ortaya atılmış ve hiperenflamatuvar monosit fenotipinin "hyperinflammatory monocyte phenotype" AP için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir.

Agresif periodontitis hastalarında MCP-1 miktarının dişeti oluğu sıvısında değerlendirildiği çalışmalarda MCP-1 miktarlarının AP hastalarında periodontal olarak sağlıklı kontrollere göre fazla olduğu, sondlanabilir sulkus derinliği ve klinik ataşman kaybı ile pozitif ilişki gösterdiği saptanmıştır (Emingil ve ark. 2004, Kurtis ve ark. 2005). Zhu ve ark. (2011) generalize agresif periodontitis hastalarında plazma

MCP-1 miktarının sağlıklı kontrollere göre fazla olduğunu ancak sondlanabilir sulkus derinliği ve klinik ataşman kaybı ile ilişkili olmadığını rapor etmişlerdir.

1.5. CC Kemokin Reseptör 2 (CCR2)

CCR2 bir CC kemokin reseptörüdür ve CCL2, CCL7, CCL8 ve CCL13 ligandlarına ilgi "afinite" gösterir. Bu reseptör başlıca hafıza T lenfositleri, monositler, dendritik hücreler, B hücreleri ve bazofiller tarafından eksprese edilir. Nötrofiller de ancak spesifik koşullar altında CCR2 eksprese ederler (Yoshie ve ark. 1997, Murphy ve ark. 2000).

CCR2'nin CCR2A (360 aa) ve CCR2B (374 aa) olmak üzere sadece iki izoformu vardır ve bunlar terminal karboksil kuyruğundaki farkla birbirinden ayrılırlar. Bu karboksil kuyruğunda yer alan aa dizilimi CCR2B'nin hücre yüzeyine taşınmasını sağlar, oysa ki CCR2A'nın büyük kısmı sitoplazmada yerleşmiştir. CCR2B monositlerdeki baskın izoformdur ve CCR2A ve CCR2B düzeyleri monositlerin makrofajlara farklılaşmasıyla azalmaktadır (Navratilova 2006).

1.5.1. CC Kemokin Reseptör 2 ve Enflamatuvar Hastalık

Fagositik hücre trafiği, hastalıklara karşı konak cevabının vazgeçilmez bir bileşenidir. Bu lökosit trafiğine CCR2'nin önemli katkı sağladığı ve hücre içi patojenlerin kontrol edilmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Charo ve Peters 2003). Multiple skleroz (Nakajima ve ark. 2007), artrit (Cho ve ark. 2007), akciğer (Shen ve ark. 2011), böbrek (Awad ve ark. 2011) ve karaciğer rahatsızlıkları (Heymann ve ark. 2009) gibi birçok hastalıkta CCR2 ekspresyon düzeyinin monosit/makrofaj sayısındaki artışa paralellik gösterdiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda CCR2'nin akciğer (Osterholzer ve ark. 2011), göğüs (Lu ve Kang 2009), ovaryum (Sica ve ark. 2000) ve prostat (Lu ve ark. 2007) kanseri de dahil pek çok tümördeki ekspresyon düzeyindeki artışının hastalık patolojisi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Enflamatuvar şartlarda CCR2 ekspresyonunun mikrosirkülasyonda damar yenilenmesi "remodeling" üzerinde oldukça etkili olduğu hipotezinden yola çıkarak yapılan deneysel bir çalışmada ise CCR2 eksprese edemeyen farelerde arteriollerde damar yenilenmesinin gerçekleşmediği rapor edilmiştir (Meisner ve ark. 2012).

Son zamanlarda monosit migrasyonunun baskılanması amacıyla CCR2 antagonistlerinin kullanılabileceği ve ateroskleroz (Olzinski ve ark. 2010), ağrı (Jung ve ark. 2009), otoimmun (Wang ve ark. 2009) ve metabolik (Weisberg ve ark. 2006)

hastalık gibi birçok medikal rahatsızlıkların tedavisinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Farelerde yapılan deneysel araştırmalarda CCR2 antagonistlerinin ateroskleroz (Okamoto ve ark. 2012), romatoid artrit (Brodmerkel ve ark. 2005) ve metabolik hastalıkların (Kang ve ark. 2011) önlenmesinde başarılı olduğu gösterilmesine karşın, insanlarda sistemik olarak CCR2 antagonisterinin tek başına kullanımının bu hastalıkların tedavisinde herhangi bir faydası tespit edilememiştir (Pease ve Horuk 2009, Xia ve Sui 2009, Kang ve ark. 2011). Bu sonuç CCR2 reseptörlerinin %100 bloke edilememesiyle ve/veya polikemokin reseptörlerinin (CCR1 ve CCR5) de baskılanmasının gerekliliği ile açıklanabilmektedir (Vergunst ve ark. 2008).

1.5.2. CC Kemokin Reseptör 2 ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık, şüpheli periodontopatojenler ve konak immun cevabı arasındaki dengenin bozulması ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın gelişiminde konak savunma hücrelerinin enflamasyon alanına yönlendirilmesinde çeşitli kemokin ve kemokin reseptörleri önemli rol oynamaktadır (Noda ve ark. 2007).

Venza ve ark. (2010) tip 2 diyabet ile ilişkili metabolik değişikliklerin periodontal olarak hastalıklı dokularda proenflamatuvar sitokin ve kemokin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada periodontitis teşhisi konulmuş sistemik olarak sağlıklı ve diyabetik hastalarda dişeti dokusu CCR2 düzeyleri arasında farklılık olmadığı; ancak her iki gruptaki değerlerin sağlıklı kontrollerden daha yüksek miktarda bulunduğu rapor edilmiştir. Metabolik/glisemik durumdan bağımsız olarak enflamatuvar doku yıkımında CCR2'nin önemli olabileceği gösterilmiştir.

Literatürde CCR2 antagonistlerinin periodontitis tedavisinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada *P. gingivalis* enjeksiyonu ile periodontitis oluşturulduktan sonra topikal CCR2 antagonisti uygulamasının alveolar kemik kaybını azalttığı ve yeni kemik oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (Barros ve ark. 2011).

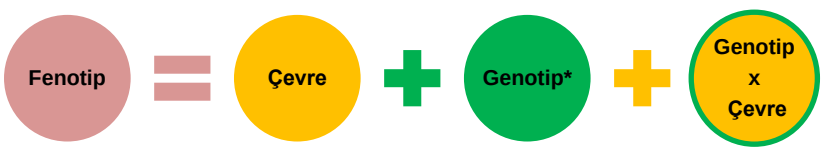
1.6. Hastalıkların Genetik Temelleri

Deoksiribonükleik asit (DNA) beş karbonlu şeker (Deoksiriboz), azot taşıyan bir baz ve fosfat grubundan oluşan bir nükleik asit molekülüdür ve anatomik

yapısında nesilden nesile aktarılan genetik bilgiyi taşımaktadır. DNA'nın yapısında iki "pürin bazı" Adenin (A) Guanin (G), ve iki "pirimidin bazı" Timin (T) Sitozin (C) vardır. Bir baz, bir fosfat ve bir şeker grubundan oluşan nükleotidler, komşu deoksiriboz birimleri arasında oluşan 5'-3' fosfodiester bağları ile uzun polinükleotid zincirleri oluştururlar. İnsan genomundaki bu polinükleotid zincirlerin boyutları yaklaşık olarak 50 milyon baz çifti ile 250 milyon baz çifti arasında değişmektedir (Nussbaum ve ark. 2005b).

Kromozomlar üzerindeki spesifik bir lokasyon "lokus", lokus üzerindeki nükleotid dizilimlerindeki farklılıklar ise "allel" olarak tanımlanmaktadır. Birey homozigot ise homolog kromozomlar üzerindeki alleller aynı, birey heterozigot ise alleller farklılık göstermektedir. Özellikler ve hastalıklar tek bir gen ile ilişkili ise "monojenik", farklı genler ile ilişkili olursa "oligojenik" birçok gen ile ilişkili olursa "polijenik" olarak isimlendirilmektedir (Michalowicz ve Pihlstrom 2009). Organizmaların genetik kompozisyonuna "genotip", genotipin morfolojik, klinik, biyokimyasal veya moleküler özellik olarak gözlenebilen ekskpresyonuna da "fenotip" denmektedir (Nussbaum ve ark. 2005d).

Genetik çeşitlilik ve çevresel faktörler bireyler arasındaki fenotipik farklılıkların anahtar belirleyicileridir. Çevresel etkenlerle birlikte ya da sadece genetik faktörlerin etkisi ile patolojik değişimler görülebilir. Genetik yapıdan bağımsız olarak yüksek dozda radyasyona maruz kalınması gibi çevresel koşullardaki değişimle birlikte patolojiler ortaya çıkabilir. Trizomi kromozom 1'deki gibi spesifik kromozomların normalden farklılaşması durumunda da çevresel faktörlerden bağımsız olarak genetik bozukluk çoklu sistem patolojilerine sebep olmaktadır. Bununla birlikte pek çok hastalık için bir toplumdaki bireyler hastalıklara farklı oranlarda yatkınlık göstermektedir ve bu farklılık sadece genetik faktörlerden kaynaklanabileceği gibi çevresel ve genetik faktörlerin her ikisinin etkileri ile de olmaktadır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Fenotip, çevre ve genotip arasındaki klasik ilişki
Periodontal hastalık için çevresel risk faktörleri: sigara, plak kontrolü, sosyoekonomik durum, diyabet vb. Genotip x Çevre: genetik ve çevre arasındaki etkileşim, *gen-gen etkileşimi (Kinane ve Hart 2003).

İnsanlarda görülen pek çok hastalığın etiyolojisinde genetik bileşenler bulunmakta bununla birlikte genetik bileşenin hastalığa olan katkısı farklı hastalıklarda çok çeşitlilik gösterebilmektedir. Hastalıkların genetik bileşenlerinin belirlenmesinde hangi genetik faktörlerin ne oranda katkısının olduğu hastalıkların genetik etiyolojisinin saptanmasında ve hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli olmaktadır. Genetik bilimi ile uğraşan uzmanlar genetik hastalıkları "basit Mendel hastalıkları" ve "kompleks hastalıklar" olmak üzere ikiye ayırmaktadırlar. Bu gruplar arasındaki temel farklılık hastalıkların kalıtsal özelliği ile ilgilidir (Kinane ve Hart 2003).

1.6.1. Basit Mendel Kalıtımı Hastalıkları

Tahmin edilebilir ve genel olarak basit kalıtım gösteren hastalıklara "Mendel" hastalıkları denmektedir. İsminden anlaşıldığı gibi bu hastalıklar ailesel geçisi takip edilebilen basit kalıtım gösteren ve çoğu olguda klinik olarak hastalık fenotipinin ortaya çıkmasında tek bir gen lokususunun büyük oranda belirleyici olduğu hastalıklardır. Bu hastalıklar otozomal dominant, otozomal resesif veya X kromozomuna bağlı klasik Mendelyan kalıtım göstermektedirler. Genellikle bir takım popülasyonlar haricinde görülme sıklıkları %0.1 den daha az olan, nadir görülen hastalıklardır. Bir Mendel hastalığının genetik temeli aydınlatıldığında hastalığın çoğunlukla tek bir gen lokusundaki mutasyon etkisi ile ortaya çıktığı görülmektedir. Hastalık fenotipi geniş bir çevresel ortam etkisi ile ortaya çıkabilmekte, çevresel faktörler ve diğer genler de etki edebilmesine rağmen çoğu olguda bu faktörler dikkate değer biçimde birbirine çok benzer fenotip ortaya koyabilmektedirler. Bu hastalıklara "Amelogenesis imperfekta", "Crouson sendromu", "Cleidocranial dysplasia" örnek gösterilebilir (Kinane ve Hart 2003).

1.6.2. Kompleks Genetik Hastalıklar

Genetik olarak kompleks hastalıklar basit Mendel hastalıklarından birkaç önemli noktada farklılık göstermektedir. Kompleks hastalıklar daha yaygın görülmekte ve genel olarak toplumda %1'den daha fazla sıklıkta ortaya çıkmaktadır. Klasik bir ailesel dağılım ya da geçiş göstermezler. Tek bir genin neden olduğu basit geçiş gösteren hastalıkların aksine birçok farklı gen lokusunun etkileşimi sonucu ortaya çıkarlar. Buna ek olarak, çevresel faktörler hastalık sürecinde önemli olmaktadır. Basit kalıtım gösteren Mendel hastalıklarına neden olan tek bir gen

lokusundaki nadir mutasyonların aksine, kompleks genetik hastalıkların etiyolojisinde önemli olan genetik farklılıklar toplumda yaygın olarak görülmektedir ve hastalıklı bireylerin yanı sıra hastalıktan etkilenmeyen bireylerde de tespit edilebilmektedir. Aynı zamanda basit kalıtım gösteren hastalıklarda ilgili genin ürettiği proteinin fonksiyonunda önemli değişikliklere sebep olan hatta ürünün üretimini ortadan kaldıran mutasyonların aksine, genetik farklılıkların önemli olduğu kompleks hastalıklarda meydana gelen mutasyonların etkileri daha az zararlı olmakta ve genellikle normal biyolojik fonksiyonları devam edebilmektedir (Kinane ve Hart 2003).

Hastalık ile ilgili olan genetik farklılıkların kompleks genetik hastalıklarda kendi başına hastalığı oluşturabilecek kapasitede olmadığının bilinmesi gereklidir. Bu nedenle hastalıkla ilişkili bir allelin tespit edilmiş olması klinik olarak hastalığın ortaya çıkması için yeterli değildir. Sonuç olarak bir bireyde hastalıkla ilişkili bir allelin bulunuyor olması klinik olarak hastalığın teşhis edilmesi için yeterli bilgi sağlamamaktadır. Aslında bazı hastalıkla ilişkili allellerin toplumda hastalıktan etkilenmeyen pek çok kişide de önemli oranda bulunması, bu allelerin risk belirtmesine karşın çoğu olguda hastalık belirleyicisi olarak kullanılamayacağını göstermektedir. Basit Mendel hastalıklarında teşhis amaçlı kullanılan genetik mutasyonların aksine kompleks hastalıklarda genetik polimorfizmin bulunması yorumlaması zor bir durumdur ve hastalıkla ilgili diğer bilgilerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Araştırmanın yapıldığı toplumdaki allel frekansı hakkında bilgi sahibi olunması aynı zamanda hastalıkla ilişkili allelin hastalık sürecindeki etkisinin bilinmesi önemlidir. Bu nedenle hastalığın önceden tahmin edilmesinde hastalıkla ilişkili allele ait özgüllük "specificity" ve duyarlılık "sensitivity" değerlendirmelerinin yapılması gerekmektedir (Kinane ve Hart 2003).

1.6.3. Polimorfizm ve Mutasyon

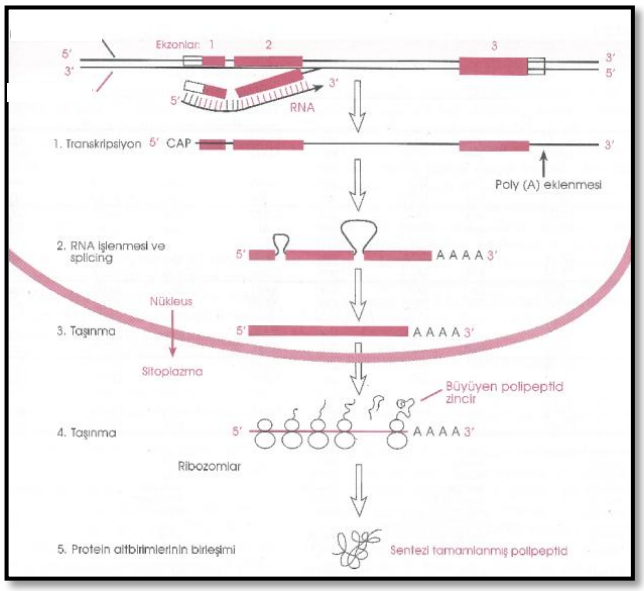
Basit Mendel hastalıkları ile kompleks genetik hastalıklar arasındaki en önemli farklardan bir tanesi hastalıktan sorumlu genlerin sayısı ve her bir genin hastalık fenotipine olan etkisidir. Mendel hastalıklarında tek bir gen lokusundaki değişim önemli fizyolojik etkiye sahip olan mutasyon ile sonuçlanmakta ve bu yüzden hastalığın belirleyicisi olarak kabul edilebilmektedir. Hastalık fenotipi ile ilişkili genetik değişimin önceden tahmin edilmesi, biyolojik sistemde genetik defektin etkisinin üstesinden gelebilecek bir kompanzasyon olmadığını

göstermektedir. Genetik bilimi uzmanları bu genetik farklılıkları "mutasyon" olarak adlandırmaktadırlar. Diğer genlerdeki allelik farklılıklar kadar çevresel faktörler de klinik olarak bazı hastalıkların ortaya çıkmasında etkili olmaktadır. Kompleks hastalıkların ortaya çıkmasında etkisi olan bu tür genetik farklılıklar ise "genetik polimorfizmler" olarak isimlendirilmektedir. Mutasyonlardan farklı olarak polimorfizmler hastalık ile doğrudan ilişkili değildir; ancak hastalıkla ilişkili spesifik allelerin hastalıktan etkilenenlerde sağlıklı bireylere göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Monojenik hastalıkların aksine genetik polimorfizmlerin, hastalık fenotipinin ortaya çıkması için farklı birçok genin katkısının gerekli olduğu hastalık sürecinin küçük bir kısmında payı vardır. Birçok kronik hastalıklar ileriki yaşlarda ortaya çıkmakta ve gelişmeleri için uzun yıllar gerekmektedir. Kazanılmış/Doğuştan gelen immun cevabı ve enflamasyonu etkileyen genetik faktörler de hastalık patogenezine dahil olmaktadır. Bu fizyolojik ve biyolojik yolakların pek çok dengeleyici durumları bulunmaktadır ve bu yüzden tek bir genetik varyasyonun hastalık üzerinde ne derece etkili olduğunun belirlenmesi çok kolay değildir. Sonuç olarak bir bireyde hastalıkla ilişkili polimorfizm bulunuyorsa bunun klinik öneminin anlaşılması zor olmaktadır. (Kinane ve Hart 2003). Ancak, polimorfizmlerin önemli bir genetik belirteç olduğu ve fenotipik değişiklikler ile DNA dizilim farklılıkları arasında ilişki kurarak kompleks hastalıkların patogenezinin araştırılmasında yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Laine ve ark. 2012).

1.6.4. Gen Ekspresyonunun Temelleri

Genetik bilgiyi taşıyan DNA hücre çekirdeği içerisindeki kromozomlarda bulunur. Protein sentezi ise DNA'da kodlanan bilgi kullanılarak sitoplazmada yapılmaktadır. DNA'daki genetik bilgi "genetik kod" aracılığı ile saklanır ve bu kodlar polipeptidlerin aminoasit dizilerini belirleyen birbirine komşu olan baz dizileridir. Esas olarak bir polipeptid zincirindeki aminoasit dizisinin kodonu ve ekspresyonda gerekli olan regülatör dizileri taşıyan bir DNA parçası "gen" olarak isimlendirilir. Ancak insan genomundaki genlerin çoğu kesintiye uğrar ve araya giren bu dizilere "intron" denir. İntronlar, ekzon denilen ve proteinin aminoasit dizisini kodlayan dizilerle ard arda yer alırlar. En basit tanımlamaya göre gen fonksiyonel bir ürün oluşturmak için gerekli olan kromozomal bir DNA dizisi olarak ele alınmaktadır. Bu ürün polipeptid veya fonksiyonel RNA molekülü olabilir (Nussbaum ve ark. 2005b). Genden protein sentezi ile sonuçlanan sürece "gen

ekspresyonu" denir ve temel olarak bu durum iki aşamadan oluşur: İlk aşama transkripsiyon "transcription" olarak tanımlanır ve DNA kalıbı üzerinden tek iplikçiğin bir kopyası olan mesajcı "messenger" RNA (mRNA)'nın sentezlenmesi aşamasıdır. İkinci aşama ise mRNA'dan protein sentezi ile gerçekleşir ve translasyon "translation" olarak isimlendirilir. DNA'dan RNA'ya bilgi akışı moleküler biyolojinin "santral dogması" olarak isimlendirilmektedir (Lewin 2004). Bir genin transkripsiyonu kodlayan dizinin 5' ucundaki transkripsiyon başlangıç bölgesi ile başlar ve kromozomda ekzon ve intronlar boyunca kodlayan dizilerin sonuna kadar bir kaç yüz baz çiftinden bir milyondan fazla baz çiftine kadar devam eder. Birincil RNA transkripti, 5' ucuna kimyasal bir başlık "cap" yapısı eklenmesi, kodlayan bölgenin sonundaki belirli bir noktadan 3' ucunun kesilmesi ve devamında 3' ucuna poliA kuyruğunun eklenmesi ile oluşturulur. Birincil RNA transkriptinin 5' ve 3' bölgelerinin ve introna karşılık gelen kısımların çıkartılmasından sonra ekzona karşılık gelen kısımlar "RNA splicing" olarak adlandırılan işlemle birleştirilir. Tamamen işlenmiş olan bu RNA mRNA olarak adlandırılır ve kodlanmış bilgiyi taşıyan mRNA çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Burada proteindeki aminoasit dizisini belirlemek üzere translasyona uğrar ve her biri ayrı bir aminoasite özgül olan farklı transfer RNA (tRNA) molekülleri ile proteine çevrilir (Şekil 1.4.). Bu karmaşık işlemlerin her bir evresi hataya açıktır ve bu aşamaları etkileyen değişimler bazı kalıtsal hastalıklara neden olmaktadır (Nussbaum ve ark. 2005b).

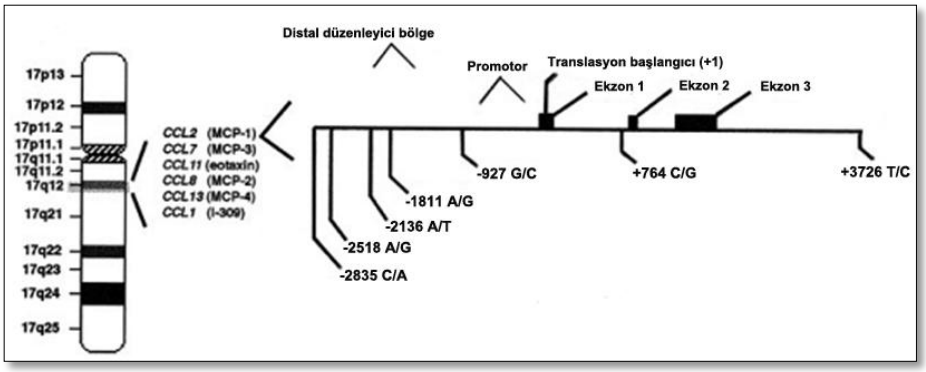


Şekil 1.4. Transkripsiyon, RNA işlenmesi ve translasyon aşamaları (Nussbaum ve ark. 2005b).

1.7. MCP-1 Geni, Polimorfizmi ve Ekspresyonu

1.7.1. MCP-1 Gen Lokalizasyonu ve Gen Polimorfizmleri

Monosit kemoatraktan protein-1 kromozom 17q11 ile belirlenmiş CCL2 ile kodlanmış uyarılabilen bir gendir (Boekhoudt ve ark. 2003). Mehrabian ve ark. (1991) hücre içi hibridizasyon *in situ* "hybridization" yöntemi ile genin 17q11.2-q21.1 üzerinde lokalize olduğunu göstermişlerdir. Rollins ve ark. (1991) ise *in situ* hibridizasyon ve somatik hücre hibrit "somatic cell hybrids" çalışmalarının bir kombinasyonu ile genin 17q11.2-q12 lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında CCL2'nin sitokin ailesine mensup olduğunu, yapı ve kromozomal lokalizasyonuna göre 17q ve 4q olmak üzere iki alt grupta değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir.



Şekil1.5. CCL2 (MCP-1) geninin kromozomdaki yeri ve yapısı (McDermott ve ark. 2005).

Günümüze kadar MCP-1 polimorfizmi ile hastalık şiddeti ve hastalığa yatkınlık arasında ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda yedi polimorfizm üzerinde durulmuştur. Bunlardan dört tanesi MCP-1 geninin distal düzenleyici "distal regulatory" bölgesinde (-1811 A/G, -2136 A/T, -2518 A/G, -2835 C/A), bir tanesi promotor "promoter" bölgesinde (-927 G/C), bir tanesi birinci intron "intron" bölgesinde (764 C/G), bir tanesi de 3' komşu "3'flanking" bölgesinde (3726 T/C) yer almaktadır (Şekil 1.5.). CCL2 geni üzerindeki sözü geçen tek nükleotid polimorfizmi "single nucleotide polymorphism" (SNP) içinden dört tanesinin (-2136*T, -2518*G, -2835*A, 764*G) artmış MCP-1 proteini ile ilişkili olduğu bulunmuştur (McDermott ve ark. 2005). Literatürde yapılan çok sayıda çalışma hastalık patofizyolojisi ile MCP-1 -2518 SNP arasındaki ilişki üzerine yoğunlaşmıştır (Navratilova 2006).

MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi ve enflamatuvar hastalık

Monosit kemoatraktan protein-1'in ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir; kan akımında dolaşan monositlerin damar duvarına yönlendirilmesi ile erken aterosklerotik lezyonların ayırıcı özelliği olan köpük hücreler "foam cells" ve yağlı çizgiler "fatty streaks"'in oluşumunda etkili olduğu ileri sürülmektedir. Buna ilave olarak CCL2 ilerlemiş aterosklerotik lezyonlardaki trombotik durumu düzenleyebilir ve böylece aterosklerozun geç komplikasyonu olan MI ve inme gelişebilir. CCL2 ekspresyonu insan aterosklerotik plaklarında artış göstermektedir ve bu artışı düzenleyen genetik faktörlerin ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili hastalıklardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Charo ve Taubman 2004). Literatürde bu konuda yapılan çok sayıda çalışma vardır ve farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Koroner arter hastalığı (Szalai ve ark. 2001a), MI (McDermott ve ark. 2005), inme (Flex ve ark. 2004) ve iskemik kalp hastalığı (Buraczynska ve ark. 2010) gibi hastalıklarda MCP-1 -2518 homozigot G allel frekansının sağlıklı kontrollerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan MCP-1 -2518 SNP'nin iskemik kalp hastalığını etkilemediği (Simeoni ve ark. 2004, Bjarnadottir ve ark. 2006, Giannakopoulou ve ark. 2013), hatta MCP-1 -2518 G allel taşıyıcığının azalmış karotid intima kalınlığı ile ilişkili olduğu ve hastalıktan koruyucu bir etkisi olabileceği rapor edilmiştir (Brenner ve ark. 2006).

Monosit kemoatraktan protein-1 -2518A/G polimorfizminin, spesifik insan lökosit antijen "human leukocyte antigen" (HLA) epitop yokluğu olan hastalarda romatoid artrite yatkınlığı arttırabileceği ve bu polimorfizmin hastalık için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Gonzalez-Escribano ve ark. 2003). Hastalar HLA durumlarına göre sınıflandırılmadığında MCP-1 -2518A/G polimorfizm dağılımının sağlıklı ve romatoid artritli hastalarda benzer olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2003b). Özyürek ve ark (2007) MCP-1 polimorfizmin genotip ve allel frekansının juvenil romatoid artrit hastaları ile sağlıklı kontrollerin benzer olduğunu ancak "AG" genotipinin sistemik tip juvenil romatoid artritli bireylerde daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Astım (Szalai ve ark. 2001b), HIV enfeksiyonu (Gonzalez ve ark. 2002), sistemik lupus eritamatozus (Tucci ve ark. 2004) ve sistemik sklerosis (Karrer ve ark. 2005), tümör metastazı (Ghilardi ve ark. 2005), hepatit C (Muhlbauer ve ark. 2003)

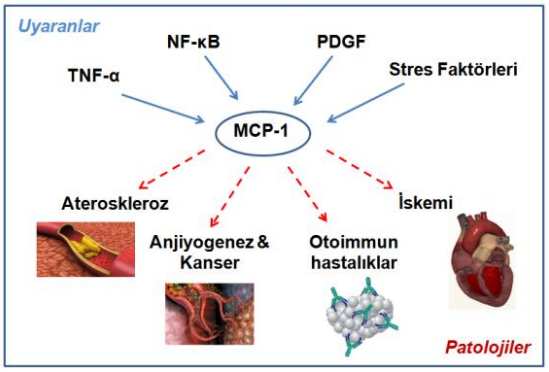
ve Alzheimer hastalığı (Pola ve ark. 2004) gibi pek çok hastalık ile MCP-1 -2518 A/G SNP arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi ve periodontal hastalık

Zhu ve ark. (2011) generalize agresif periodontitis hastaları ile MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığını ancak "G allel" frekansının GAP kadın hastalarında anlamlı derecede daha az olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca AA genotipine sahip kadın hastaların sondlama cep derinliğinin G^+ genotipe sahip kadın bireylerden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

1.7.2. MCP-1 Gen Ekspresyonu

Monosit kemoatraktan protein-1 ekspresyonu TNF-α, IFN-γ, trombosit kaynaklı büyüme faktörü "platelet-derived growth factor" (PDGF) ve stres faktörleri gibi uyaranlar tarafından transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir (Şekil 1.6.). Ancak, retinoik asit, glukokortikoidler ve östrojenin MCP-1 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Kumar ve Boss 2000). Bütün bu uyaranların yanında proenflamatuvar NF-kB transkripsiyon faktörü MCP-1 için anahtar belirteçdir. Aslında NF-κB; TNF-α, IL-1, okside olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein "oxidized low density lipoprotein" (ox-LDL) ve homosistein gibi birçok patojenik uyaran tarafından hızlı bir şekilde aktive edilebilir (Sung ve ark. 2002). Ayrıca reaktif oksijen türleri NF-kB ve aktivatör protein -1 (AP-1) dahil bazı önemli transkripsiyon faktörleri için sinyal taşıyıcısı "transdüksiyon" mesajcısı olarak görev yaparlar. Ek olarak Anjiyotensin II ve Anjiyotensin III, NF-kB aktivasyonuna bağlı bir mekanizma tarafından mononükleer hücreler ve mezenşiyal hücrelerdeki MCP-1 ekspresyonunu arttırır (Ruiz-Ortega ve ark. 2000, Melgarejo ve ark. 2009).



Şekil 1.6. MCP-1 transkripsiyonunu uyaran faktörler ve artmış MCP-1 ekspresyonu ile ilişkili olan patolojiler (Melgarejo ve ark. 2009).

Tüm bu düzenleyici özellikler MCP-1 geninin promotor bölgesinin yapısı ve içeriği ile ilişkilidir (Boekhoudt ve ark. 2003). Genin promotor bölgesinin distal kısmı iki NF-κB bağlayan alan içerir (κB-1 ve κ-B2) ve bu kısım dimetil sülfat hipersensitif "dimethylsulfate hypersensitive" (HS) bölge ile çevrelenmiştir. Her iki κB ve HS bölgesi MCP-1'in TNF tarafından düzenlenmesi "regülasyonu" için gereklidir. Proksimal düzenleyici bölge PDGF ve IFN-γ uyarımı için yeterli iken, TNF uyarımı için gereklidir (Melgarejo ve ark. 2009).

MCP-1 gen ekspresyonu ve enflamatuvar hastalık

Günümüze kadar yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ateroskleroz (Lutgens ve ark. 2005, Wara ve ark. 2008), koroner arter hastalığı (de Oliveira ve ark. 2009, Jia ve ark. 2012), hipertansiyon (Tucci ve ark. 2006), artrit (Cagnard ve ark. 2005, Adarichev ve ark. 2006), osteoartrit (Levinger ve ark. 2011, Liu ve ark. 2013), alerjik hastalıklar (Santos ve ark. 2012), HIV enfeksiyonu (Renga ve ark. 2012), diyabetik nefropati (Zheng ve ark. 2012), obezite (Vaziri ve ark. 2005, Tourniaire ve ark. 2013), akut böbrek hasarı (Munshi ve ark. 2011) ve göğüs kanseri (Razmkhah ve ark. 2012) gibi pek çok hastalık ve durumda MCP-1'in mRNA düzeyinde gen ekspresyonunun arttığı ve hastalık patogenezinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.

MCP-1 gen ekspresyonu ve periodontal hastalık

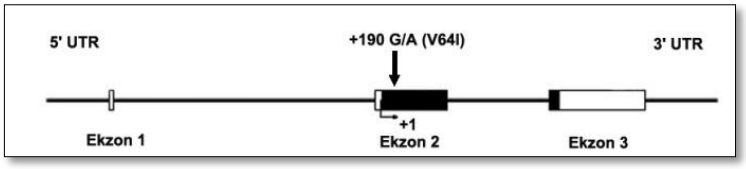
Periodontal patojenlere karşı konağın lokal immun cevabı periodontal enfeksiyondan korunmada belirleyici olmanın yanında konakta meydana gelen patolojik değişikliklerden de sorumlu olmaktadır. Periodontal dokulara farklı tipte hücre akımınındaki önemli rollerinden dolayı kemokin ve kemokin reseptörlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyonları agresif ve kronik periodontitis hastalarında değerlendirilmektedir (Garlet ve ark. 2003). Günümüze kadar "Real-Time Polimerase Chain Reaction" (RT-PCR) yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda *P.gingivalis* ile muamele edilmiş oral epitel hücrelerinde (Milward ve ark. 2007), gingival ve periodontal ligament fibroblastlarında (Scheres ve ark. 2010), kronik periodontitis hastalarının gingival doku örneklerinde (Garlet ve ark. 2003, Venza ve ark. 2010) MCP-1 m-RNA ekspresyonunun enflamasyon şiddeti ile orantılı olarak artış gösterdiği bildirilmiştir. MCP-1 ekspresyonunun *in-situ* hibridizasyon yöntemi

ile değerlendirildiği çalışmalarda da enflamasyonlu dişetinin sağlıklı kontrollere göre daha fazla düzeyde olduğu rapor edilmştir (Yu ve ark. 1993, Tonetti ve ark. 1994).

1.8. CCR2 Geni, Polimorfizmi ve Ekspresyonu

1.8.1. CCR2 Gen Lokalizasyonu ve Gen Polimorfizmleri

CC kemokin reseptör 2 geni 3. kromozomun p21-p24 bölgesinde CC kemokin reseptör komşuluğundaki CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 genlerinin yakınında bulunan bir gendir (Navratilova 2006). Bu gen üç ekzondan oluşur ve yaklaşık olarak 7 kb genomik dizilim uzunluğundadır (Şekil 1.7.), (Cha ve ark. 2007).



Şekil 1.7. CCR2 -190G/A (V64I) polimorfizminin kromozom üzerindeki yeri (Cha ve ark. 2007).

CC kemokin reseptör 2'nin değişik polimorfik bölgeleri tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları -6928 (G/T; promotor), -6752 (A/G; promotor), 190 (G/A; ekzon: Val/Ile), 3000 (A/G; ekzon), 3547 (T/C; 3'UTR), 3610 (A/G; 3'UTR), 3671 (C/G; 3'UTR), 4385 (T/A; 3'UTR)'dir (Spagnolo ve ark. 2003). En çok çalışılan polimorfizm ekzon 2'de CCR2 proteinini kodlayan genin 190. pozisyonundaki G/A değişimidir. Bu nükleotid değişimi proteinin transmembran bölgesindeki valin (V) aminoasitinin izolösin (I) aminoasitine (V64I) değişimiyle sonuçlanır (Navratilova 2006).

CCR2 -190 G/A polimorfizmi ve enflamatuvar hastalık

Literatürde ateroskleroz ve/veya MI'nın CCR2 V64I SNP ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve yaş, etnik unsurlar gibi faktörlerin polimorfizm üzerinde önemli olabileceği rapor edilmiştir. Özellikle Çek (Petrkova ve ark. 2003), Afrika kökenli Amerikan (Nyquist ve ark. 2009) ve 65 yaşın altındaki (Ortlepp ve ark. 2003, Ortlepp ve ark. 2005) bireylerde CCR2 V64I SNP'nin ateroskleroz ve/veya MI riskini artırabileceği saptanmıştır. Ancak, İzlanda (Bjarnadottir ve ark. 2006), Avusturya/kuzey-İspanya (Gonzalez ve ark. 2001) ve Kafkas/Girit toplumlarındaki (Apostolakis ve ark. 2007) CCR2 V64I polimorfizminin sağlıklı kontrollerden farklı

olmadığı tespit edilmiştir Beyaz ırkta yapılan bir çalışmada azalmış koroner arter kalsifikasyonunun CCR2-64I alleli ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve polimorfizmin hastalıktan koruyucu bir etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (Valdes ve ark. 2002).

CC kemokin reseptör 2 polimorfizminin sarkoidozis (Hizawa ve ark. 1999), multiple skleroz (Miyagishi ve ark. 2003), HIV enfeksiyonu (Smith ve ark. 1997, van Rij ve ark. 1998, Liu ve ark. 2004) ve akciğer kanser (Zafiropoulos ve ark. 2004) gelişiminde koruyucu özelliği olabileceği bildirilmiştir. Kalp, böbrek ve karaciğer gibi organ nakillerinin başarısında etkisi olmadığı (Kruger ve ark. 2002, Schroppel ve ark. 2002, Simeoni ve ark. 2005), ancak verici bireylerde CCR2-64I allelini taşıyanların akut böbrek nakil reddinde anlamlı derecede daha az risk taşıdığı rapor edilmiştir (Abdi ve ark. 2002).

1.8.2. CCR2 Gen Ekspresyonu

Lökosit yüzeyindeki CCR2 gen ekspresyonu oldukça iyi düzenlenen ve mikro çevreye bağlı olarak değişkenlik gösteren özelliktedir. Interferon-γ, IL-1 ve ya TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinlerin hızlı bir şekilde CCR2 gen ekspresyonunu azaltarak monositlerin enflamasyon alanında kalmasını sağladığı ve böylece dolaşıma tekrar geri dönmesinin engellendiği gösterilmiştir (Tangirala ve ark. 1997). Makrofajların olgunlaşmasını sağlayan faktörler de CCR2 gen ekspresyonu üzerine benzer etkilere sahiptir ve farklılaşmasını tamamlamış makrofajlar MCP-1'e tepkisiz kalmaktadır. İnterlökin-2 ise CCR2 gen ekspresyonunu ve ilave NK hücrelerin ve T lenfositlerin kemotaktik kapasitesini arttırmaktadır (Loetscher ve ark. 1996). CC kemokin reseptör 2 eksprese edemeyen farelerde oluşturulan deneysel enflamasyon modelinde monositlerin enflamasyon alanına göç etmediği ve enflamasyonun çözülmesinde rol oynamadığı gözlenmiştir (Boring ve ark. 1997, Kuziel ve ark. 1997). Buna ilave olarak CCR2'nin sadece kemotaksiste değil aynı zamanda monositlerin endotel duvarına sıkı adezyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir (Campbell ve ark. 1996, Han ve ark. 1999).

CCR2 gen ekspresyonu ve enflamatuvar hastalık

Literatürde CCR2'nin mRNA düzeyindeki gen ekspresyonu değerlendiren çalışma sayısı sınırlıdır. Prostat, aksiger, göğüs ve kemik iliğini içeren farklı tip kanser hücre hatlarında CCR2'nin m-RNA düzeyinde ekspresyonun arttığı (Lu ve ark. 2007), buna karşın amiyotropik lateral skleroz hastalarında periferal kan

mononükleer hücrelerinde gen ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Gupta ve ark. 2012).

CCR2 gen ekspresyonu ve periodontal hastalık

Venza ve ark. (2010) tip 2 diyabet hastalarında proenflamatuvar sitokin ve kemokin reseptörlerinin rolünü kronik periodontitis hastalarının gingival doku örneklerinde hem mRNA hem de protein seviyesinde araştırmışlar ve CCR2 ekspresyonunun diyabetik durumdan bağımsız olarak enflamasyonlu gingival dokularda artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bir genin yapısındaki kalıtsal değişikliklerin veya diyet/çevre gibi genetik olmayan faktörlerin fonksiyonel gen ürünü olan mRNA/protein düzeyindeki değişimlere olan etkisi, enflamatuvar hastalıklarda konağın hastalığa yatkınlığının arttırılmasında veya mevcut enflamatuvar cevabın şiddetlenmesinde rol oynayarak önemli klinik sonuçlara neden olabileceği bilinmektedir (Nussbaum ve ark. 2005b). Bu genetik faktörler normal immun yanıtın oluşumunda anahtar rol oynamakla birlikte, hatalı bağışıklık reaksiyonlarının ve immun sitemin aracılık ettiği hastalıkların gelişiminde de rol oynayabilirler (Nussbaum ve ark. 2005a). Ayrıca, monosit fonksiyonlarının periodontal hastalıkta önemli olduğu ve hiperenflamatuvar monosit fenotipinin periodontitiste yıkım şiddetini arttırdığı rapor edilmiştir (Garrison ve Nichols 1989). İmmun sistemin önemli bir bileşeni olan MCP-1'in, reseptörü olan CCR2 ile etkileşime geçerek monositlerin enflamasyon alanına yönlendirilmesinde anahtar rol oynadığı (O'Hayre ve ark. 2008)) ve polimorfizmlerin hastalık yıkım şiddeti üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Szalai ve ark. 2001a, McDermott ve ark. 2005). Bu nedenle bu araştırmada MCP-1 ve CCR2 polimorfizmlerinin agresif periodontitis patogenezinde önemli rol oynayabileceği hipotezinden yola çıkılarak; 1) agresif periodontitis hastalarında MCP-1 -2518 A/G ve reseptörü olan CCR2 -190 G/A polimorfizmlerinin genotip dağılımları ve allel frekanslarını değerlendirmek ve sağlıklı kontrollerle kıyaslamak, 2) dişeti oluğu sıvısı MCP-1 düzeylerini agresif periodontitis ve sağlıklı gruplarda tespit ederek MCP-1 polimorfizminin DOS protein düzeylerine olan olası etkisini belirlemek ve 3) promotor bölgedeki nükleotid değişimlerinin genin ekspresyonu arttırıp azaltabileceği (Lewin 2004) bilindiğinden, mevcut polimorfizmin periferal kan mononükleer hücrelerinde mRNA düzeyindeki gen ekspresyonuna olan etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne Mart 2011 ile Ağustos 2012 tarihleri arasında gelen, klinik ve radyografik olarak agresif periodontitis (Armitage 1999) teşhisi konulan 108 hasta ve periodontal olarak sağlıklı 107 gönüllü olmak üzere toplam 215 birey üzerinde yürütüldü. Son altı ay içerisinde antibiyotik kullanan ve periodontal olarak tedavi gören, kardiyovasküler rahatsızlığı, metabolik hastalığı olan, insan immun yetmezlik virüsü ''Human immunodeficiency virus'' (HIV) ile enfekte, Hepatit A, B veya C virüsü taşıyan, ağız içerisinde <16 daimi dişi olan ve ortodontik olarak tedavi edilmiş ve sigara kullanan bireyler araştırmaya dahil edilmedi. Araştırma için Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar sayısı 2011/016). Çalışmaya dahil edilen tüm bireylere araştırmanın amacı ve içeriği detaylı olarak anlatıldıktan ve aydınlatılmış onam formları imzalandıktan sonra araştırmaya başlandı.

2.2. Klinik Periodontal Değerlendirme

Klinik olarak modifiye plak indeksi (Pİ) (Silness ve Loe 1964), gingival indeks (Gİ) (Loe ve Silness 1963), sondlama cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman kaybı (KAK) ölçümleri yapıldı.

2.2.1. Plak İndeksi

Plak indeksi ölçümleri her bir dişin tüm yüzeylerinden elde edildi ve ortalamaları alınarak dişlere ait Pİ değerleri saptandı. Daha sonra elde edilen veriler toplam diş sayısına bölünerek her bir hasta için ortalama Pİ hesaplandı.

Ölçümler aşağıdaki kriterlere göre yapıldı:

0: Diş yüzeyinin dişeti bölgesinde hiç bakteri plağı yok.

1: Dişin yüzeyinde bakteri plağı göz ile görülmemekte fakat sond ucu dişeti sulkusunda gezdirildiğinde bakteri plağı izlenmektedir.

2: Dişeti bölgesi inceden orta kalınlığa bakteri plağı ile kaplıdır ve bu birikinti gözle seçilebilmektedir.

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

2.2.2. Gingival İndeks

Bütün dişlerin tüm yüzeylerindeki dişeti enflamasyon değerleri ölçüldü ve her bir dişe ait Gİ ortalamaları belirlendi. Hastalara ait Gİ ortalamalarının hesaplanması için tüm değerlerin toplamı toplam diş sayısına bölündü.

Değerlendirme aşağıdaki şekilde yapıldı;

0: Sağlıklı dişeti

1: Hafif enflamasyon, hafif renk değişikliği, 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.

2.2.3. Sondlama Cep Derinliği

Tüm dişlerde Williams periodontal sond* yardımıyla dişeti kenarı ile sondlanabilir sulkus/cep tabanı arası mesafe milimetrik olarak ölçüldü. Sondlama esnasında tam olmayan ölçümler bir üst değere yuvarlandı. Meziobukkal, bukkal distobukkal, distolingual, lingual ve meziolingual olmak üzere tüm dişlerin altı noktasından ölçüm yapıldı. Sondlama esnasında sondun, dişin uzun aksına paralel olmasına ve aşırı kuvvet uygulanmamasına dikkat edildi. Daha sonra tüm ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak her bir dişe ve hastaya ait değerler belirlendi. Ayrıca, '0-3 mm'', ''4-5 mm'' ve ''≥6 mm" olan alanların yüzde dağılımları her bir hasta için kaydedildi.

2.2.4. Klinik Ataşman Kaybı

Tüm dişlerin mine-sement sınırı ile sondlanabilir sulkus/cep tabanı arasındaki mesafe Williams periodontal sond kullanılarak ölçüldü. Ölçümler dişlerin meziobukkal, bukkal, distobukkal, distolingual, lingual ve meziolingual bölgelerinden yapıldı ve değerlerin ortalamaları alınarak her bir hastaya ait KAK düzeyleri belirlendi. Ayrıca, ''0-2 mm'', ''3-5 mm'' ve ''≥6 mm'' olan alanların yüzdeleri hesaplanarak hastalara ait değerler kaydedildi.

* Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

2.2.5. Periodontal Teşhis

Hastaların muayenesinde ve periodontal doku sağlığının teşhisinde klinik periodontal parametreler, bitewing ve panoramik radyograflardan yararlanılarak üçüncü molarlar hariç tüm dişler değerlendirildi. Periodontal olarak sağlıklı kontrol grubu ağız içinde <2 Gİ, <3 mm SCD olan ve interproksimal ataşman kaybı bulunmayan bireyler arasından seçildi. Araştırmanın deney grubunu agresif periodontitis teşhisi konulmuş hastalar oluşturdu. Agresif periodontitis teşhisi Amerikan Periodontoloji Akademisi "American Academy of Periodontology"'nin 1999 yılında yayınladığı sınıflandırma esas alınarak yapıldı (Armitage 1999). Lokalize agresif periodontitis teşhisi için birinci azı dişi veya kesici dişleri içeren en az iki daimi dişte interproksimal ataşman kaybı varlığına ve bunlardan bir tanesi birinci azı dişi olmak kaydıyla, diğer birinci azı dişleri ve kesici dişlerin dışında ikiden daha fazla dişinde interproksimal kemik kaybı olmamasına dikkat edildi. Generalize agresif periodontitis teşhisi için de birinci azı dişleri ve kesici dişler haricinde en az üç daimi dişi içeren generalize ataşman kaybı olması göz önünde bulunduruldu .

2.3. Biyokimyasal Değerlendirme

2.3.1.Dişeti Oluğu Sıvısı Örneklerinin Elde Edilmesi

Her bir bireyde alt çenede iki ve üst çenede iki diş olmak üzere SCD en fazla olan toplam dört dişten DOS toplandı. Örneklemeler tüm klinik periodontal ölçümler kaydedildikten 24-48 saat sonra yapıldı ve örnekleme için 10:00 ile 13:00 saatleri arası tercih edildi.

Örnekler aşağıdaki işlemler takip edilerek alındı:

1) Supragingival plak dişetine değmeden bir küret yardımı ile uzaklaştırıldı.

2) Örnek alınacak bölge pamuk rulo tamponlarla izole edildi ve diş yüzeyi hava spreyi ile yavaşça kurutuldu.

3) Kağıt şerit[†] sulkus içerisine 1 mm yerleştirildi "modifiye sulkus içi yöntem" ve DOS'un toplanması için 30 saniye süre beklendi. Kan ve salya bulaşan kağıt şeritler çalışmaya dahil edilmedi.

[†] Pro Flow Inc., New York, USA

4) Kağıt şeritteki sıvı miktarı Periotron 8000[‡] cihazı ile ölçüldü.

5) Bir hastadan alınan toplam dört kağıt şerit 500 µl taşıyıcı solüsyon (%0.05 sığır serum albumini içeren ve ph 7.4 olan) içeren eppendorf tüpe koyuldu ve kapak etrafları parafin bant ile sarıldı. Analiz edileceği güne kadar -20°C'de saklandı.

2.3.2. Dişeti Oluğu Sıvısı MCP-1 Düzeylerinin Belirlenmesi

Dişeti oluğu sıvısı örneklerinin MCP-1 düzeylerinin ölçümleri Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nde enzim bağlı immun absorban yöntem ''Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay'' (ELISA) ile MCP-1 ticari Elisa kiti[§] kullanılarak gerçekleştirildi.

Biyokimyasal değerlendirme

Örneklerin biyokimyasal analizi ticari kitlerde belirtilen protokole uygun olarak hazırlandı. Standartların hazırlanması amacıyla kit içerisindeki stok standartlar kontrol üreticinin direktiflerine uygun olarak sulandırıldı. Plak üzerindeki yuvalara 200 µl standart ve 200 µl DOS örnekleri ilave edildi ve üzerleri yapışkan bant ile kapatılarak iki saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra plaklar otomatik yıkayıcıda[**], hazırlanan yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı. Yıkamanın ardından 200 µl ''MCP-1 Conjugate'' her bir plak yuvasına eklendi ve üzerleri yapışkan plastik bantlar ile örtülerek bir saat oda sıcaklığında tutuldu. Bu süre içerisinde konjugatın örnekteki MCP-1 ile birlikte monoklonal antikora bağlanması sağlandı. Bekleme süresinin sonunda plak içeriği otomatik yıkayıcıda beş kez yıkama solüsyonu ile yıkanarak nonspesifik bağlanmalar uzaklaştırıldı. Daha sonra hazırlanan kromojenik substrat solüsyonunun 200 µl'si her bir kuyucuğa ilave edilerek oda ısısında, üzeri aliminyum folyo ile kapatılarak 30 dk beklendi. Bekleme süresinin sonunda 50µl 2N sülfürik asit stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm'de Elisa okuyucu[††] ile enzim düzeyleri belirlendi. Standart değerlerin optik okuma sonunda elde edilen verilere göre standart eğri oluşturuldu. Okunan DOS MCP-1 değerleri (pg/ml) sulandırma miktarı (0.5 ml) ile çarpılarak total miktar (pg) belirlendi. Elde edilen total MCP-1 miktarı (pg) dörde bölünerek 30 sn'de toplanan MCP-1 miktarı (pg/30sn) belirlendi. Birim hacimdeki MCP-1 konsantrasyonları hesaplanırken

[‡]Periotron 8000, Harco Electronics, Winnipeg, CANADA
[§§] Quantikine MCP-1 elisa kit DCP00, Minneapolis, USA
[**] ELx 50 Bioelisa Microplate Washer, Bio-Tek Instruments, Inc., Highland Park, USA
[††] µ Quant ELISA Reader Bio-Tek Instruments, Inc., Highland Park, USA

okunan MCP-1 değerleri (pg/ml) 0.5 ml sulandırma miktarı ile çarpıldı ve DOS (µl) hacmine bölündü.

2.4. Genetik Değerlendirme

2.4.1. DNA İzolasyonu

DNA izlasyonu işlemi Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında yapıldı.

Agresif periodontitis hastalarından ve periodontal olarak sağlıklı bireylerden alınan 2 ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüplere steril olarak alındı.

İzolasyon için gerekli malzemeler

- Mikrosantrifüj[‡‡]
- 65°C su banyosu
- Mikropipet (20 ml ile 500 ml'lik hacim kapasiteli)
- Vortex
- DNA İzolasyon kiti[§§]

İzolasyon basamakları

1. Eppendorf tüpü içerisine 200µl tam kan ve 20µl Proteinaz K ilave edildi. (Vivantis, Malezya)

2. 200µl çekirdek parçalama solüsyonu eklendi.

3. Eppendorf tüpü vortexte 10 saniye karıştırıldı.

4. 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

5. Karışım santrifüj tüpüne transfer edildi.

6. 200µl %100'lük etanol eklendi ve 10 saniye vortexlendi.

7. Tüm karışım santrifüj filtresine aktarıldı.

8. 8.000g devirde 1 dk santrifüj edildi.

9. Santrifüj filtresi yeni tüpe transfer edildi.

10. 500µl Wash Buffer I solüsyonu santrifüj filtresine eklendi.

[‡‡] Eppendorf North Amerika, Inc. Westbury, N. Y. USA
[§§] GF-1 DNA Extraction Kit, Vivantis

11. 8.000g devirde 1 dk santrifüj edildi.

12. Santrifüj filtresi alınarak alttaki sıvı boşaltıldı ve filtre yerine konuldu.

13. 500µl Wash Buffer II solüsyonu santrifüj filtresine eklendi.

14. 8.000g devirde 1 dk santrifüj edildi.

15. Santrifüj filtresi kaldırılarak alttaki sıvı boşaltıldı.

16. 500µl Wash Buffer II solüsyonu eklendi.

17. 13.000g devirde 3 dk santrifüj edildi.

18. Dikkatli bir şekilde filtre kaldırıldı ve herhangi bir solüsyonla temas etmeksizin başka bir tüpe alındı.

19. 100µl önceden 65°C'ye ısıtılan Elution Buffer eklendi ve 2 dk beklendi.

20. 1 dk 13.000g devirde santrifüj edildi.

21. Filtre ayrıldı ve tüpün kapağı kapatıldı. Genomik DNA bu tüpün içinde kullanıma hazır halde tutuldu. Deneyin diğer aşamalarını beklemek amacıyla bu tüpler +4°C'de saklandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu ''Polimerase Chain Reaction" (PCR) bir DNA molekülünün seçilen bir bölgesinin seçici çoğaltımıyla sonuçlanır.Yöntemin temeli çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü baz dizilerine tamamlayıcı olan 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılması ve bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Brown 2009). Polimeraz zincir reaksiyonu ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür.

Bölgenin sınırları bilindiği sürece herhangi bir DNA molekülünün herhangi bir bölgesi seçilebilir. Bir PCR döngüsü sırasıyla:

1. Çift sarmallı DNA zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması "denaturation" (94°C-98°C)

2. Sentetik oligonükleotitlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanması "annealing" (37°C-65°C)

3. Taq DNA polimeraz enzimi ile primerlerin bağlandığı yerlerden başlayarak DNA'nın kalan kısmının sentezlenmesi, zincir uzaması "extension" (72°C).

2.4.2. MCP-1 -2518 A/G Polimorfizminin Belirlenmesi

Araştırma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi .

Monosit kemoatraktan protein-1 geninin distal promotor bölgesi aşağıda belirtilen primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı.

Kullanılan primer dizileri:

F: 5'-CCGAGATGTTCCCAGCACAG-3'

R: 5'-CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT-3'

PCR işlemi 15µl hacminde aşağıdaki malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

1) 2µl DNA (50ng/µl)
2) 5µl karışım A
   1,2 µl 10x buffer
   1,5 µl dNTP
   1,5 µl $MgCl_2$
   0,8 µl dH_20
3) 3 µl Karışım
   Primerler (10 pmol/µl)
4) 5 µl dH_20
5) 0,2 µl Taq polimeraz (hot start AT max)

Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

PCR işlemi ''Termal siklus''♠ cihazı ile yapıldı. PCR amplifikasyon koşulları sıralaması;

- 95 °C'de 7 dakika ilk denatürasyon
- 95 °C'de 15 saniye denatürasyon
- 59 °C'de 30 saniye primer bağlanması } 10 döngü
- 72 °C'de 20 saniye uzama reaksiyonu
- 95 °C'de 15 saniye denatürasyon
- 57 °C'de 30 saniye primer bağlanması } 25 döngü
- 72 °C'de 20 saniye uzama reaksiyonu
- 72 °C'de 4 dakika son sentez

♠ Geneamp PCR systems 9700, Applied Biosystems, Life tech inc. USA

Jel elektroforezi

Elde edilen PCR ürünü olup olmadığını değerlendirmek için %1.5-2'lik agaroz (A5093, Sigma), TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) solüsyonu ile karıştırılıp kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz TAE içinde eritilip 50-60°C'ye soğutulduktan sonra Ethidium Bromide (10µg/ml) ilave edildi. Jelde kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PCR ürününden 5µl alınıp yükleme boyası (10 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel elektroforez cihazında (Horizon 11-14, Life Technologies inc., UK) 30 dakika 160 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını belirlemek için 100 baz çifti (bç)'lik DNA basamakçıkları "DNA ledder" kullanıldı. Jel, Ultra Violet (UV) illüminatör altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 930 bç büyüklüğünde bantlar görüldü.

Restriksiyon enzim kesimi ve genotipleme

Elde edilen PCR ürünlerinde MCP-1 geni -2518 bölgesi için G alleli varlığı *PvuII*[***] restriksiyon enzimi için bir tanıma bölgesi oluşturmakta ve MCP-1 -2518 bölgesinde Adenin nükleotidi (A) Guanin (G) nükleotidine yer değiştirmektedir. G alleli varlığında kesim işlemi gerçekleşmekte ve bireylerin genotipleri belirlenmektedir. Genotipler;

AA ➡ 930 bç

AG ➡ 930 bç, 708 bç ve 222 bç

GG ➡ 708 bç ve 222 bç'de band vermektedir.

Restriksiyon işlemi aşağıdaki protokole göre 15 µl'lik hacimde gerçekleştirildi.

1-10 µl PCR ürünü

2-1 µl restriksiyon enzimi (*PvuII*)

3-2 µl restriksiyon enzim buffer

4-2 µl steril dH_20

Enzim kesim reaksiyonu PCR ürünü 37°C'de bir saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve enzim kesim sonuçları % 3'lük Agaroz jelde 160 volt gerilimde 30 dakika yürütülerek analiz edildi.

[***] New England Biolabs, Beverly, MA, USA

2.4.3. CC Kemokin Reseptör 2 -190 G/A Polimorfizminin Belirlenmesi

CC Kemokin Reseptör 2 geninin ekzon 2 bölgesi aşağıda belirtilen primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı.

Kullanılan primer dizileri:

F: 5′-ATTTCCCCAGTACATCCACAAC-3'

R: 5′-CCCACAATGGGAGAGTAATAAG-3'

PCR işlemi 15µl hacminde aşağıdaki malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

1) 2µl DNA (50ng/µl)
2) 5µl Karışım A
   1,2 µl 10x buffer
   1,5 µl dNTP
   1,5 µl $MgCl_2$
   0,8 µl dH_20
3) 3 µl Karışım B
   Primerler (10pmol/ µl)
4) 5 µl dH_20
5) 0,2 µl Taq polimeraz (hot start AT max)

Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

PCR işlemi bir ‘‘Termal siklus’’ cihazı yapıldı. PCR Amplifikasyon koşulları sıralaması;

- 95 °C’de 7 dakika ilk denatürasyon
- 95 °C’de 15 saniye denatürasyon
- 59 °C’de 30 saniye primer bağlanması } 10 döngü
- 72 °C’de 20 saniye uzama reaksiyonu
- 95 °C’de 15 saniye denatürasyon
- 57 °C’de 30 saniye primer bağlanması } 25 döngü
- 72 °C’de 20 saniye uzama reaksiyonu
- 72 °C’de 5 dakika son sentez

Jel elektroforezi

Elde edilen PCR ürünü olup olmadığını değerlendirmek için %1,5-2’lik agaroz (A5093, Sigma), TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) solüsyonu ile karıştırılıp

kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz TAE içinde eritilip 50-60°C'ye soğutulduktan sonra EtBr (10µg/ml) ilave edildi. Jelde kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PCR ürününden 5µl alınıp yükleme boyası (10 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel elektroforez cihazında (Horizon 11-14, Life Technologies inc., UK) 30 dakika 160 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını belirlemek için 100 bç'lik DNA basamakçıkları kullanıldı. Jel, UV illüminatör altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 317 bç büyüklüğünde bantlar görüldü

Restriksiyon enzim kesimi ve genotipleme

Elde edilen PCR ürünlerinde CCR2 geni -190 bölgesi için A alleli varlığında *FokI*[†††] restriksiyon enzimi için bir tanıma bölgesi oluşturmakta ve CCR2 -190 bölgesinde Guanin (G) nükleotidi Adenin (A) nükleotidine yer değiştirmektedir. G alleli varlığında kesim işlemi gerçekleşmekte ve bireylerin genotipleri belirlenmektedir. Genotipler;

GG ➡ 317 bç

AG ➡ 317 bç, 197 bç ve 120 bç

AA ➡ 197 bç ve 120 bç'de band vermektedir.

Restriksiyon işlemi aşağıdaki protokole göre 15 µl'lik hacimde gerçekleştirilmiştir.

1-10 µl PCR ürünü

2-1 µl restriksiyon enzimi (*FokI*)

3-2 µl restriksiyon enzim buffer

4-2 µl steril dH_20

Enzim kesim reaksiyonu PCR ürünü 37°C'de 15 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiş ve enzim kesim sonuçları %3'lük Agaroz jelde 160 volt gerilimde 30 dakika yürütülerek analiz edilmiştir.

[†††] New England Biolabs, Beverly, MA, USA

2.5. MCP-1 Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

MCP-1 gen ekspresyonunun belirlenme aşamaları:

- ✓ Çalışmaya dahil edilen bireylerden kan alınması
- ✓ Kandan total RNA izolasyonu
- ✓ Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) oluşturulması
- ✓ Uygun housekeeping gen seçimi
- ✓ cDNA'dan Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu "Real-Time Polimerase Chain Reaction: RT-PCR" ile MCP-1 sekansının amplifikasyonu
- ✓ MCP-1 ekspresyon düzeyinin rölatif analizi ve MCP-1 ekspresyon düzeyi ile hastaların genotiplerinin arasındaki ilişkinin incelenmesi

2.5.1. Kandan Total RNA İzolasyonu

Lökosit izolasyonu

1. Edta'lı tüp içerisinde alınan taze kanlar hemen laboratuvarda hücre ayırma işlemine tabi tutuldu.

2. Getirilen kanların lökosit sayısı 1000 ile çarpıldı. Bulunan sonuç 3 milyon eritrosit sayısına bölündü ve bulunan sonuç kadar kan alınarak (µl) kapaklı ependorf tüp içerisine konuldu. Alınan kanın 2 katı kadar "red blood cell lysis buffer" eklendi ve 10 dk çalkalayıcıda[‡‡‡] bırakıldı.

3. 12.000g devirde 30 sn santrifüj yapıldı ve süpernatant dikkatli bir şekilde atıldı. Eğer tüpün dibinde beyaz pelet oluşmamış ise tekrar bir önceki miktar kadar red blood cell eklendi ve 5 dk çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı.

4. 400 µl lysis binding buffer eklendi ve 15 sn vorteks yapıldı.

5. 15 sn 8000g devirde santrifüj yapıldı. Filtreli tüpler atıldı ve eppendorf tüpünün kapağı kapatılarak elde edilen lökositler -80 °C de saklandı.

[‡‡‡] Biosan OS-20 Orbital Shaker, Litvanya

RNA izolasyonu

1. -80 °C'den alınan lökosit aşamasındaki örnekler RNA izolasyon kitinden[§§§] çıkan filtreli tüplerin içerisine konuldu ve tüplerin kapakları kapatılarak numaralandırıldı.

2. 15 sn 8000g devirde santrifüj yapıldı.

3. Toplama tüpleri atılarak, filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarıldı.

4. Her bir örneğe 90 µl DNase incubation buffer + 10µl DNase I eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

5. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl Wash buffer I eklenerek 15 sn 8000g devirde santrifüj yapıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine konuldu.

6. Daha sonra filtreli tüplerin içerisine 500 µl wash buffer II eklenerek 15 sn 8000g devirde santrifüj yapıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine konuldu.

7. Filtreli tüplerin içerisine 200 µl wash buffer II eklenerek 2 dk 14000g devirde santrifüj yapıldı ve toplama tüpleri atıldı.

8. Filtreli tüpler kapaklı 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 60 µl Elution buffer konarak 8000g devirde 1 dk santrifüj yapıldı.

Elde edilen RNA'ların kaliteleri agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi. Spektrofotometrede ölçülen 260/280 oranına bakılarak RNA konsantrasyonu ve saflığı belirlendi ve bu oranı > 1.8 olan RNA'lar ile cDNA aşamasına geçildi.

2.5.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Oluşturulması

Komplementer DNA (cDNA) sentezi kit prosedürüne[****] uygun olarak gerçekleştirildi. Ölçülen RNA konsantrasyonları eşitlenecek şekilde kaç ng RNA alınacağı hesaplandı.

1-10 ng total RNA
1 µl primer (oligo d(T))
13 µl e kadar distile su

} 65 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 2 dk buz üzerinde bekletildi.

[§§§] Roche High Pure RNA İsolation kit (Lot no:13064700)
[****] Roche transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (lot no:12071632)

Üzerine

4 µl reverse transkriptaz reaksiyon Bufferı	55°C'de 30 dk
0.5 ul RNaaz inhibitörü	
10 mM dNTP 2 ul	85°C'de 5 dk inkübe edildi
Reverse transkriptaz 20u/ul 0.5 ul	

Elde edilen toplam 20 µl hacimdeki cDNA örnekleri dondurma çözme işleminin bozucu etkisinin önüne geçilmesi amacı ile ependorf tüplere 2 µl'lik hacimlerde alikotlandı ve bu şekilde -80ºC de muhafaza edildi.

2.5.3. Uygun Housekeeping Gen Seçimi

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase "GAPDH", 28S rRNA "28S", 18S rRNA "18S", ribosomal protein L32 "RPL32", ubiquitin B "UBB" ve β-actin housekeeping genlerinin primer etkinlikleri "primer efficiency" yapıldı. Sulandırma "dilution" metodu ile housekeeping ve hedef genin etkinliklerinin "efficiency" birbirine yakın olduğu teyit edildi ve istatistik sonuçlarına göre en uygun housekeeping genin 28S olduğuna karar verildi.

2.5.4. RT-PCR ile MCP-1 Sekansının Amplifikasyonu

1. Buz üzerinde çözdürülen cDNA'lar nazik bir şekilde vortekslendi.

2. Aşağıda yazılı olan reaksiyon bileşenlerinden oluşan (kalıp DNA hariç) bir master miks oluşturuldu (Çizelge 2.1. ve 2.2.).

Çizelge 2.1. RT-PCR amplifikasyonu için hazırlanan master miks bileşenleri.

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	12.5 µl
Forward Primer	0.3 µM
Reverse Primer	0.3 µM
Kalıp DNA	≤ 500ng
Distile su	25 µl'ye tamamlanır
Toplam hacim	25 µl

Çizelge 2.2. Housekeeping ve hedef gen için kullanılan primerler.

Gen	Primer Sekansları	PCR Ürünü	Optimizasyon Sıcaklığı
28S	Forward: 5'-TTAGTGACGCGCATGAATGG-3' Reverse: 5'-TGTGGTTTCGCTGGATAGTAG -3'	67 bç	63 ^{0}C
MCP-1 (CCL2)	Forward: 5' -AGCAGAAGTGGGTTCAGGAT-3' Reverse: 5'-GGTTGTGGAGTGAGTGTTCAAG-3'	82 bç	63 ^{0}C

3. Master miks tamamen karıştırıldı ve PCR tüplerine eşit oranda dağıtıldı.

4. Kalıp DNA (≤ 500 ng/reaksiyon) eşit oranda master miks içeren her bir PCR tüpüne eklendi.

5. Elde edilen reaksiyon ürünü kabarcık oluşturmamaya özen gösterilerek nazikçe karıştırıldı.

6. Termal siklus "Thermal cycler"[♣] cihazı programlandı ve örnekler cihaza yerleştirilerek program başlatıldı.

Program olarak:

ilk denatürasyon 95 ºC' de 10 dk

amplifikasyon 95 ºC' de 30 sn
63 ºC' de 60 sn
72 ºC' de 30 sn
} 45 döngü

Yukarıda belirtilen PCR protokolünde hem housekeeping genin hem de hedef genin optimizasyonu yapıldı. Erime eğrisi "melting curve" analizi PCR ürününün spesifitesini ve özdeşliğini belirlemek için 60 ºC'den 95 ºC' ye kadar 1 derece artarak her bir aşamada 5 sn ile green filtresinde yapıldı.

Optimize deneyler üç kere tekrarlandı. Quantitatif PCR "qPCR" sonuçlarını dikkate alarak ekspresyon standart eğri çizildi ve ΔC_t 'ye göre cDNA kalıp sayıları hesaplandı. Bu değer hedeflenen genlerin ekspresyon analizlerinde standart olarak kullanıldı ve rölatif ekspresyon (RE) değerlendirilmesinde ΔCt yöntemi kullanıldı (Livak ve Schmittgen 2001).

[♣]Qiagen rotor gene 5 plex+HRM

2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmaya başlamadan önce bir gruba düşen örnek sayısını belirlemek için güç analizi "power analysis" dikkate alındı. Buna göre %80 güçte, %95 güven düzeyinde, gruplar arası %20'lik farkı göstermek için olması gereken örnek sayısının yüz ikişer olması gerektiği belirlendi (G. Power: 3.1.2).

Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireyler arasındaki nümerik verilerin farklılığının değerlendirilmesinde non-parametrik bir test olan Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireyler arasındaki farklılık Kruskal Wallis testi ile değerlendirilerek gruplar arası anlamlı farklılığın olduğu parametreler Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırıldı.

Dişeti oluğu sıvısı MCP-1 konsantrasyonu (pg/µl) ve total miktarının (pg/30 sn) klinik periodontal parametreler ile ilişkisini değerlendirmek için Spearman korelasyon analizi kullanıldı.

Ki kare testi ile MCP-1 -2518 genotipik dağılımının Hardy Weinberg eşitliğinden sapması değerlendirildi ve hem sağlıklı kontrol (χ^2=0.10, p=0.95 hem de AP grubu (χ^2=0.31, p=0.85) için farklı olmadığı testpit edildi. Ayrıca, kontrol χ^2=1.12, p=0.57) ve test (χ^2=0.06, p=0.97) gruplarındaki CCR2 -190 genotipleri Hardy Weinberg eşitliğine uygun olduğu gösterildi.

Monosit kemoatraktan protein-1 ve CCR2 polimorfizminde "AA, AG, GG" genotiplerinin ve " A allel, G allel" varlığının hem sağlıklı ve agresif periodontitis olan bireylerdeki hem de alt gruplar olan sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis olan bireylerdeki dağılımı ki-kare testi ile değerlendirildi.

Agresif periodontitis ve sağlıklı bireyler arasında MCP-1 gen ekspresyon düzeyi arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde bağımsız örneklerde t testi, bireylerin genotipleri arasındaki gen ekspresyon farklılığının değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi " one way ANOVA" kullanıldı. Monosit kemoatraktan protein-1 gen ekspresyonu istatistiksel analizleri log transforme edilmiş veriler kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel farklılıklar %95 güven aralığında ve *p* değeri <0.05 olacak şekilde değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Bu araştırma periodontal olarak sağlıklı 107 (74 kadın 33 erkek) ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş 108 (77 kadın, 31 erkek) olmak üzere toplam 215 birey üzerinde tamamlandı. Sağlıklı ve AP teşhisi konulmuş hastalarının yaş ve ağızda bulunan diş sayıları Çizelge 3.1.'de verildi.

Çizelge 3.1. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin yaş ve diş sayısı bilgileri.

	Sağlıklı (n=107)	**Agresif Periodontitis** (n=108)	**İstatistik**	**p**
Yaş				
(Ort±Ss)	27.09±3.98	27.99±5.29		
(Min-Maks)	23-38	16-39	Z=-1.701	0.089
(Ortanca)	26	27		
Diş Sayısı				
(Ort±Ss)	27.77±0.65	26.18±2.54		
(Min-Maks)	24-28	16-28	Z= -7.649	**0.000**
(Ortanca)	28	27		

Mann-Whitney U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.2. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin yaş ve diş sayısı bilgileri.

	Sağlıklı (n=107)	**Lokalize Agresif Periodontitis** (n=65)	**Generalize Agresif Periodontitis** (n=43)	**İstatistik**	**Sd**	**p**
Yaş						
(Ort±Ss)	27.09±3.98	27.03±4.73	29.44±5.82[ab]			
(Min-Maks)	23-38	17-37	16-39	K-W=9.434	2	**0.009**
(Ortanca)	26	27	30			
Diş Sayısı						
(Ort±Ss)	27.77±065	26.83±1.55[a]	25.19±3.34[ab]			
(Min-Maks)	24-28	21-28	16-28	K-W=67.557	2	**0.000**
(Ortanca)	28	27	26			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p<0.05)
a: Sağlıklı gruba göre farklılık; b: lokalize agresif periodontitise göre farklılık
(Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testine göre p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.2.'de AP grubunu oluşturan LAP ve GAP alt gruplarına ait yaş ve diş sayısı bilgileri yer almaktadır. Lokalize agresif periodontitis hastalarının 46'sı kadın 19'u erkek, generalize agresif periodontitis hastalarının 31'i kadın, 12'si erkek bireyden oluştu ve cinsiyet açısından gruplar arası fark anlamlı değildi (p>0.05).

Sağlıklı ve AP teşhisi konulmuş hastaların klinik periodontal parametre değerleri Çizelge 3.3.'de verildi.

Çizelge 3.3. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin klinik periodontal parametre değerleri.

	Sağlıklı (n=107)	**Agresif Periodontitis** (n=108)	**İstatistik**	**p**
Pİ				
(Ort±Ss)	1.03±0.59	2.33±0.39		
(Min-Maks)	1.00-1.15	1.50-3.00	Z=-13.124	**0.000**
(Ortanca)	1	2.05		
Gİ				
(Ort±Ss)	0.83±0.14	2.02±0.41		
(Min-Maks)	0.57-1	1.00-3.00	Z=-12.794	**0.000**
(Ortanca)	0.79	2.00		
SCD (mm)				
(Ort±Ss)	1.69±0.18	3.69±0.96		
(Min-Maks)	1.27-2.35	2.42-7.82	Z=-12.670	**0.000**
(Ortanca)	1.69	3.33		
KAK (mm)				
(Ort±Ss)	0.00	3.07±1.82		
(Min-Maks)	0.00-0.000	0.94-8.58	Z=-13.530	**0.000**
(Ortanca)	0.00	2.39		
SCD (%)				
1-3 mm				
(Ort±Ss)	100.±0.00	60.87±19.59		
(Min-Maks)	100-100	12-80-89.40	Z=-13.530	**0.000**
(Ortanca)	100	68.5		
4-5 mm				
(Ort±Ss)	0.00±0.00	24.83±13.25		
(Min-Maks)	0.00-0.00	5.95-76.90	Z=-13.530	**0.000**
(Ortanca)	0	20.25		
≥6 mm				
(Ort±Ss)	0.00±0.00	14.75±11.13		
(Min-Maks)	0.00-0.00	0.00-61.50	Z=-13.432	**0.000**
(Ortanca)	0	11.06		
KAK (%)				
0-2 mm				
(Ort±Ss)	100±0.00	57.08±22.87		
(Min-Maks)	100-100	0.00-89.33	Z=-13.530	**0.000**
(Ortanca)	100	64.51		
3-5 mm				
(Ort±Ss)	0.00±0.00	22.72±11.54		
(Min-Maks)	0.00-0.00	5.35-68	Z=-13.531	**0.000**
(Ortanca)	0	19.695		
≥6 mm				
(Ort±Ss)	0.00±0.00	20.559±16.18		
(Min-Maks)	0.00-0.00	3.57-89.74	Z=-13.531	**0.000**
(Ortanca)	0	13.91		

Mann-Whitney U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.4. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin klinik periodontal parametre değerleri.

	Sağlıklı (n=107)	**Lokalize Agresif Periodontitis** (n=65)	**Generalize Agresif Periodontitis** (n=43)	**İstatistik**	**Sd**	**p**
Pİ						
(Ort±Ss)	1.03±0.59	2.07±021[a]	2.71±028[ab]			
(Min-Maks)	1.00-1.15	1.5-2.5	2.00-3.00	K-W= 188.799	2	**0.000**
(Ortanca)	1	2	2.6			
Gİ						
(Ort±Ss)	0.83±0.14	1.78±0.29[a]	2.39±0.26[ab]			
(Min-Maks)	0.57-1	1.00-2.00	2.00-3.00	K-W= 181.237	2	**0.000**
(Ortanca)	0.79	2.00	2.3			
SCD (mm)						
(Ort±Ss)	1.69±0.18	3.07±0.43[a]	4.63±0.74[ab]			
(Min-Maks)	1.27-2.35	2.42-5.02	3.31-7.82	K-W= 178.524	2	**0.000**
(Ortanca)	1.69	3.04	4.51			
KAK (mm)						
(Ort±Ss)	0.00	1.84±0.71[a]	4.92±1.33[ab]			
(Min-Maks)	0.00-0.000	0.94-4.92	2.27-8.58	K-W= 203.931	2	**0.000**
(Ortanca)	0.00	1.60	4.43			
SCD (%)						
1-3 mm						
(Ort±Ss)	100±0.00	73.04±10.15[a]	42.45±15.64[ab]			
(Min-Maks)	100-100	44.64-89.40	12.80-78.39	K-W= 199.644	2	**0.000**
(Ortanca)	100	75.33	40.8			
4-5 mm						
(Ort±Ss)	0±0	18.28±7.863[a]	34.73±13.64[ab]			
(Min-Maks)	0-0	5.95-41.66	14.7-76.90	K-W= 195.443	2	**0.000**
(Ortanca)	0	17.94	33.33			
≥6 mm						
(Ort±Ss)	0±0	8.36±5.22[a]	24.39±10.76[ab]			
(Min-Maks)	0-0	0.00-25.75	8.02-61.5	K-W= 198.104	2	**0.000**
(Ortanca)	0	7.33	22.2			
KAK (%)						
0-2 mm						
(Ort±Ss)	100±0.00	71.83±10.32[a]	34.77±18.00[ab]			
(Min-Maks)	100-100	34.52-89.33	0.00-70.0	K-W= 202.476	2	**0.000**
(Ortanca)	100	73.2	35.7			
3-5 mm						
(Ort±Ss)	0.00±0.00	17.32±7.47[a]	30.88±11.86[ab]			
(Min-Maks)	0.00-0.00	5.35-46.60	10.25-68.00	K-W= 193.509	2	**0.000**
(Ortanca)	0	17.85	31.6			
≥6 mm						
(Ort±Ss)	0.00±0.00	10.59±5.27[a]	35.61±15.45[ab]			
(Min-Maks)	0.00-0.00	3.57-32.73	12.50-89.74	K-W= 203.756	2	**0.000**
(Ortanca)	0	10.00	30.7			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p<0.05)
a: Sağlıklı gruba göre farklılık; b: lokalize agresif periodontitise göre farklılık
(Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testine göre p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Sağlıklı, LAP ve GAP grupları arasında tüm klinik periodontal parametrelerin farklı olduğu gözlendi (p<0.05), (Çizelge 3.4.).

3.2. Biyokimyasal Bulgular

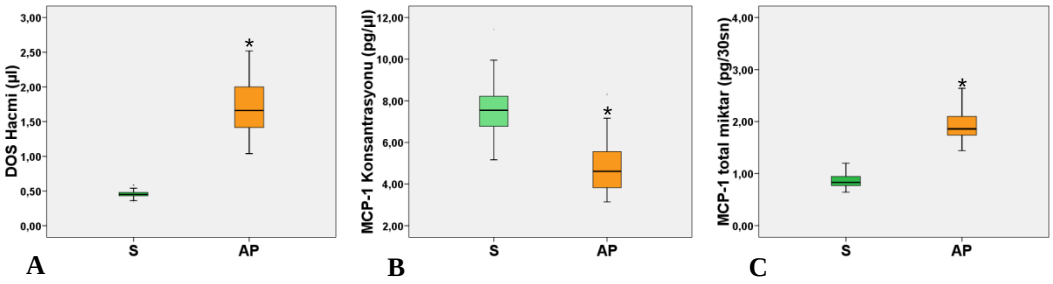
Bu araştırmaya dahil edilen bireylerden toplam 160 DOS örneği elde edildi. Biyokimyasal analiz esnasında periodontal olarak sağlıklı gruba ait 19 örneğin absorbans değerleri okunamadığından S grubuna ait 61 ve AP grubuna ait 80 örneğin MCP-1 düzeyleri ölçüldü. Agresif periodontitis grubunda toplam 12 bireyin DOS hacim değerleri periotron cihazının kalibrasyon değerlerinin dışında kaldığı için konsantrasyon hesaplamaları yapılamadı.

Dişeti oluğu sıvısı hacmi (µl), MCP-1 konsantrasyonu (pg/µl) ve total miktarının (pg/30 sn) gruplara göre dağılımı Çizelge 3.5. ve 3.6.'da verildi. Yapılan değerlendirme sonucunda S ve AP gruplarının DOS hacmi kıyaslandığında fark anlamlıydı ($p<0.05$, Şekil 3.1.A). Ancak LAP ve GAP grupları arasındaki fark önemli bulunmadı ($p>0.05$, Şekil 3.2.A). MCP-1 konsantrasyon değerleri S grubunda AP grubuna göre anlamlı derecede yüksek iken ($p<0.05$, Şekil 3.1.B), LAP ve GAP grupları arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$, Şekil 3.2.B). Sağlıklı bireylerdeki MCP-1 total miktarı ise AP grubundaki ölçümlerden daha düşük düzeyde bulundu ($p<0.05$, Şekil 3.1.C). Generalize agresif periodontitis hastalarındaki total miktar değerleri LAP grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$, Şekil 3.2.C).

Çizelge 3.5. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde DOS hacmi (µl), MCP-1 konsantrasyon (pg/µl) ve MCP-1 total miktar (pg/30 sn) değerleri.

	Sağlıklı	**Agresif Periodontitis**	**İstatistik**	**p**
DOS(µl)				
n	61	68		
Ort±Ss	0.45±0.05	1.68±0.34	Z=-9.789	**0.000**
Min-Maks	0.34- 0.59	1.04-2.52		
Ortanca	0.45	1.66		
MCP-1(pg/µl)				
n	61	68		
Ort±Ss	7.54±1.26	4.79±1.20	Z=-8.539	**0.000**
Min-Maks	5.17-11.43	3.14-8.34		
Ortanca	7.54	4.61		
MCP-1(pg/30sn)				
n	61	80		
Ort±Ss	0.85±0.11	1.96±0.33	Z=-10.166	**0.000**
Min-Maks	0.64-1.20	1.44-3.54		
Ortanca	0.83	1.86		

Mann-Whitney U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

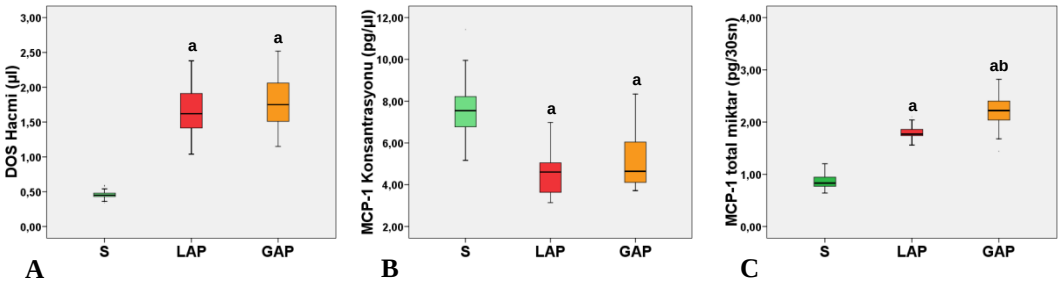


Şekil 3.1. Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP) teşhisi konulmuş bireylerde **A:** DOS hacmi (µl), **B:** MCP-1 konsantrasyon (pg/µl) ve **C:** MCP-1 total miktar (pg/30sn) değerleri (*p<0.05).

Çizelge 3.6. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde DOS hacmi (µl), MCP-1 konsantrasyon (pg/µl) ve MCP-1 total miktar (pg/30sn) değerleri.

	Sağlıklı	Lokalize Agresif Periodontitis	Generalize Agresif Periodontitis	İstatistik	Sd	P
DOS(µl)						
n	61	43	25			
Ort±Ss	0.45±0.053	1.64±0.32[a]	1.77±0.37[a]	K-W= 96.510	2	**0.000**
Min-Maks	0.34- 0.59	1.04-2.38	1.15-2.52			
Ortanca	0.45	1.62	1.75			
MCP-1(pg/µl)						
n	61	43	25			
Ort±Ss	7.54±1.26	4.52±0.98[a]	5.25±1.41[a]	K-W= 75.955	2	**0.000**
Min-Maks	5.17-11.43	3.14-6.98	3.72-8.34			
Ortanca	7.54	4.6	4.64			
MCP-1(pg/30sn)						
n	61	50	30			
Ort±Ss	0.85±0.108	1.78±0.10[a]	2.25±0.39[ab]	K-W= 116.016	2	**0.000**
Min-Maks	0.64-1.20	1.56-2.10	1.44-3.54			
Ortanca	0.83	1.77	2.22			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p<0.05)a:Sağlıklı gruba göre farklılık; b:lokalize agresif periodontitise göre farklılık (Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum



Şekil 3.2. Sağlıklı (S), lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerde **A:** DOS hacmi (µl), **B:** MCP-1 konsantrasyon (pg/µl) ve **C:** MCP-1 total miktar (pg/30 sn) değerleri (a:Sağlıklı gruba göre farklılık; b:lokalize agresif periodontitise göre farklılık).

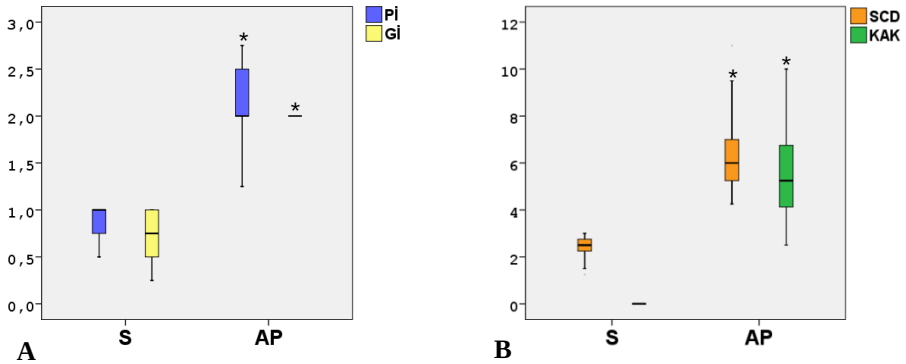
3.2.1. Biyokimyasal-Klinik Bulgular

Periodontal olarak S ve AP teşhisi konulmuş bireylerde örnekleme bölgesinin klinik periodontal parametreleri Çizelge 3.7.'de gösterildi. Agresif periodontitis grubundaki klinik periodontal parametreler sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$), (Şekil 3.3.A, B).

Çizelge 3.7. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde örnekleme bölgesinin klinik periodontal parametreleri.

	Sağlıklı (n=61)	**Agresif Periodontitis** (n=80)	**İstatistik**	**p**
Pİ				
(Ort±Ss)	0.88±0.15	2.13±0.37		
(Min-Maks)	0.50-1.00	1.25-2.75	Z=-10.349	**0.000**
(Ortanca)	1.00	2.00		
Gİ				
(Ort±Ss)	0.71±0.21	1.90±.28		
(Min-Maks)	0.25-1.00	1.00-2.50	Z=-10.528	**0.000**
(Ortanca)	0.75	2.00		
SCD				
(Ort±Ss)	2.38±0.48	6.31±1.27		
(Min-Maks)	1.25-3.00	4.25-11.00	Z=-10.176	**0.000**
(Ortanca)	2.50	6.00		
KAK				
(Ort±Ss)	0.00±0.00	5.39±1.83		
(Min-Maks)	0.00-0.00	2.50-10.00	Z=-10.595	**0.000**
(Ortanca)	0.00	5.25		

Mann-Whitney U testine göre ($p<0.05$)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

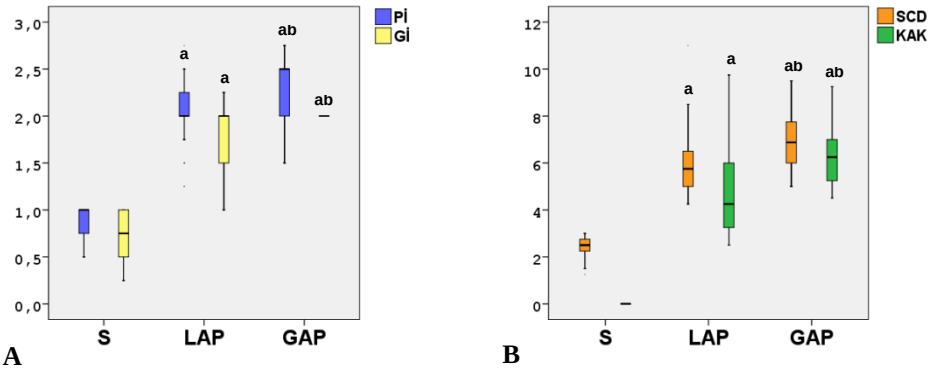


Şekil 3.3. Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP) teşhisi konulmuş bireylerin örnekleme bölgesinin **A:** Plak indeksi (Pİ) ve gingival indeks (Gİ) **B:** Sondlama cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman kaybı (KAK) değerleri (*$p<0.05$).

Çizelge 3.8. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde örnekleme bölgesinin klinik periodontal parametreleri.

	Sağlıklı (n=61)	**Lokalize Agresif Periodontitis** (n=50)	**Generalize Agresif Periodontitis** (n=30)	**İstatistik**	**Sd**	**p**
Pİ						
(Ort±Ss)	0.88±0.15	2.01±0.35[a]	2.34±0.31[ab]			
(Min-Maks)	0.50-1.00	1.25-2.75	1.50-2.75	K-W= 112.079	2	**0.000**
(Ortanca)	1.00	2.00	2.50			
Gİ						
(Ort±Ss)	0.71±0.21	1.83±0.30[a]	2.03±0.21[ab]			
(Min-Maks)	0.25-1.00	1.00-2.25	1.25-2.50	K-W= 113.104	2	**0.000**
(Ortanca)	0.75	2.00	2.00			
SCD						
(Ort±Ss)	2.38±0.48	5.96±1.21[a]	6.88±1.19[ab]			
(Min-Maks)	1.25-3.00	4.25-11.00	5.00-9.50	K-W= 107.810	2	**0.000**
(Ortanca)	2.50	5.75	6.88			
KAK						
(Ort±Ss)	0.00±0.00	4.77±1.78[a]	6.43±1.43[ab]			
(Min-Maks)	0.00-0.00	2.50-9.75	4.50-10.00	K-W= 118.439	2	**0.000**
(Ortanca)	0.00	4.25	6.25			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p<0.05)
a: Sağlıklı gruba göre farklılık; b: lokalize agresif periodontitise göre farklılık
(Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney-U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum



A B

Şekil 3.4. Sağlıklı (S), lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerin örnekleme bölgesinin **A:** Plak indeksi (Pİ) ve gingival indeks (Gİ) **B:** Sondlama cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman kaybı (KAK) değerleri (a: Sağlıklı gruba göre farklılık; b: lokalize agresif periodontitise göre farklılık).

Çizelge 3.8.'de LAP ve GAP teşhisi konulmuş bireylerin örnekleme bölgesine ait klinik periodontal parametre değerleri verildi. Tüm klinik parametrelerin gruplar arasında farklı olduğu gözlendi ($p<0.05$), (Şekil 3.4.A, B).

Agresif periodontitis hastalarında klinik periodontal parametreler ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki Çizelge 3.9.'da verildi.

Çizelge 3.9. Agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde örnekleme bölgesinin klinik periodontal parametreleri ile biyokimyasal parametreleri arasındaki Spearman korelasyonu ($p<0.05$).

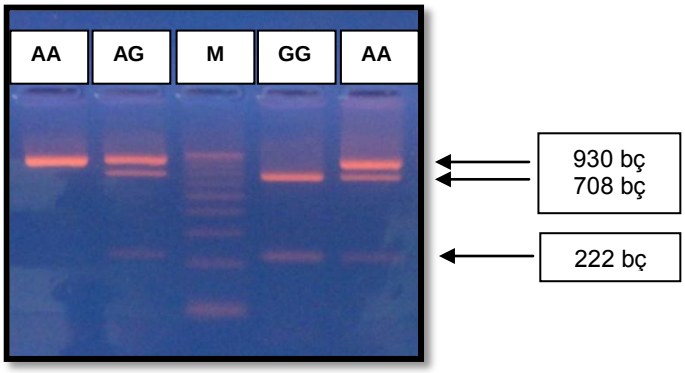
	DOS (µl) n=68	**MCP-1 (pg/30 sn) n=80**	**MCP-1(pg/µl) n=68**
Pİ			
Korelasyon	0.126	0.199	-0.005
p	0.307	**0.077**	0.967
Gİ			
Korelasyon	0.054	0.062	-0.043
p	0.663	0.582	0.729
SCD(mm)			
Korelasyon	0.252	0.265	-0.104
P	**0.038**	**0.017**	0.399
KAK(mm)			
Korelasyon	0.371	0.412	-0.107
p	**0.002**	**0.000**	0.384

3.3. Genetik Bulgular

Çalışmaya katılan periodontal olarak sağlıklı bir kadın bireyde ve GAP teşhisi konulmuş iki kadın bireyde DNA örneklerinin istenilen saflıkta (spektrofotometre 260/280 oranı 1.8< DNA<2.2) olmaması nedeniyle MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi tespit edilmedi.

Monosit kemoatraktan protein-1 geni promotor bölgesi -2518 Adenin (A) nükleotidinin Guanin (G) nükleotidine yer değiştirmesi *PvuII* kesim enzimi ile değerlendirilmiştir. "G" allelinde enzim için bir tanıma bölgesi oluşmakta ve 930 baz çiftlik (bç) DNA parçası 708 bç ve 222 bç olmak üzere iki parçaya ayrılmaktadır. "A" alleli varlığında enzim için bir tanıma bölgesi oluşmadığından 930 bç'lik DNA kısmı tek parça halinde kalmaktadır. "AA" genotipinde olanlar 930 bç'de tek; "GG" genotinde olanlar 708 bç ve 202 bç'de iki; "AG" genotipinde olanlar ise 930 bç, 708 bç ve 202 bç'de olmak üzere üç adet band vermektedir.

Bireylerin genotipleri, jel elektroforezi sonucu elde edilen DNA parçalarının görüntüleri değerlendirilerek tespit edildi. Örnek bir jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.5.'de verildi.



Şekil 3.5. MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin jel elektroforez görüntüleri (M: DNA belirteci).

MCP-1 polimorfizminin periodontal doku sağlığına göre dağılımı Çizelge 3.10. ve Çizelge 3.11.'de gösterildi. Sağlıklı ve AP grupları (Şekil 3.6.A, 3.7.A) ve agresif periodontitisi oluşturan LAP ve GAP alt grupları (Şekil 3.6.B, 3.7.B) arasında mevcut polimorfizm açısından fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çizelge 3.10. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 geni -2518 bölgesindeki polimorfizmin dağılımı.

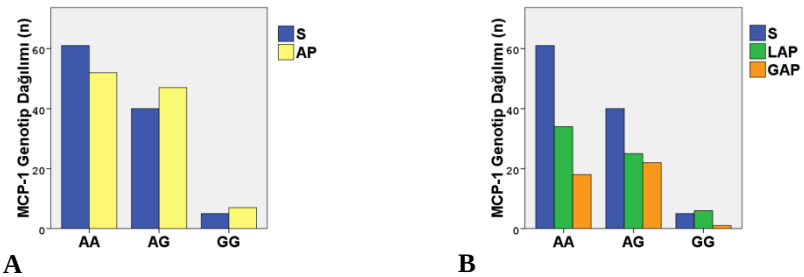
	Sağlıklı (n=106)	**Agresif Periodontitis** (n=106)	**Toplam** (n=212)	**İstatistik**	**Sd**	**P**
Genotip						
AA	61 (%57.5)	52 (%49.1)	113 (%53.3)			
AG	40 (%37.7)	47 (%44.3)	87 (%41.0)	χ^2= 1.613	2	0.446
GG	5 (%4.7)	7 (%6.6)	12 (%5.7)			
Allel Frekansı						
A allel	162 (%76.4)	151 (%71.2)	313 (%73.8)	χ^2= 1.477	1	0.224
G allel	50 (%23.6)	61 (%28.3)	111 (%26.2)			
Allel Taşıyıcılığı						
G allel+ (GG+AG)	45 (%30.8)	54 (%35.3)	99 (%33.1)	χ^2= 1.535	1	0.215

Ki-kare(χ^2) testine göre (p>0.05)

Çizelge 3.11. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 geni -2518 bölgesindeki polimorfizmin dağılımı.

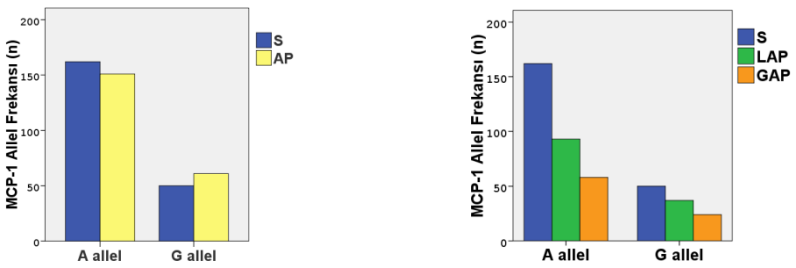
	Sağlıklı (n=106)	**Lokalize Agresif Periodontitis** (n=65)	**Generalize Agresif Periodontitis** (n=41)	**İstatistik**	**Sd**	**P**
Genotip						
AA	61 (%57.5)	34 (%52.3)	18 (%43.9)			
AG	40 (%37. 7)	25 (%38.5)	22 (%53.7)	χ^2= 5.410	4	0.248
GG	5 (%4.7)	6 (%9.2)	1 (%2.4)			
Allel Frekansı						
A allel	162 (%76.4)	93 (%71.5)	58 (%70.7)	χ^2= 1.494	2	0.474
G allel	50 (%23.6)	37 (%28.5)	24 (%29.3)			
Allel Taşıyıcılığı						
G allel+ (GG+AG)	45 (%30.8)	31 (%34.4)	23 (%36.5)	χ^2= 2.249	2	0.325

Ki-kare(χ^2) testine göre (p>0.05)



A **B**

Şekil 3.6. A:Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP), **B**:lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 geni -2518 bölgesindeki polimorfizmin genotip dağılımı.

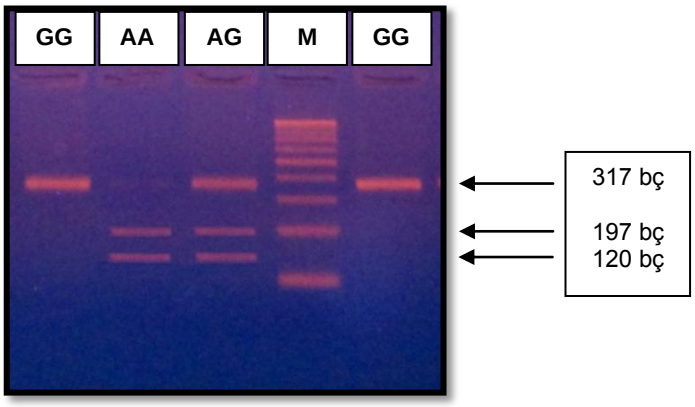


A B

Şekil 3.7. A: Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP), **B:**lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 geni -2518 bölgesindeki polimorfizmin allel frekansı.

CC kemokin reseptör 2 -190 bölgesinde Guanin (G) nükleotidinin Adenin (A) nükleotidine yer değiştirmesi *FokI* kesim enzimi ile değerlendirildi. "A" allelinde enzim için bir tanıma bölgesi oluşmakta ve 317 bç'lik DNA parçası 197 bç ve 120 bç olmak üzere iki parçaya ayrılmaktadır. "G" alleli varlığında enzim için bir tanıma bölgesi oluşmadığından 317 bç'lik DNA kısmı tek parça halinde kalmaktadır. "GG" genotipinde olanlar 317 bç'de tek; "AA" genotinde olanlar 197 bç ve 120 bç'de iki; "AG" genotipinde olanlar ise 317 bç, 197 bç ve 120 bç'de üç adet band vermektedir.

Bireylerin genotipleri jel elektroforezi sonucu elde edilen DNA parçalarının görüntüleri değerlendirilerek tespit edildi. Örnek bir jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.8.'de verildi.



Şekil 3.8. CCR2 -190 G/A polimorfizminin jel elektroforez görüntüleri (M: DNA belirteci).

CC kemokin reseptör 2 polimorfizminin sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerdeki dağılımı Çizelge 3.12.'de gösterildi ve hem genotip dağılım hem de allel frekansı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$, Şekil 3.9.A, 3.10.A).

Çizelge 3.12. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde CCR2 -190 bölgesindeki polimorfizmin dağılımı.

	Sağlıklı (n=106)	**Agresif Periodontitis** (n=106)	**Toplam** (n=212)	**İstatistik**	**Sd**	**P**
Genotip						
AA	0 (%0)	2 (%1.9)	2 (%0.9)			
AG	18 (%16.8)	26 (%24.1)	44 (%20.5)	χ^2= 3.929	2	0.140
GG	89 (%83.2)	80 (%74.1)	169 (%78.6)			
Allel Frekansı						
A allel	18 (%8.4)	30 (%13.9)	48 (%11.2)	χ^2= 3.253	1	0.071
G allel	196 (%91.6)	186 (%86.1)	382 (%88.8)			
Allel Taşıyıcılığı						
A allel+ (AA+AG)	18 (%14.4)	28 (%20.9)	46 (%17.8)	χ^2= 2.649	1	0.104

Ki-kare(χ^2) testine göre (p>0.05)

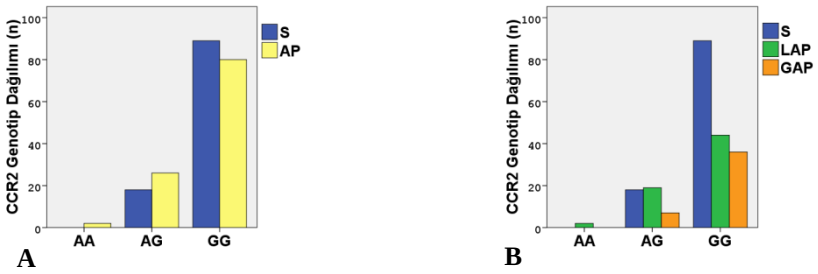
Çizelge 3.13. Sağlıklı, lokalize agresif periodontitis ve generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde CCR2 geni -190 bölgesindeki polimorfizmin dağılımı.

	Sağlıklı (n=107)	**Lokalize Agresif Periodontitis** (n=65)	**Generalize Agresif Periodontitis** (n=43)	**İstatistik**	**Sd**	**P**
Genotip						
AA	0 (%0)	2 (%3.1)	0 (%0)			
AG	18 (%16.8)	19 (%29.2)	7 (%16.3)	χ^2= 9.530	4	0.051
GG	89 (%83.2)	44 (67.7)	36 (%83.7)			
Allel Frekansı						
A allel	18 (%8.4)	23 (%17.7)[a]	7 (%8.1)	χ^2= 8.016	2	**0.018**
G allel	196 (%91.6)	107 (%82.3)	79 (%91.9)			
Allel Taşıyıcılığı						
A allel+ (AA+AG)	18 (%14.4)	21 (%25)[b]	7 (%14)	χ^2= 6.602	2	**0.037**

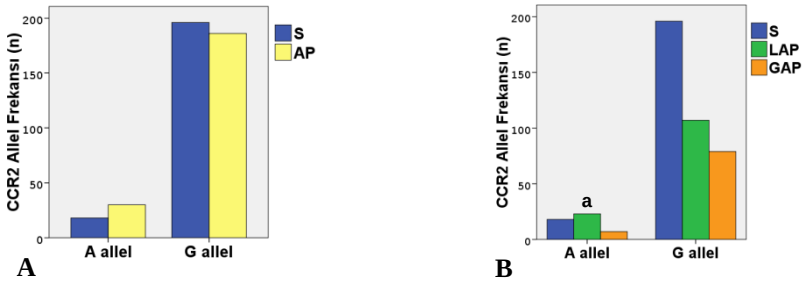
Ki-kare(χ^2) testine göre (p<0.05), ***a:*** *En yüksek A allel frekansı,* ***b:*** *En yüksek A allel taşıyıcılığı olan grup*

Çizelge 3.13.'de LAP ve GAP teşhisi konulmuş bireylerin CCR2 polimorfizmi genotip dağılımı gösterildi ve genotip dağılım gruplar arasında farklı değildi (p>0.05), (Şekil 3.9.B). Allel frekansı ve allel taşıyıcılığı açısından değerlendirildiğinde gruplar arası fark anlamlı bulundu (p<0.05), (Şekil 3.10.B) ve "AA" genotipi sadece LAP teşhisi konulmuş iki bireyde tespit edildi.

Monosit kemoatraktan protein-1 "G" allel ve CCR2 "GG" genotipinin birlikte olması durumunun tüm grup ve alt gruplarda benzer olduğu saptandı (p>0.05). Bu durum sadece kadınlarda değerlendirildiğinde de sonuç farklı değildi (p>0.05).



Şekil 3.9. A: Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP), **B:** lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerde CCR2 geni -190 bölgesindeki polimorfizmin genotip dağılımı.



Şekil 3.10. A: Sağlıklı (S) ve agresif periodontitis (AP), **B:** lokalize agresif periodontitis (LAP) ve generalize agresif periodontitis (GAP) teşhisi konulmuş bireylerde CCR2 geni -190 bölgesindeki polimorfizmin allel frekansı (**a:** En yüksek A allel frekansı olan grup, $p<0.05$).

3.3.1. Genetik-Klinik Bulgular

Agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 polimorfizmi genotip ve allel dağılımının klinik periodontal parametre değerleri Çizelge 3.14. ve 3.15.'de verildi. Generalize agresif periodontitis "G" allel taşıyan bireylerin "G" allel taşımayan bireylere göre SCD değerlerinin daha düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$).

Çizelge 3.16. ve 3.17.'de agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin CCR2 polimorfizmi genotip ve allel dağılımına ait klinik periodontal parametre değerleri gösterildi. Bu değerlere göre AP grubunda "A" allel taşıyan bireylerin "A" allel taşımayan bireylere göre Pİ değerlerinin daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Çizelge 3.14. Agresif periodontitis hastalarında MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi genotip dağılımının klinik periodontal parametre değerleri.

	Lokalize Agresif Periodontitis			**p**	**Generalize Agresif Periodontitis**			**p**	**Agresif Periodontitis**			**p**
	AA (n=34)	AG (n=25)	GG (n=6)		AA (n=18)	AG (n=22)	GG (n=1)		AA (n=52)	AG (n=47)	GG (n=7)	
Pİ												
(Ort±Ss)	2.09±0.23	2.06±0.22	2.03±0.08		2.65±0.27	2.71±0.29	3.00±0.00		2.28±0.36	2.37±0.42	2.17±0.37	
(Min-Maks)	1.50-2.50	1.50-2.50	2.00-2.20	0.88	2.10-3.00	2.00-3.00	3.00-3.00	0.37	1.50-3.00	1.50-3.00	2.00-3.00	0.36
(Ortanca)	2.00	2.00	2.00		2,50	2,60	3.00		2.00	2.50	2.00	
Gİ												
(Ort±Ss)	1.78±0.31	1.77±0.29	1.87±0.22		2.36±0.26	2.42±0.27	2.00±0.00		1.98±0.40	2.07±0.43	1.89±0.20	
(Min-Maks)	1.00-2.00	1.00-2.00	1.50-2.00	0.77	2.00-3.00	2.00-3.00	2.00-2.00	0.29	1.00-3.00	1.00-3.00	1.50-2.00	0.24
(Ortanca)	2.00	2.00	2.00		2.40	2.30	2.00		2.00	2.00	2.00	
SCD (mm)												
(Ort±Ss)	3.12±0.49	3.02±0.36	2.97±0.33		4.81±0.62	4.48±0.85	5.03±0.00		3.70±0.97	3.70±0.97	3.27±0.83	
(Min-Maks)	2.42-5.02	2.45-4.02	2.54-3.35	0.76	4.06-6.51	3.31-7.82	5.03-5.03	0.05	2.42-6.51	2.45-7.82	2.54-5.03	0.50
(Ortanca)	3.06	3.01	3.04		4.67	4.39	5.03		3.31	7.82	3.06	
KAK (mm)												
(Ort±Ss)	1.86±0.82	1.87±0.64	1.68±0.21		4.92±1.08	4.93±1.60	4.43±0.00		2.92±1.73	3.31±1.94	2.07±1.06	
(Min-Maks)	0.94-4.92	1.09-3.36	1.52-2.01	0.94	3.52-7.08	2.27-8.58	4.43-4.43	0.90	0.94-7.08	1.09-8.58	1.52-4.43	0.36
(Ortanca)	1.64	1.67	1.57		4.50	4.35	4.43		2.36	3.01	1.57	

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p>0.05), Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.15. Agresif periodontitis hastalarında MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi "G" allel varlığının klinik periodontal parametre değerleri.

	Lokalize Agresif Periodontitis				**Generalize Agresif Periodontitis**				**Agresif Periodontitis**			
	G Allel+ AG+GG(n=31)	**G Allel-** AA(n=34)	**İstatistik**	**p**	**G Allel+** AG+GG(n=23)	**G Allel-** AA(n=18)	**İstatistik**	**p**	**G Allel+** AG+GG(n=54)	**G Allel-** AA(n=52)	**İstatistik**	**p**
Pİ												
(Ort±Ss)	2.05±0.2	2.09±0.23			2.73±0.29	2.65±0.27			2.34±0.41	2.28±0.36		
(Min-Maks)	1.50-2.50	1.50-2.50	Z=-0.505	0.614	2.00-3.00	2.10-3.00	Z=-1.010	0.313	1.50-3.00	1.50-3.00	Z=-0.636	0.525
(Ortanca)	2	2			2.6	2.5			2.1	2.00		
Gİ												
(Ort±Ss)	1.79±0.28	1.78±0.31			2.40±0.28	2.36±0.26			2.05±0.41	1.98±0.4		
(Min-Maks)	1.00-2.00	1.00-2.00	Z=-0.30	0.976	2.00-3.00	2.00-3.00	Z=-0.096	0.924	1.00-3.00	1.00-3.00	Z=-0.851	0.395
(Ortanca)	2.00	2.00			2.30	2.40			2.00	2.00		
SCD (mm)												
(Ort±Ss)	3.01±0.35	3.12±0.49			4.50±0.84	4.81±0.62			3.65±0.96	3.70±0.97		
(Min-Maks)	2.45-4.02	2.42-5.02	Z=-0.736	0.462	3.31-7.82	4.06-6.51	Z=-2.102	**0.036**	2.45-7.82	2.42-6.51	Z=-0.348	0.728
(Ortanca)	3.01	3.06			4.40	4.67			3.32	3.31		
KAK (mm)												
(Ort±Ss)	1.83±0.58	1.86±0.82			4.91±1.56	4.92±1.08			3.14±1.89	2.92±1.73		
(Min-Maks)	1.09-3.36	0.94-4.92	Z=-0.348	0.728	2.27-8.58	3.52-7.08	Z=-0.447	0.655	1.09-8.58	0.94-7.08	Z=-0.610	0.542
(Ortanca)	1.57	1.64			4.35	4.50			2.45	2.37		

Mann-Whitney U testine göre (p<0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.16. Agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin CCR2 -190 G/A polimorfizmi genotip dağılımlarının klinik periodontal parametre değerleri.

	Lokalize Agresif Periodontitis			p	Generalize Agresif Periodontitis		*p	Agresif Periodontitis			p
	AA(n=2)	AG(n=19)	GG(n=44)		AG(n=7)	GG(n=36)		AA(n=2)	AG(n=26)	GG(n=80)	
Pİ											
(Ort±Ss)	2.00±0.00	2.01±0.05	2.1±0.25		2.73±0.36	2.70±0.27		2.00±0.00	2.20±0.37	2.37±0.4	
(Min-Maks)	2.00-2.00	2.00-2.20	1.50-2.50	0.299	2.10-3.00	2.00-3.00	0.772	2.00-2.00	2.00-3.00	1.50-3.00	0.052
(Ortanca)	2	2	2		3.00	2.55		2	2.00	2.5	
Gİ											
(Ort±Ss)	1.25±0.35	1.76±0.31	1.82±0.26		2.57±0.31	2.35±0.24		1.25±0.35	1.98±0.47	2.06±0.37	
(Min-Maks)	1.00-1.50	1.00-2.00	1.00-2.00	0.075	2.20-3.00	2.00-3.00	0.089	1.00-1.50	1.00-3.00	1.00-3.00	0.050
(Ortanca)	1.25	2	2		2.50	2.3		1.25	2	2	
SCD (mm)											
(Ort±Ss)	2.97±0.22	3.21±0.54	3.01±0.37		5.04±1.31	4.55±0.57		2.97±0.22	3.70±1.14	3.70±0.9	
(Min-Maks)	2.82-3.13	2.63-5.02	2.42-3.83	0.367	4.02-7.82	3.31-6.51	0.459	2.82-3.13	2.63-7.82	2.42-6.51	0.512
(Ortanca)	2.97	2.12	3.01		4.72	4.48		2.97	3.25	3.48	
KAK (mm)											
(Ort±Ss)	1.82±0.76	1.86±0.97	1.84±0.58		6.22±2.15	4.68±0.97		1.82±0.76	3.03±2.38	3.12±1.62	
(Min-Maks)	1.28-2.35	0.94-4.92	1.02-3.55	0.646	3.40-8.58	2.27-6.72	0.087	1.28-2.35	0.94-8.58	1.02-6.72	0.252
(Ortanca)	1.82	1.52	1.67		7.08	4.42		1.82	1.83	2.63	

*Kruskal-Wallis testine göre (p>0.05) *Mann-Whitney U testine göre (p>0.05) Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum (Generalize agresif periodontitis hastalarında "AA" genotipi tespit edilmedi).*

Çizelge 3.17. Agresif periodontitis hastalarında CCR2 -190 G/A polimorfizmi “A” allel varlığının klinik periodontal parametre değerleri.

	Lokalize Agresif Periodontitis				**Generalize Agresif Periodontitis**				**Agresif Periodontitis**			
	A Allel+ AG+AA(21)	**A Allel-** GG(44)	**İstatistik**	**p**	**A Allel+** AG+AA(7)	**A Allel-** GG(36)	**İstatistik**	**p**	**A Allel+** AG+AA(28)	**A Allel-** GG(80)	**İstatistik**	**p**
Pİ												
(Ort±Ss)	2.00±0.44	2.10±0.25			2.73±0.36	2.70±0.27			2.18±0.36	2.37±0.4		
(Min-Maks)	2.00-2.20	1.50-2.50	Z=-1.548	0.122	2.10-3.00	2.00-3.00	Z=-0.289	0.772	2.00-3.00	1.50-3.00	Z=-2.311	**0.021**
(Ortanca)	2.00	2.00			3.00	2.55			2.00	2.5		
Gİ												
(Ort±Ss)	1.71±0.34	1.82±0.26			2.57±0.31	2.35±0.24			1.93±0.5	2.06±0.37		
(Min-Maks)	1.00-2.00	1.00-2.00	Z=-1.150	0.250	2.20-3.00	2.00-3.00	Z=-1.700	0.089	1.00-3.00	1.00-3.00	Z=-1.557	0.119
(Ortanca)	2.00	2.00			2.50	2.30			2.00	2.00		
SCD (mm)												
(Ort±Ss)	3.19±0.52	3.01±0.37			5.04±1.31	4.55±0.57			3.65±1.12	3.70±0.9		
(Min-Maks)	2.63-5.02	2.42-3.83	Z=-1.284	0.199	4.02-7.82	3.31-6.51	Z=-0.740	0.459	2.63-7.82	2.42-6.51	Z=-0.512	0.609
(Ortanca)	3.12	3.01			4.72	4.48			3.23	3.48		
KAK (mm)												
(Ort±Ss)	1.86±0.94	1.84±0.58			6.22±2.15	4.68±0.97			2.95±2.31	3.12±1.62		
(Min-Maks)	0.94-4.92	1.02-3.55	Z=-0.933	0.351	3.40-8.58	2.27-6.72	Z=-1.711	0.087	0.94-8.58	1.02-6.72	Z=-1.483	0.138
(Ortanca)	1.52	1.67			7.08	4.42			1.83	2.63		

Mann-Whitney U testine göre (p<0.05). Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

3.3.2. Genetik-Biyokimyasal Bulgular

Agresif periodontitis (Çizelge 3.18.), LAP (Çizelge 3.19.) ve GAP (Çizelge 3.20.) teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin DOS MCP-1 düzeylerine bir etkisi olmadığı gözlendi (p>0.05).

Çizelge 3.18. Agresif periodontitis hastalarında MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi "AA", "AG", "GG" genotipe sahip bireylerin biyokimyasal parametreleri.

	AA	AG	GG	İstatistik	Sd	P
DOS(µl)						
n	41	24	2			
Ort±Ss	1.71±0.35	1.69±0.34	1.23±0.02	K-W= 3.843	2	0.146
Min-Maks	1.04-2.52	1.15-2.17	1.21-1.24			
Ortanca	1.67	1.69	1.23			
MCP-1(pg/30sn)						
n	44	31	4			
Ort±Ss	1.97±0.39	1.96±0.28	1.86±0.18	K-W= 0.388	2	0.824
Min-Maks	1.44-3.54	1.68-2.82	1.68-2.10			
Ortanca	1.83	1.86	1.83			
MCP-1(pg/µl)						
n	41	24	2			
Ort±Ss	4.75±1.2	4.78±1.29	5.78±0.32	K-W= 2.172	2	0.337
Min-Maks	3.23-8.28	3.14-8.34	5.55-6.00			
Ortanca	4.61	4.45	5.78			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p>0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.19. Lokalize agresif periodontitis MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi "AA", "AG", "GG" genotipe sahip bireylerin biyokimyasal parametreleri.

	AA	AG	GG	İstatistik	Sd	P
DOS(µl)						
n	27	15	1			
Ort±Ss	1.64±0.34	1.67±0.32	1.21	K-W= 1.881	2	0.390
Min-Maks	1.04-2.38	1.15-2.17	1.21			
Ortanca	1.62	1.62	1.21			
MCP-1(pg/30sn)						
n	28	19	3			
Ort±Ss	1.79±0.11	1.78±0.09	1.86±0.22	K-W= 0.269	2	0.874
Min-Maks	1.56-2.04	1.68-1.98	1.68-2.10			
Ortanca	1.74	1.8	1.80			
MCP-1(pg/µl)						
n	27	15	1			
Ort±Ss	4.54±1.04	4.42±0.91	5.55	K-W= 1.452	2	0.484
Min-Maks	3.23-6.98	3.14-5.95	5.55			
Ortanca	4.64	4.36	5.55			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p>0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Çizelge 3.20. Generalize agresif periodontitis MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi "AA", "AG", "GG" genotipe sahip bireylerin biyokimyasal parametreleri.

	AA	AG	GG	İstatistik	Sd	P
DOS(µl)						
n	14	9	1			
Ort±Ss	1.83±0.37	1.74±0.39	1.24	K-W= 2.105	2	0.349
Min-Maks	1.15-2.52	1.18-2.13	1.24			
Ortanca	1.86	1.99	1.24			
MCP-1(pg/30sn)						
n	16	12	1			
Ort±Ss	2.3±0.48	2.24±0.25	1.86	K-W= 2.145	2	0.342
Min-Maks	1.44-3.54	1.98-2.82	1.86			
Ortanca	2.25	1.98	1.86			
MCP-1(pg/µl)						
n	14	9	1			
Ort±Ss	5.13±1.41	5.40±1.63	6.00	K-W= 0.566	2	0.754
Min-Maks	3.81-8.28	3.72-8.34	6.00			
Ortanca	4.42	4.64	6.00			

K-W: Kruskal-Wallis testine göre (p>0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Monosit kemoatraktan protein-1 -2518 A/G polimorfizmi mutant "G" allel taşıyıcılığının DOS MCP-1 düzeylerine olan olası etkisi LAP, GAP ve AP gruplarında değerlendirildi ve "G" allel taşıyıcılığının DOS enzim düzeyine etkisi olmadığı belirlendi (p>0.05), (Çizelge 3.21.).

Çizelge 3.21. Agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin MCP-1 -2518 A/G polimorfizmlerinin "G" allel taşıyıcılığının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi.

	Lokalize Agresif Periodontitis				**Generalize Agresif Periodontitis**				**Agresif Periodontitis**			
	G Allel+	**G Allel-**	**İstatistik**	**p**	**G Allel+**	**G Allel-**	**İstatistik**	**p**	**G Allel+**	**G Allel-**	**İstatistik**	**p**
	AG+GG(31)	AA(34)			AG+GG(23)	AA(18)			AG+GG(54)	AA(52)		
DOS(µl)												
n	16	27			10	14			26	41		
Ort±Ss	1.64±0.33	1.64±0.34	Z= -0.226	0.821	1.69±0.4	1.83±0.37	Z= -0.791	0.429	1.66±0.35	1.71±0.35	Z= -0.592	0.554
Min-Maks	1.15-2.17	1.04-2.38			1.18-2.13	1.15-2.52			1.15-2.17	1.04-2.52		
Ortanca	1,59	1,62			1,78	1,86			1,59	1,67		
MCP-1 (pg/30sn)												
n	22	28			13	16			35	44		
Ort±Ss	1.79±0.11	1.79±0.11	Z= -0.270	0.787	2.22±0.26	2.3±0.48	Z= -0.572	0.568	1.95±0.27	1.97±0.39	Z= -0.397	0.691
Min-Maks	1.68-2.10	1.56-2.04			1.86-2.82	1.44-3.54			1.68-2.82	1.44-3.54		
Ortanca	1,8	1,74			2,16	2,25			1,86	1,86		
MCP-1 (pg/µl)												
n	16	27			10	14			26	41		
Ort±Ss	4.49±0.92	4.55±1.04	Z= -0.188	0.851	5.46±1.55	5.13±1.41	Z= -0.527	0.598	4.86±1.27	4.75±1.2	Z= -0.309	0.757
Min-Maks	3.14-5.95	3.23-6.98			3.72-8.34	3.81-8.28			3.14-8.34	3.23-8.28		
Ortanca	4,42	4,64			5,24	4,42			4,55	4,61		

Mann-Whitney U testine göre (p>0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

3.4. MCP-1 Gen Ekspresyon Bulguları

MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin araştırıldığı çalışmanın sonuçlarına göre 7 agresif periodontitis (6 kadın, 1 erkek) ve 5 periodontal sağlıklı (5 kadın) bireyde homozigot "GG" genotip tespit edildi. Bir agresif periodontitis hastasının RNA'sının istenilen saflıkta (spektrofotometre 260/280 oranı 1.8<RNA<2.2) olmaması nedeniyle gen ekspresyon çalışmasına dahil edilmedi. MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin gen ekspresyon düzeyine etkisinin araştırıldığı çalışmaya, "GG" genotipi ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 9 "AG" ve 11 "AA" genotipe sahip agresif periodontitis; 6 "AG" ve 5 "AA" genotipe sahip sağlıklı birey olmak üzere toplam 40 birey dahil edildi. Bireylerin yaş dağılımları Çizelge 3.22.'de verildi.

Çizelge 3.22. "AA", "AG", "GG" genotipe sahip agresif periodontitis ve sağlıklı bireylerin yaş dağılımları.

	AA	AG	GG	İstatistik	P
Agresif periodontitis					
n	11	9	6		
Ort±Ss	22.55±2.88	23.44±2.13	23.83±0.98	F= 0.706	0.504
Min-Maks	19-28	21-26	23-25		
Sağlıklı					
n	5	6	5		
Ort±Ss	24.00±0.71	24.00±0.89	24.00±1.00	F= 0.000	1.000
Min-Maks	23-25	23-25	23-25		

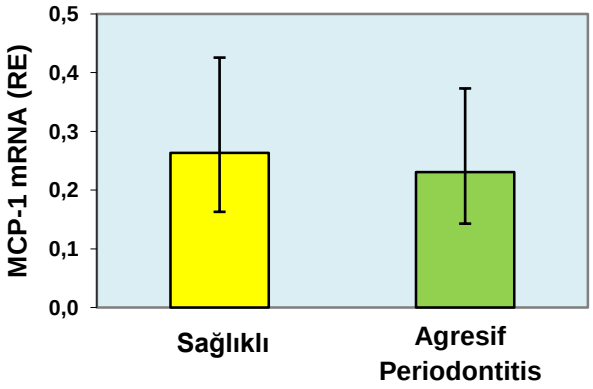
F: One-way ANOVA testine göre (p>0.05)
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

MCP-1 gen ekspresyonunun sağlıklı bireylerde ve agresif periodontitis hastalarında benzer olduğu gözlendi (p>0.05), (Çizelge 3.23.), (Şekil 3.11.).

Çizelge 3.23. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 gen ekspresyon değerleri.

	Sağlıklı	Agresif Periodontitis	İstatistik	p
MCP-1				
n	16	26		
Geometrik Ortalama	0.26	0.23	t=0.216	0.830
(%95 Güven Aralığı)	(0.16-0.43)	(0.14-0.37)		

t: Bağımsız örneklerde t testine göre (p>0.05)
(Geometrik Ortalama: logaritmik olarak transforme edilmiş verilerin ortalamalarının, geri transforme edilmiş halidir).



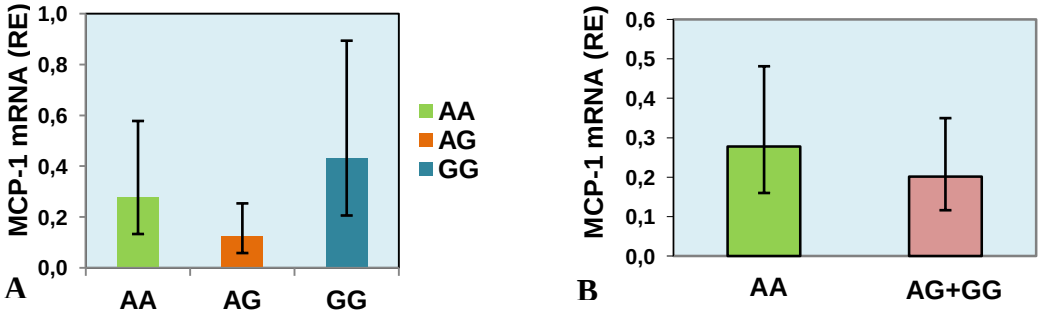
Şekil 3.11. Sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerde MCP-1 rölatif gen ekspresyon (RE) değerleri *(p>0.05). Veriler, geometrik ortalama ve %95 güven aralığı değerlerini göstermektedir.*

Agresif periodontitis hastalarında, "AA", "AG", "GG" genotipinin ve "G" allel taşıyıcılığının MCP-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi olmadığı tespit edildi (p>0.05), (Çizelge 3.24., Şekil 3.12.A, B).

Çizelge 3.24. "AA", "AG", "GG" genotipe sahip agresif periodontitis hastalarının MCP-1 gen ekspresyon değerleri.

	AA	AG	GG	İstatistik	P
MCP-1					
n	11	9	6		
Geometrik Ortalama	0.28	0.12	0.43	F= 0.985	0.389
(%95 Güven Aralığı)	(0.13-0.58)	(0.06-0.25)	(0.21-0.89)		

F: Tek yönlü varyans analizine göre (p>0.05)
(Geometrik Ortalama: logaritmik olarak transforme edilmiş verilerin ortalamalarının, geri transforme edilmiş halidir).



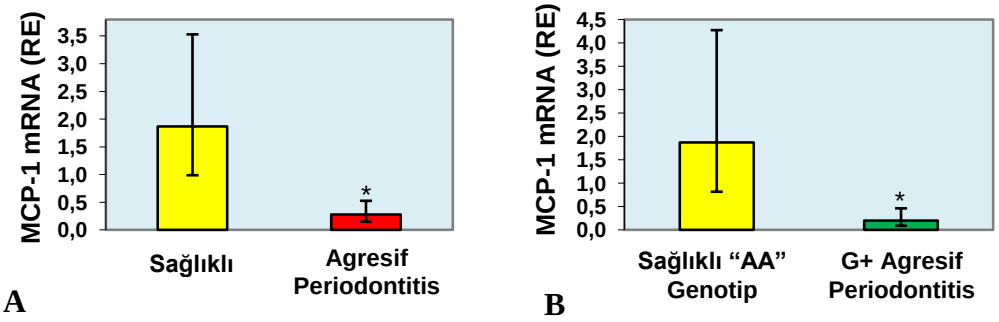
Şekil 3.12. A)"AA", "AG", "GG" genotipe ve **B)**"G allel" taşıyıcılığına (AG+GG) sahip agresif periodontitis hastalarının MCP-1 rölatif gen ekspresyon (RE) değerleri *(p>0.05). Veriler, geometrik ortalama ve %95 güven aralığı değerlerini göstermektedir.*

Agresif periodontitis ve sağlıklı bireylerin MCP-1 gen ekspresyon değerlerinin genotip ve allel taşıyıcılığına göre dağılımları hesaplandı (Çizelge 3.25.), (Şekil 3.13.A, B). "G allel" taşıyan AP hastalarının MCP-1 gen ekspresyon değerlerinin, homozigot normal "AA" genotipine sahip sağlıklı bireylere göre daha düşük düzeylerde olduğu tespit edildi (F=5.419, p=0.032, Şekil 3.13.B).

Çizelge 3.25."AA", "AG", "GG" genotipe sahip ve "G" allel taşıyan sağlıklı ve agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerin MCP-1 gen ekspresyon değerleri.

	Sağlıklı	Agresif Periodontitis	İstatistik	p
AA Genotip				
n	5	11		
Geometrik Ortalama	1.87	0.28	F=6.146	**0.027**
(%95 Güven Aralığı)	(0.99-3.53)	(0.15-0.52)		
AG Genotip				
n	6	9		
Geometrik Ortalama	0.20	0.12	F=0.323	0.580
(%95 Güven Aralığı)	(0.10-0.41)	(0.06-0.24)		
GG Genotip				
n	5	6		
Geometrik Ortalama	0.05	0.43	F=2.686	0.136
(%95 Güven Aralığı)	(0.02-0.13)	(0.16-1.12)		
G allel+ (AG+GG)				
n	11	15		
Geometrik Ortalama	0.11	0.20	F=0.654	0.427
(%95 Güven Aralığı)	(0.06-0.19)	(0.11-0.36)		

F: Tek yönlü varyans analizine göre (p<0.05)
(Geometrik Ortalama: logaritmik olarak transforme edilmiş verilerin ortalamalarının, geri transforme edilmiş halidir).



Şekil 3.13. A: "AA" genotipe sahip agresif periodontitis ve sağlıklı bireylerin, **B:** "G" allel taşıyan agresif periodontitis ve "AA" genotipe sahip sağlıklı bireylerin MCP-1 rölatif gen ekspresyon (RE) değerleri, *(p<0.05). Veriler, geometrik ortalama ve %95 güven aralığı değerlerini göstermektedir.*

4. TARTIŞMA

Günümüzde agresif periodontitis gelişiminde rol oynayan immun sistemdeki defektler hakkında bilgilerimiz giderek artmakla birlikte, henüz AP patogenezinde rol oynayan ve bireyin konak cevabındaki farklılıkları açıklayabilecek patolojik mekanizmalar hakkında bilgilerimiz yeterli değildir. Bu çalışmada Türk populasyonunda MCP-1'in -2518 ve reseptörü olan CCR2'nin -190 bölgelerindeki polimorfizmler ve AP ile olası ilişkisi değerlendirildi. Bilgilerimiz dahilinde bu araştırma MCP-1 ve CCR2 polimorfizmlerinin Türk toplumunda AP hastalarında araştırıldığı ve sağlıklı kontrollerle kıyaslandığı ilk çalışmadır.

4.1. Klinik Parametreler

Hormonal değişimler, yaş, sigara gibi faktörlerin periodontal doku sağlığına olası etkileri nedeniyle, bu araştırma yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 107 sağlıklı ve 108 agresif periodontitis teşhisi konulmuş sigara kullanmayan bireyler üzerinde yürütüldü. Böylece çevresel ve kazanılmış faktörlerin elimine edilerek çalışma gruplarının biraz daha dengeli ve homojen olmasına dikkat edildi. Periodontal doku yıkımının bir sonucu olarak AP hastalarının S grubuna göre daha az sayıda dişe sahip olduğu gözlendi. Agresif periodontitis hastaları daha sonra LAP ve GAP olmak üzere alt gruplara ayrıldığında (Armitage 1999), cinsiyet açısından fark olmadığı ancak GAP hastalarının ilerlemiş periodontal hastalıkla paralel olarak daha az sayıda dişe sahip olduğu ve yaş ortalamasının LAP ve sağlıklı gruba göre daha fazla olduğu gözlendi.

Sigaranın mikrobiyal kompozisyonda değişime (Haffajee ve Socransky 2001) neden olduğu, aynı zamanda damarsal yapı, nötrofil/monosit aktiviteleri, adezyon molekül ekspresyonu ve antikor üretimini içeren konak cevabına olan etkileri ile periodontal hastalık için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (Bergstrom ve Eliasson 1987, Sopori 2002). Bu nedenle sigarayı bırakmış ve/veya sigara içen bireyler bu çalışma kapsamına alınmadı.

Bu araştırmada periodontal hastalık şiddeti ile artış gösteren klinik periodontal parametrelerin LAP ve GAP gruplarında da farklılık gösterdiği tespit edildi. Özellikle KAK ve SCD ≥6 mm olan alanların yüzdesi sırasıyla LAP grubunda %10.59 ve %8.36 iken GAP grubunda bu oran %35.61 ve %24.39 olarak saptandı.

Bu veriler en fazla doku yıkımının, hastalığın tabiyatına paralel olarak, GAP grubunda olduğunu göstermektedir.

4.2. Biyokimyasal Parametreler

Birçok sistemik hastalığın tanımlanmasında biyolojik sıvıların ve dokuların laboratuvar analizleri kullanılmaktadır (Lamster ve Novak 1992). Periodontoloji alanında yapılan çalışmalar ise hastalık sürecinin anlaşılması ve aynı zamanda mevcut klinik limitasyonların üstesinden gelinmesi için güvenilir, teşhise yönelik testlerin geliştirilmesi amacıyla DOS analizi üzerinde durmaktadır (Kleinberg ve Golub 1985, Persson ve ark. 1990, Johnson 1991, Page 1992). Bu amaçla periodontal hastalıkta savunma sistemi bileşenlerinin (Anil ve ark. 2013), doku yıkım ürünlerinin (Leppilahti ve ark. 2013), akut faz proteinlerinin (Becerik ve ark. 2012), enflamatuvar belirteçlerin (Kurtis ve ark. 2005), sitokinlerin (Sakai ve ark. 2006) ve enzimlerin (Hernandez ve ark. 2010) birçoğu DOS'da analiz edilmiştir.

Dişeti oluğu sıvısı hacmi

Dişeti oluğu sıvısı fizyolojik bir sıvıdır ve birleşim epitelinin altındaki kan damarları ağından köken alan enflamatuvar eksuda olarak tanımlanır (Lamster ve Novak 1992). Ancak, DOS çok az miktarda elde edilebilmekte ve geniş bir hacimsel aralıkta değişim göstermektedir (Lamster ve ark. 1991, Smith ve Geegan 1991, Griffiths ve ark. 1992, Page 1992, Ozkavaf ve ark. 2000). Dişeti oluğu sıvısının toplanması amacıyla kapiller tüp (Pradeep ve ark. 2009a), gingival yıkama (Guentsch ve ark. 2011) ve kağıt şerit/koni (Ustun ve Alptekin 2007) gibi farklı yöntemler ile kullanılmaktadır. Bu araştırmada DOS'un daha kısa zamanda ve kolay olarak toplanması amacıyla (Gupta ve ark. 2013) 2mmx7mm sabit boyuttaki kağıt şeritler kullanıldı. Bu yöntem kağıt şeritlerin ağırlıklarının belirlenmesi veya elektriksel kapasitelerinin Periotron cihazı ile ölçülmesi sonucu hacimlerinin hesaplanabilmesine olanak vermektedir (Gustafsson 1996). Ancak, bu uygulamanın oda sıcaklığının olası muhtemel etkisi, nem miktarı, örneklerin buharlaşması, kağıt şeritlerin cihazda konumlandırılma şekli, sıvının cihazda bırakmış olabileceği kalıntı miktarı, cihaz kalibrasyonunun devamlılığı ve güvenilirliği (Suppipat ve Suppipat 1977, Garnick ve ark. 1979, Griffiths 2003, Tozum ve ark. 2004a, Gupta ve ark. 2013) ve 0.7 µl'den daha fazla hacimlerin ölçülememesi gibi bazı limitasyonları olmasına karşın, literatürde birçok çalışmada DOS toplanması amacıyla yaygın

olarak kullanılmaktadır (Tozum ve ark. 2004b, Guncu ve ark. 2006, Ustun ve Alptekin 2007, Baltacioglu ve ark. 2013).

Dişeti oluğu sıvısı hacminin gün içinde farklı zamanlarda değişiklik gösteren (Bergmann ve Deinzer 2008) "sirkadyen ritim" içerisinde olduğu saptanmıştır (Bulkacz ve Carranza 2009). Ancak, Gunday ve ark. (2013) sirkadyen periyodun DOS hacmini etkilemediğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmada tüm bireylerden DOS örneklemelerinin daha standart şartlar altında toplanması amacıyla günün 10^{00} ile 13^{00} saatleri arası tercih edilmiştir.

Literatürde DOS toplanmasında ilk örneklerin durağan "static" (Lamster ve ark. 1989) veya "resting" (Atici ve ark. 1998) hacim olarak ele alındığı ve ikinci örneklerin de sıvı akışı "flow" (Ozkavaf ve ark. 2000) olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür. Günümüze kadar yapılan çalışmalar DOS hacmi açısından değerlendirildiğinde, çalışmaların %85'inde ilk örnekleme sonuçları, sulkus/cep içerisine olan sıvı akış oranı "flow rate/flow" olarak rapor edilmiştir. Aslında klinik pratikte tek seferde yapılan örneklemelerin bu şekilde değerlendirilmesi, daha önceki çalışmalarda "static" DOS örneği (Lamster ve ark. 1989) veya "resting " hacmin sıfır olması durumunda doğru olmaktadır. Ancak, periodontal sağlıkta bile durağan miktar sıfır olmamakta, periodontal cep derinliğine paralel olarak artmaktadır. Bu çalışmada da DOS analizinde yapılan ilk örneklemeler kullanılmış ve DOS miktarının aslında "flow" ve "resting " hacmin toplamı olduğu bilgisi (Goodson 2003) esas alınmıştır.

Dişeti oluğu sıvısı örneklerinin kağıt şerit ile toplanmasında sulkus dışı "extracrevicular" ve sulkus içi "intracrevicular" olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Sulkus içi yöntem sıklıkla kullanılmakla birlikte kağıt şerit sulkus içine yerleştirildiği için, sulkus dışı yönteme göre daha hassas olmakta (Loe ve Holm-Pedersen 1965, Griffiths 2003) ve kağıt şeridin sulkus/periodontal cep içerisine yerleştirilme derinliğine göre de alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlar modifiye sulkus içi "modified intracrevicular" yöntem (Loe ve Holm-Pedersen 1965, Nowicki ve ark. 1981, Stoller ve ark. 1990) ve periodontal cep tabanında direç hissedilinceye kadar ilerletilmesi derin sulkus içi "deep intracrevicular" (Griffiths 2003) yöntem olmaktadır. Derin sulkus içi yöntem, gingival sulkusta doku hasarına neden olabilmekte ve buna bağlı DOS akış hızı değişmektedir ve periodontal cep derinlikleri farklı olabileceği için standardizasyonun sağlanması zor olmaktadır (Mann 1963). Bu çalışmada DOS örnekleri kağıt şeritler sulkus içine 1 mm

yerleştirilerek "modifiye sulkus içi yöntem" ile toplandı ve gingival sulkus/periodontal cepte doku hasarı oluşturmamasına dikkat edildi. Dişeti oluğu sıvısı her bir örnek için 30 sn süre ile sabit zamanda elde edildi (Lamster ve ark. 1988, Lamster 1997, Lamster ve Ahlo 2007). Bu araştırmada 80 S ve 80 AP olmak üzere 160 bireyden DOS toplandı, ancak AP grubunda 12 örneğin DOS hacmi Periotron cihazının kalibrasyon değerleri dışında kalması nedeniyle ölçümü yapılamadı. Toplanan DOS hacminin, AP grubunda S kontrollere göre daha yüksek olduğu saptandı, ancak LAP ve GAP arasında kıyaslandığında gruplar arasında farklılık tespit edilmedi. Elde edilen bu sonuç sağlıklı periodontal dokularda DOS hacminin düşük düzeylerde olduğu (Ozkavaf ve ark. 2000, Ay ve ark. 2012) görüşünü desteklemektedir.

Monosit kemoatraktan protein-1 düzeyleri

Periodontal hastalıkta birçok enzimin, doku yıkım ürünlerinin, sitokin ve kemokinler gibi birçok enflamatuvar belirteçlerin DOS'daki miktarının arttığı gösterilmiştir (Sakai ve ark. 2006). Monositler için güçlü bir kemoatraktan olan MCP-1'in, monositlerin enflamasyon alanına yönlendirilmesinde ve aktivasyonunda rol oynadığı, kronik enflamasyonlu dişeti dokusunda eksprese edildiği (Gemmell ve ark. 2001, Garlet ve ark. 2003) ve enflamasyon şiddeti arttıkça MCP-1 eksprese eden hücrelerin sayıca artış gösterdiği bildirilmiştir (Yu ve ark. 1993, Yu ve Graves 1995). Periodontal hastalık gelişiminde bireylerin monosit cevabındaki faklılıkların periodontal dokuların yıkımında belirleyici olduğu bilindiğinden (Champagne ve ark. 2003) bu araştırmada S ve AP gruplarında DOS MCP-1 düzeyleri araştırılmış ve konsantrasyon ve total enzim aktiviteleri hesaplanmıştır.

Klinik pratikte birçok vücut sıvısının değerlendirilmesi konsantrasyon hesaplamasına göre yapılmaktadır (Yamalik ve ark. 2000). Dişeti oluğu sıvısı enzim düzeylerinin konsantrasyon olarak hesaplanmasında toplanan sıvının birim hacmindeki enzim miktarı değerlendirilmektedir (Huynh ve ark. 1992). Toplanan bu sıvı miktarının ölçülmesinde Periotron cihazı gibi elektronik hacim ölçerler kullanılmasına karşın (Griffiths 2003), cihaz ile ilgili limitasyonlar ve buharlaşmaya bağlı sıvı kaybı (Gupta ve ark. 2013) gibi faktörler hacim hesaplamasını etkileyebilmektedir. Ayrıca, toplanan sıvı hacminin enflamasyon şiddeti ile artması da (Ozkavaf ve ark. 2000) konsantrasyon düzeylerinin daha düşük düzeyde hesaplanmasına neden olabilmektedir. Literatürde DOS MCP-1 konsantrasyonunun

AP (Kurtis ve ark. 2005) ve LAP (Shaddox ve ark. 2011) hastalarında değerlendirildiği çalışmalarda, hastalıklı bölgelerdeki düzeyin sağlıklı bölgelere benzer olarak eşit (Kurtis ve ark. 2005) veya daha düşük (Shaddox ve ark. 2011) düzeylerde olduğu rapor edilmiştir. DOS enzim düzeylerinin konsantrasyon olarak hesaplaması ve değerlendirilmesi çalışmaların en önemli limitasyonları olarak değerlendirilebilir. Bu araştırmada da sadece konsantrasyon verileri incelendiğinde, DOS MCP-1 konsantrasyonunun AP hastalarında S kontrollere göre anlamlı derece daha düşük olduğu, LAP ve GAP hastaları arasında farklı olmadığı belirlendi. Elde edilen bu sonucun enflamatuvar periodontal hastalığa bağlı olarak artan DOS hacmi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma DOS konsantrasyon hesaplamalarının enzim düzeylerini tam olarak yansıtmadığı (Lamster ve ark. 1986) bilgisini desteklemektedir.

Literatürde periodontitis hastalarında DOS MCP-1 miktarını değerlendiren çok sayıda araştırma olmasına karşın (Lee ve ark. 2003a, Kurtis ve ark. 2005, Pradeep ve ark. 2009a, Thunell ve ark. 2010, Tymkiw ve ark. 2011, Gupta ve ark. 2013), AP hastalarındaki düzeylerinin incelendiği çalışma sayısı sınırlıdır (Emingil ve ark. 2004, Kurtis ve ark. 2005). Kurtiş ve ark. (2005) sigara içmeyen LAP ve GAP hastalarını birlikte değerlendirmişler ve AP hastalarındaki DOS MCP-1 total miktarının sağlıklı gruba göre daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Sadece GAP teşhisi konulmuş sigara içmeyen hastaların sağlıklı kontrollerle kıyaslandığı bir diğer araştırmada DOS MCP-1 total enzim miktarının doku yıkım şiddetini yansıtan önemli bir parametre olduğu tespit edilmiştir (Emingil ve ark. 2004). Bu çalışmada da çalışma populasyonu sigara kullanmayan bireylerden oluşturulmuş ve S gruptaki DOS MCP-1 total miktarının AP grubundan daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Literatürdeki klinik çalışmalar (Kabashima ve ark. 2002, Garlet ve ark. 2003, Pradeep ve ark. 2009a) ve bu araştırmanın biyokimyasal bulguları, enflamatuvar doku yıkımında MCP-1 pozitif boyanan hücre oranının (Kurtis ve ark. 2006) ve dişeti fibroblastlarında MCP-1 ekspresyonunun (Hanazawa ve ark. 1993, Tonetti ve ark. 1994) sağlıklı kontrollere göre artış gösterdiğini rapor eden *in vitro* araştırmaları desteklemektedir. Bu çalışmada ayrıca LAP ve GAP hastalarındaki MCP-1 total miktar düzeyleri de kıyaslanmış ve tüm klinik parametreler ve total enzim aktivitelerinin GAP grubunda en yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır.

Bilgilerimiz dahilinde bu araştırma LAP ve GAP hastalarında DOS MCP-1 enzim düzeylerinin kıyaslandığı ilk araştırmadır.

Yapılan çalışmalarda GAP hastalarının serum ve DOS akut faz proteinlerinin (Salzberg ve ark. 2006, Becerik ve ark. 2012), plazma atorejenik lipoprotein belirteçlerinin (Rufail ve ark. 2007), proenflamatuvar bir sitokin olan IL-17 serum konsantrasyonunun (Schenkein ve ark. 2010) LAP ve S kontrollere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum generalize lokal doku yıkımının, bozulmuş PMNL fonksiyonları ile artmış enflamasyon ve kemik kaybı ile sonuçlanacağını ve aynı zamanda sistemik enflamatuvar cevabı da etkileyebileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bu araştırma sonucuna göre periodontal olarak en şiddetli yıkımın görüldüğü GAP grubundaki DOS MCP-1 total miktarının LAP grubundan daha fazla olması, periodontitisin generalize formunda doku yıkımına paralel olarak artan monositik hiperenflamatuvar cevabın (Champagne ve ark. 2003) etkisi ile açıklanabilir.

Bu çalışmada ayrıca klinik parametreler ve total enzim aktiviteleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Emingil ve ark. (2004)'ın bulguları ile uyumlu olarak dişetindeki enflamatuvar değişim dışındaki Pİ, SCD ve KAK gibi parametrelerin DOS MCP-1 total miktarı ile pozitif ilişki gösterdiği saptandı. Ayrıca, literatürde periodontal doku yıkımının tespit edildiği dişetlerinden alınan biyopsilerde MCP-1 ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada bu proteinin monositik infitrasyonun artışından sorumluğu olduğu gösterilmiştir (Hanazawa ve ark. 1993). Bu sonuçlar, MCP-1'in periodontal doku yıkım şiddetinin artışında önemli bir bulgu olabileceği görüşünü desteklemektedir.

4.3. Genetik Bulgular ve Agresif Periodontitis

Periodontal hastalıkların patogenezinin anlaşılmasında konak bakteri arasındaki ilişkinin rolü önemlidir. Periodontopatojenlere karşı gelişen konak cevabı ve devamındaki enflamatuvar sürecin sonunda periodontal dokularda yıkım gelişebilmektedir. Ancak çoğu olguda patojenik bakterilerin tek başına periodontal dokularda yıkıma neden olmadığı, her bir bireyin bakteriyel atağa karşı cevabının farklı olduğu ve çoğu bireyde periodontal hastalığın gelişmediği bilinmektedir (Offenbacher ve ark. 2008, Laine ve ark. 2012). Bu durum, birçok çevresel, davranışsal ve genetik faktörlerin konağın bakterilere karşı gelişen enflamatuvar

cevabını etkilediğini ve bu cevabın periodontal hastalıkların gelişmesinde kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (Champagne ve ark. 2003). Genetik polimorfizmler, kodlanmış proteinde veya onun ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir ve bunun sonucunda bağışıklık sisteminde farklılıklara bağlı olarak periodontal hastalıkların gelişiminde belirleyici veya hastalıktan koruyucu özellik sergileyebilmektedir. Bu amaçla kompleks genetik hastalıklarda DNA dizilimlerindeki farklılıklar ile fenotipik değişiklikler arasındaki ilişkinin araştırılmasında SNP'ler önemli bir genetik belirteç olmaktadır (Laine ve ark. 2012). Bu amaçla bu çalışmada patogenezinde ailesel geçişin önemli olduğu AP bireylerinde, MCP-1'in -2518 ve reseptörü olan CCR2'nin 190 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmleri araştırıldı ve sağlıklı kontrollerle kıyaslandı. Daha sonra AP hastaları LAP ve GAP olarak ayrı ayrı değerlendirilerek, mevcut polimorfizmler yönünden incelendi.

MCP-1 -2518 A/G polimorfizmi

Monosit kemoatraktan Protein-1 -2518 bölgesindeki tek nükleotid değişimi, ateroskleroz (Charo ve Taubman 2004), koroner arter hastalığı (Szalai ve ark. 2001a), MI (McDermott ve ark. 2005), inme (Flex ve ark. 2004), iskemik kalp hastalığı (Buraczynska ve ark. 2010) ve romatoid artrit (Gonzalez-Escribano ve ark. 2003) gibi pek çok kronik enflamatuvar hastalık ile ilişkili bir polimorfizmdir. Bununla birlikte, literatürde MCP-1 polimorfizminin kronik enflamatuvar hastalık olan periodontitis üzerine olan etkisini araştıran sadece bir çalışmaya ulaşılabilmiştir. Zhu ve ark. (2011) Çin populasyonunda yaptıkları araştırmada 94 S ve 124 GAP gruplarında MCP-1 -2518 A/G polimorfizmini incelemişlerdir. Değerlendirme sonucunda hasta ve kontrol gruplarını yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı açısından düzenlediklerinde bile, mevcut polimorfizmin GAP hastaları ile kontrol grubu arasında farklı olmadığını rapor etmişlerdir. Ancak, S ve GAP gruplarını cinsiyet açısından ayrı ayrı değerlendirdiklerinde, kadınlarda GAP varlığında G^+ allel frekansının kontrollerden önemli derecede daha az olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmada ise diğer çalışmadan farklı olarak hasta grupları oluşturulurken, çalışma sonuçlarını etkileyebileceği düşünüldüğünden, yaş ve cinsiyet olarak eşleştirme yapıldı ve sigara kullanan bireyler çalışmaya dahil edilmedi. Ayrıca, polimorfizm açısından AP ve S grupları arasındaki farkın ortaya konmasında araştırmanın güven düzeyi %95 ve gücü %80'di. Bu kesitsel araştırmanın sonucuna göre, S kontroller ve

AP hastaları arasında MCP-1 -2518 polimorfizmi hem genotipik dağılım hem de allel frekansı açısından anlamlı olarak farklı bulunmadı. Agresif periodontitis hastaları LAP ve GAP olarak alt gruplara ayrıldığında da sonuçlar benzerdi. Araştırmalarda hasta seçim kriterleri ve genetik yapı gibi özelliklerin farklı olmasının elde edilen sonuçlaıı etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu çalışma, Türk toplumunda MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin AP hastaları ile ilişkisini değerlendiren ilk araştırmadır. Bu araştırmanın sınırları içerisinde mevcut polimorfizmin AP gelişiminde önemli bir rolü olmadığı saptanmasına karşın, MCP-1'in farklı lokuslarındaki polimorfizmlerin AP patogenezinde rolü olabileceği ileri sürülebilir.

Yapılan çalışmalar farklı etnik populasyonlarda genotip ve allel frekanslarının birbirinden farklı olduğunu ve bir toplumdaki hastalık ile ilişkili bir genetik risk faktörünün başka bir toplumda risk faktörü olmayabileceğini göstermektedir (Laine ve ark. 2012). Birçok çalışma MCP-1 -2518 A/G polimorfizminde etnik farklılıklar olduğunu rapor etmiştir. Örneğin G allel frekansı; Asya populasyonunda % 58-65 (Kore populasyonunda % 65, Japon populasyonunda % 63.8, Çin populasyonunda % 58.5) (Hwang ve ark. 2002, Tabara ve ark. 2003, Zhu ve ark. 2011), Kafkas populasyonunda % 21-25 (Macar populasyonunda % 21.1, Alman populasyonunda % 25.8, Çek populasyonunda % 23.8, İtalyan populasyonunda % 25) (Szalai ve ark. 2001a, Pola ve ark. 2004, Simeoni ve ark. 2004, Cermakova ve ark. 2005) olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada S kontrol bireylerde A allel ve G allel frekansının sırasıyla % 76.4 ve % 23.6 olduğu tespit edilmiştir. Sonuçların Asya populasyonu ile anlamlı derecede farklı, Kafkas populasyonu ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Periodontal hastalıkta genetik polimorfizmlerin konak savunmasında aşırı enflamatuvar yanıt mekanizmasına ve dolaylı olarak klinik periodontal parametreler üzerine etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma vardır ve sonuçlar çelişkilidir (Khocht ve ark. 2011, Safonova ve ark. 2011). Periodontitis gelişiminde enflamatuvar doku yıkımında konak savunmasında monosit infiltrasyonu ve MCP-1 kemokinin bu mekanizma üzerinde düzenleyici etkisi önemli rol oynamaktadır (Kurtis ve ark. 2005, Pradeep ve ark. 2009a, Gupta ve ark. 2013). Bu nedenle, MCP-1 polimorfizminin periodontal doku sağlığı üzerine etkili olabileceği hipoteziyle yapılan bir araştırmada GAP hastaları sağlıklı kontrollerle kıyaslanmıştır (Zhu ve ark. 2011). Çin populasyonunda yapılan bu araştırmada AA genotipine sahip kadın bireylerdeki SCD'nin, G allel taşıyan kadınlara göre anlamlı derecede daha yüksek

olduğu rapor edilmiştir. Elde edilen bu sonucu çalışma populasyonunda kadın hastaların daha fazla sayıda olması ve araştırmaya dahil edilen kadınlarda da G+ genotipe sahip bireylerin daha az sayıda bulunması ile ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmada ise MCP-1 -2518 polimorfizminin AP hastalarında "AA, AG, GG" genotip dağılımının ve G allel taşıyıcılığının SCD ve KAK üzerine etkisi olmadığı saptandı. Generalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş hastalarda G allel taşıyan bireylerdeki SCD ortalamaları (4.50±0.84) taşımayanlara (4.81±0.62) göre daha düşük düzeylerde ölçüldü. Monosit kemoatraktan protein-1 -2518 polimorfizminde G allel taşıyıcılığının iki-yönlü genetik risk faktörü olması enflamatuvar hastalıklarda konak savunmasında önemli bir mekanizmadır. Viral enfeksiyonlarda erken dönemde MCP-1'in koruyucu etkisinin görülebileceği, ancak enfeksiyonun ileri aşamalarında enflamasyonun artışında rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Gonzalez ve ark. 2002). Bu nedenle G alleli taşımayan bireylerde yetersiz MCP-1 ekspresyonunun görülebileceği (Gonzalez ve ark. 2002) ve buna bağlı olarak daha düşük koruyucu etkinin oluşabileceği ileri sürülebilir.

Enflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklarda MCP-1 geninin -2518 promotor bölgesindeki polimorfizmin MCP-1 kemokin düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çin populasyonunda koroner arter (Zhong ve ark. 2010) ve Kuzey İtalya'da Alzeimer hastalarında (Porcellini ve ark. 2013) polirfizmin MCP-1 düzeyini etkilemediği, Ermeni toplumunda şizofreni hastalarında (Zakharyan ve ark. 2012) plazma protein konsantrasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. Literatürde periodontal hastalıkta MCP-1 polimorfizminin protein miktarları üzerine etkisini değerlendiren araştırmada, plazma MCP-1 düzeyleri G^+ genotipe sahip GAP bireyler ile AA genotipine sahip bireylerde incelenmiş ve hem tüm bireylerde hem de kadınlarda ayrı ayrı değerlendirildiğinde farklı olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise AP hastalarında MCP-1 polimorfizminin DOS protein düzeylerine etkisi değerlendirildi ve polimorfizmin DOS MCP-1 total miktarı (pg/30sn) ve konsantrasyonunu (pg/µl) etkilemediği belirlendi. Mevcut polimorfizmin hem "AA, AG, GG" genotip dağılımlarının hem de G veya A allel taşıyıcılığının LAP ve GAP hastalarındaki etkileri incelendiğinde ise sonuçların değişmediği tespit edildi. Elde edilen bu sonuç MCP-1'in hücresel fonksiyonlarını etkileyen farklı lokuslardaki birden fazla polimorfizmlerin varlığı ile açıklanabileceği gibi, farklı genetik

altyapıya sahip olan populasyonlarda, MCP-1 üretimine etki eden farklı faktörlerden de kaynaklanabilir.

CCR2-190 G/A polimorfizmi

Konak savunmasında CCR2 -190 G/A polimorfizminin immünoenflamatuvar cevabın düzenlenmesinde hem koruyucu hem de yıkıcı yönde etkisi vardır. Literatürde CCR2 -190 G/A polimorfizminin ateroskleroz ve/veya MI ile ilişkili olduğunu (Valdes ve ark. 2002, Petrkova ve ark. 2003, Nyquist ve ark. 2009) veya hastalık patogenezinde rol oynamadığını bildiren araştırmalar rapor edilmiştir (Bjarnadottir ve ark. 2006, Apostolakis ve ark. 2007). Diğer taraftan bu polimorfizm sarkoidozis (Hizawa ve ark. 1999), multiple skleroz (Miyagishi ve ark. 2003), HIV enfeksiyonu (Smith ve ark. 1997, van Rij ve ark. 1998, Liu ve ark. 2004), akciğer (Zafiropoulos ve ark. 2004) ve uterus (Attar ve ark. 2010) kanser gelişiminde koruyucu özellik göstermektedir. Generalize agresif periodontitis hastalarında yapılan bir çalışmada CCR2 -190 polimorfizmi değerlendirilmiş ve sağlıklı kontrollerle arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. Hatta CCR2 "GG" genotipinin ve MCP-1 "G" allellinin birlikte olması durumunun da her iki grupta benzer olduğu saptanmıştır. Sadece kadınlarda yapılan değerlendirmede ise bu kombine etkinin hastalık gelişimi için azalmış risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir (Zhu ve ark. 2010). Bu çalışmada CCR2 -190 bölgesindeki G/A değişimi AP hastalarında araştırıldı ve hem genotip dağılım hem de allel frekansı açısından S kontroller ile benzer olduğu saptandı. Ayrıca, CCR2 homozigot GG ve MCP-1 G+ genotiplerin birlikte olması durumunda da gruplar arasında farklılık bulunmadı. Ancak, hastalar lokalize ve generalize olmak üzere alt gruplara ayrıldığında, en yüksek A allel frekansının ve taşıyıcılığının LAP hastalarında olduğu belirlendi. Elde edilen bu sonuç, mevcut polimorfizmin enflamatuvar doku yıkımının ilerlemesinde koruyucu etki gösterdiği (Miyagishi ve ark. 2003, Attar ve ark. 2010) şeklinde yorumlanabilir. Ancak, bu çalışmada daha az görülen AA genotipinin sadece iki bireyde olduğu ve homozigot bu iki hastanın da LAP grubunda bulunduğu tespit edildi. Ayrıca, CCR2 polimorfizminin tüm gruplarda klinik periodontal parametreler üzerine herhangi bir etkisinin görülmemesi ve kombine genotipik durumun da alt gruplarda farklılık göstermemesi, mevcut polimorfizmin LAP hastalarında periodontal doku yıkımının ilerlemesini önleyebileceği görüşünü tam olarak destekleyememektedir.

Farklı etnik gruplarda CCR2 -190 polimorfizminin A allel frekansının dağılımı incelendiğinde Kafkas populasyonunda %10-18 (İzlanda populasyonunda %17.2, Avusturya-Kuzey İspanya populasyonunda %10, Girit populasyonunda %12.4) (Gonzalez ve ark. 2001, Bjarnadottir ve ark. 2006, Apostolakis ve ark. 2007), Asya populasyonunda %10-22 (Çek populasyonuda %10.8-12.4, Japon populasyonunda %29.9, Hindistan populasyonunda %22) (Miyagishi ve ark. 2003, Petrkova ve ark. 2003, Holla ve ark. 2009, Mishra ve ark. 2012) ve Afrikan-Amerikan populasyonunda %16 (Shrestha ve ark. 2006) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmada sağlıklı kontrollerdeki A allel frekansı %8.4 olduğu belirlenmiştir. Sonuçların Kafkas populasyonuna yakın olduğu ancak S grupta hiç AA genotipi tespit edilmedinden A^+ allel frekansının daha az olduğu belirlenmiştir.

4.4. MCP-1 Gen Ekspresyon Bulguları

Genetik bilimi birçok durumda, sadece DNA'daki moleküler değişiklikleri değil, bunun yanında defektin klinik fenotipi oluşturması için kodlanan proteinin nasıl değiştiğini de araştırır (Nussbaum ve ark. 2005c). Bir genin kodlanan dizisindeki tek nükleotid değişimleri genin ekspresyonunun tamamen kaybına veya özellikleri değişmiş protein oluşmasına neden olurken, bazı DNA değişimleri ise genin ekspresyonunu etkilemez ve bunun sonucunda fenotipik etki oluşturmayabilir. Ayrıca, promotor bölgedeki DNA dizilimindeki farklılıklar genin ürününde değişikliğe sebep olmadan genin transkripsiyonel seviyede ekspresyonunu etkileyebilir (Lewin 2004, Nussbaum ve ark. 2005c). İmmun enflamatuvar hastalıklarda periferal kan mononükleer hücrelerinin, enflamasyon bölgesindeki sitokin-kemokin aktivitesini yansıtabileceği düşünüldüğünden (Sorensen ve ark. 2009), bu çalışmada patogenezinde genetiğin önemli olduğu AP hastalarının kan örneklerinde, MCP-1 geninin -2518 promotor bölgesindeki A/G tek nükleotid değişiminin mRNA düzeyine olan etkisini araştırmak hedeflendi. Bu amaçla "GG" genotipine yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş "AG" ve "AA" genotipine sahip hem periodontal olarak S ve hem de AP hastaları seçilerek rölatif gen ekspresyonları kantitatif olarak RT-PCR ve "SYBR Green I" florasan boya kullanılarak değerlendirildi. Bu yöntem PCR çoğaltılmasını görünür hale getirebilen ve bilgisayar ortamında sunabilen florasan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, florasanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere çevirmek ve mRNA'nın

düzeyini sayısal olarak belirleyebilmek amacıyla sıklıkla kullanılır (Gunel 2007). Bu araştırmada özgül olmayan belirleme yöntemi olan SYBR Green I florasan boya kullanıldı. Bu yöntemde ortamda istenmeyen PCR ürünlerinin çoğaltılması sonucu floresan boya açığa çıkabileceğinden, çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığının anlaşılması için erime eğrisi analizi "melting curve" yapılarak sonuçlar doğrulandı.

Monosit/makrofajların ilerleyen periodontal lezyonlarda sayıca artması (Hanazawa ve ark. 1993, Yu ve Graves 1995), bu savunma hücrelerinin periodontal hastalık patogenezinde ve ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle monositlerin periodontal dokulara hangi mekanizma ile yönlendirildiğinin belirlenmesi hastalık patogenezinin anlaşılmasında önemli bir aşama olmaktadır (Hanazawa ve ark. 1993). Monosit kemoatraktan proten-1'in ekspresyonunu araştıran çalışmalarda periodontitisli bölgelerde dişetinde mRNA düzeyindeki ekspresyonun sağlıklı bireylere göre arttığı (Hanazawa ve ark. 1993, Yu ve ark. 1993, Tonetti ve ark. 1994, Venza ve ark. 2010), hatta MCP-1 eksprese eden hücrelerin enflamasyon şiddeti ile doğrusal ilişki gösterdiği bildirilmiştir (Yu ve ark. 1993). Ayrıca, *in vitro* olarak periodontitisli bireylerin dişeti fibroblastları (Scheres ve ark. 2010, Irshad ve ark. 2013, Sawada ve ark. 2013) ve PBMC'ler periodontopatojenler veya sitokinlerle uyarıldığında da ekspresyon düzeylerinin kontrollerden fazla olduğu tespit edilmiştir (Jiang ve ark. 1996). Buna karşın Scheres ve ark (2011) periodontitisli ve sağlıklı bireylerin gingival ve periodontal ligament fibroblastlarını *P. gingivalis* ile muamele ettiklerinde benzer düzeylerde cevap oluştuğunu saptamışlardır. Bu araştırmada PBMC'de transkripsiyonel seviyedeki MCP-1 gen ekspresyonu araştırıldı ve AP hastaları ile S kontroller arasında fark olmadığı tespit edildi. Periferal kan mononükleer hücrelerinde yapılan gen ekspresyon çalışmaları incelendiğinde konak savunması ile ilgili ilginç bulgulara rastlanmaktadır (Lohmann ve ark. 2002, Largo ve ark. 2009, Puljiz ve ark. 2012, Ikic ve ark. 2013). Enfeksiyon veya enflamasyon artışının görüldüğü sistemik hastalıklarda MCP-1 mRNA gen ekspresyonunun sağlıklı kontrollerden fazla olduğu (Puljiz ve ark. 2012) veya önemli bir farklılık göstermediği (Torheim ve ark. 2005) saptanmıştır. Hatta aşırı veya düşük düzeyde MCP-1 ekpresyonu gösteren bireylerin serum MCP-1 konsantrasyonları karşılaştırıldığında da benzer düzeylerde olabileceği rapor edilmiştir (Kraus ve ark. 2010). Literatürde enflamatuvar hastalıklarda konak

immun mekanizmasındaki farklılıkların önemli olduğu ve bunun epigenetik faktörlerdeki değişkenlerle bağlantılı olarak translasyon sonrası değişimler ile açıklanabileceği ileri sürülmektedir (Wilson 2008). Bu araştırmada plazma/serum MCP-1 veya diğer enflamatuvar belirteçlerin değerlendirilmemiş olması bir limitasyon olarak düşünülmektedir. Diğer taraftan, AP hastaları ile S kontrollerin PBMC'sinde MCP-1'in mRNA düzeyinin farklı olmaması da serum/plazmadaki düzeylerinin de benzer olacağı anlamına gelmemektedir.

Bu çalışmada ayrıca AP hastalarında MCP-1 geninin distal düzenleyici bölgesinde olan -2518 polimorfizminin gen ekspresyonu üzerine olası etkisi de araştırıldı. Literatürde MCP-1 -2518 SNP için polimorfik olan G alleli taşıyan sağlıklı bireylerden izole edilen monositlerinin, IL-1β ile muamele edildiğinde, "AA" genotipe sahip bireylerin monositlerine göre daha fazla MCP-1 eksprese ettiği rapor edilmiştir (Rovin ve ark. 1999). Bu araştırmada AP hastaları kendi içinde değerlendirildiğinde mevcut polimorfizmin "AA, AG, GG" genotip varlığının ve G allel taşıyıcılığının MCP-1 gen ekspresyonunu etkilemediği tespit edildi. Diğer taraftan hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında ise "AA" genotipine sahip AP hastalarının ve G allel taşıyan AP hastalarının, "AA" genotipine sahip S kontrollere göre daha az MCP-1 ekspresyonu gösterdiği belirlendi. Bu araştırmada MCP-1 ekspresyonu sadece periferal kanda mononükleer hücrelerinde değerlendirilmiş, lokal doku yıkımının olduğu veya sağlıklı dişeti dokusundaki ekspresyon düzeyleri araştırılmamıştır. Bu nedenle homozigot A genotipe sahip olan sağlıklı grupta dişeti MCP-1 ekspresyonu bilinmediğinden sistemik olarak artan ekspresyon düzeyinin MCP-1'in enflamasyonun erken aşamalarındaki koruyucu etkisinden (Gonzalez ve ark. 2002) dolayı mı, yoksa olası bir subklinik enfeksiyon varlığı nedeniyle mi arttığı hakkında kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde;

1) Monosit kemoatraktan protein-1 -2518 polimorfizminin Türk populasyonunda AP gelişiminde, hastalık patogenezinde bir etkisinin olmadığı ve bu sonucun LAP ve GAP hastalarında değişmediği,

2) CC kemokin reseptör 2 -190 polimorfizminin AP'de önemli rol oynamadığı, ancak polimorfik "A" allel taşıyıcılığının en fazla LAP'ta olduğu ve mevcut polimorfizmin hiçbir periodontal parametre ile ilişkili olmadığı,

3) Agresif periodontitiste DOS MCP-1 total miktarının önemli bir belirteç olduğu, hatta GAP'taki düzeyinin LAP'tan da fazla olduğu ve DOS MCP-1 miktarının Gİ dışındaki tüm klinik periodontal parametrelerle doğrusal ilişki gösterdiği,

4) MCP-1 geni -2518 bölgesindeki polimorfizmin DOS MCP-1 enzim düzeyini etkilemediği,

5) Her iki grupta da PBMC'deki MCP-1 mRNA düzeylerinin farklı olmadığı ve kandaki gen ekspresyonunun sitokin/kemokin düzeylerini yansıtmayabileceği,

6) Sağlıklı grupta normal A homozigot genotipteki bireylerde mRNA ekspresyonun G allel taşıyan ve A homozigot AP hastalarından daha fazla olduğu,

sonuçları tespit edildi

Bu araştırmanın sınırları içerisinde, MCP-1 -2518 A/G ve CCR2 -190 G/A polimorfizmlerinin Türk toplumunda agresif periodontitis patogenezisinde önemli olabileceği hipotezini desteklememektedir. Ayrıca, AP hastalarında mevcut polimorfizmin DOS MCP-1 protein düzeyine ve PBMC mRNA ekspresyonuna bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Periodontal hastalıkların olası gidişatının ve bireysel tedavi yaklaşımlarının önceden tahmin edilebilmesi için, MCP-1 polimorfizminin konak enflamatuvar cevabı üzerine olan etkisinin farklı toplumlarda ve daha geniş populasyonlarda araştırılması gerekmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Agresif Periodontitis Hastalarında Monosit Kemoatraktan Protein (MCP)-1 ve CC Kemokin Reseptör-2 Polimorfizmlerinin Sıklığının ve Bu Polimorfizmin Gen Ekspresyonu ve Dişeti Oluğu Sıvısı MCP-1 Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi

Şadiye COŞKUNER

Periodontoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA 2013

Monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, C-C kemokin reseptör 2 (CCR2) ile etkileşime geçerek monosit/makrofajların enflamasyon alanına yönlendirilmesinde anahtar öneme sahip bir kemokindir. Hem MCP-1 hem de reseptörü olan CCR2 birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı MCP-1 ve CCR2 polimorfizmleri ile Agresif Periodontitis (AP) arasındaki ilişkiyi araştırmak ve bu polimorfizmin gen ekspresyonu ve dişeti oluğu sıvısı (DOS) MCP-1 düzeyleri üzerine etkisini incelemektir.

Çalışmaya 108 AP ve 107 periodontal olarak sağlıklı (S) kontroller olmak üzere toplam 215 birey dahil edildi. Her bir bireyden alınan kan örneklerinden genomik DNA izole edildi ve MCP-1 -2518 A/G ve CCR2 -190 G/A polimorfizmleri, polimeraz zincir reaksiyonu-kesim parça uzunluk polimorfizmleri (PCR-RFLP) ile değerlendirildi. Toplam 141 bireye (50 lokalize (L) AP, 30 generalize (G) AP ve 61 S) ait DOS MCP-1 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. 25 AP ve 15 S kontrol bireyin gen ekspresyon değerleri periferal kan mononükleer hücrelerinden SYBR Green kullanılarak kantitatif RT-PCR ile belirlendi ve veriler ΔC_t yöntemi ile normalize edildi.

Gruplar arasında MCP-1 -2518 A/G ve CCR2 -190 G/A polimorfizmleri genotip ve allel frekansları açısından fark gözlenmedi ($p>0.05$). Tüm klinik parametreler ve MCP-1 total miktarı (pg/30 sn) LAP ve GAP'da S kontrollere göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Gingival indeks dışındaki klinik parametreler AP grupta DOS MCP-1 total miktarı ile doğrusal ilişki gösterdi ($p<0.05$). Sağlıklı grupta homozigot A genotipteki bireylerin mRNA ekspresyonlarının, G allel taşıyan ve A homozigot AP hastalarından daha fazla olduğu belirlendi.

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, Türk populasyonunda MCP-1 ve CCR2 polimorfizmlerinin AP ile ilişkili olmadığı sonucuna varılabilir. Bu araştırmada, DOS MCP-1 total miktarının LAP ve GAP hastalarındaki periodontal doku yıkımının belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılabileceği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Agresif periodontitis, C-C kemokin reseptör 2, dişeti oluğu sıvısı, gen ekspresyonu, monosit kemoatraktan protein-1, polimorfizm

7. SUMMARY

The Evaluation of Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 and CC Chemokine Receptor-2 Gene Polymorphisms Frequency and the Effects of This Polymorphism on Gene Expression and the MCP-1 levels in Gingival Crevicular Fluid in Patients with Aggressive Periodontitis

Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is one of the key chemokines that interacts with C-C chemokine receptor 2 (CCR2) and plays a role in migration and infiltration of monocytes/macrophages. Both MCP-1 and CCR2 have been demonstrated to be induced and involved in various diseases. The purpose of this study was to investigate genetic impact of MCP-1 -2518 A/G and CCR2 -190 G/A gene polymorphisms on Aggressive Periodontitis (AP) susceptibility and the effects of this polymorphism on gene expression and the MCP-1 levels in gingival crevicular fluid (GCF) in patients with AP.

A total of 215 subjects, (108 AP and 107 healthy controls (C)) were recruited in this cross-sectional study. Genomic DNA was isolated from a peripheral blood sample obtained from each subject. Gene polymorphisms of MCP-1 -2518 A/G and CCR2 -190 G/A were analyzed by a standard polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. GCF samples were collected from 141 patients including 50 localized (L) AP, 30 generalized (G) AP and 61 C patients and GCF MCP-1 was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression levels were quantified in peripheral blood leukocytes from 25 AP and 15 periodontally healthy controls by quantitative real-time PCR. Threshold cycles (C_t) values obtained from the RT-PCR analysis based on SYBR Green detection and data was normalized via ΔC_t.

There were no differences between MCP-1 and CCR2 genotype distribution and allele frequencies in the AP and C groups ($p>0.05$). Compared to healthy controls, all clinical parameters, and total amounts (pg/30 s) of MCP-1 levels were significantly higher in subjects with LAP and GAP ($p<0.05$). There were a significant correlations between total amounts of MCP-1 and clinical parameters in subjects with AP except gingival index (GI) ($p<0.05$). The MCP-1 gene expression levels were higher in homozygous "A" control subjects than having G^+ genotype and AA homozygous AP patients.

Within the limitation of this study, it can be concluded that MCP-1 and CCR2 polymorphisms are not associated with AP in Turkish population. We found that total amount of MCP-1 levels in GCF may have a potential indicator of periodontal tissue destruction in subjects with LAP and GAP.

Key Words: Aggressive periodontitis, C-C chemokine receptor 2, gingival crevicular fluid, gene expression, monocyte chemoattractant protein-1, polymorphism

8. KAYNAKLAR

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43:5721-32.

Abdi R, Tran TB, Sahagun-Ruiz A, Murphy PM, Brenner BM, Milford EL, McDermott DH. Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation. J Am Soc Nephrol. 2002;13:754-8.

Abe T, Hara Y, Aono M. Penetration, clearance and retention of antigen en route from the gingival sulcus to the draining lymph node of rats. J Periodontal Res. 1991;26:429-39.

Adarichev VA, Vermes C, Hanyecz A, Ludanyi K, Tunyogi-Csapo M, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Antigen-induced differential gene expression in lymphocytes and gene expression profile in synovium prior to the onset of arthritis. Autoimmunity. 2006;39:663-73.

Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. J Periodontol. 1997;68:973-81.

Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. Periodontol 2000. 2002;29:153-76.

Anil S, Preethanath RS, Alasqah M, Mokeem SA, Anand PS. Increased levels of serum and gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 in smokers with periodontitis. J Periodontol. 2013;84:e23-8.

Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Panutsopulos D, Spandidos DA. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. Thromb Res. 2007;119:63-71.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4:1-6.

Atici K, Yamalik N, Eratalay K, Etikan I. Analysis of gingival crevicular fluid intracytoplasmic enzyme activity in patients with adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. A longitudinal study model with periodontal treatment. J Periodontol. 1998;69:1155-63.

Attar R, Agachan B, Kuran SB, Cacina C, Sozen S, Yurdum LM, Attar E, Isbir T. Association of CCL2 and CCR2 gene variants with endometrial cancer in Turkish women. In Vivo. 2010;24:243-8.

Awad AS, Kinsey GR, Khutsishvili K, Gao T, Bolton WK, Okusa MD. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2011;301:F1358-66.

Ay ZY, Yilmaz G, Ozdem M, Kocak H, Sutcu R, Uskun E, Tonguc MO, Kirzioglu FY. The gingival crevicular fluid levels of interleukin-11 and interleukin-17 in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol. 2012;83:1425-31.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. J Intern Med. 2001;250:91-104.

Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. Immunol Today. 2000;21:418-20.

Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. Immunol Today. 1989;10:299-304.

Baltacioglu E, Kehribar MA, Yuva P, Alver A, Atagun OS, Karabulut E, Akalin FA. Total Oxidant Status and Bone Resorption Biomarkers in Serum and Gingival Crevicular Fluid of Patients with Periodontitis. J Periodontol. 2013;

Barros SP, Arce RM, Galloway P, Lawter R, Offenbacher S. Therapeutic effect of a topical CCR2 antagonist on induced alveolar bone loss in mice. J Periodontal Res. 2011;46:246-51.

Becerik S, Ozturk VO, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. J Periodontol. 2012;83:1304-13.

Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. Immunol Lett. 1994;43:111-23.

Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. Periodontol 2000. 2011;55:36-47.

Bergmann A, Deinzer R. Daytime variations of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid. Eur J Oral Sci. 2008;116:18-22.

Bergstrom J, Eliasson S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. J Clin Periodontol. 1987;14:466-9.

Bjarnadottir K, Eiriksdottir G, Aspelund T, Gudnason V. Examination of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 and CCR2 genes on MI in the Icelandic population. Atherosclerosis. 2006;188:341-6.

Boekhoudt GH, Guo Z, Beresford GW, Boss JM. Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene. J Immunol. 2003;170:4139-47.

Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Jr., Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J Clin Invest. 1997;100:2552-61.

Brenner D, Labreuche J, Touboul PJ, Schmidt-Petersen K, Poirier O, Perret C, Schonfelder J, Combadiere C, Lathrop M, Cambien F, Brand-Herrmann SM, Amarenco P, Investigators G. Cytokine polymorphisms associated with carotid intima-media thickness in stroke patients. Stroke. 2006;37:1691-6.

Brodmerkel CM, Huber R, Covington M, Diamond S, Hall L, Collins R, Leffet L, Gallagher K, Feldman P, Collier P, Stow M, Gu X, Baribaud F, Shin N, Thomas B, Burn T, Hollis G, Yeleswaram S, Solomon K, Friedman S, Wang A, Xue CB, Newton RC, Scherle P, Vaddi K. Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. J Immunol. 2005;175:5370-8.

Brown TA. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. In: F. Bardakcı, A. Yenidünya and N. Yılmaz, editors. Gen Klonlama ve DNA Analizi. 5. Baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2009. p. 181-195.

Bulkacz J, Carranza FA. Defence Mechanisms of the Gingiva. In: M. G. Newman, H. H. Takei, P. R. Klokkevold and F. A. Carranza, editors. Carranza's clinical periodontology. 9. China: W.B Saunders Company; 2009. p. 344-354.

Buraczynska K, Luchowski P, Wojczal J, Ksiazek A, Stelmasiak Z. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) A-2518G gene polymorphism in stroke patients with different comorbidities. Clin Biochem. 2010;43:1421-6.

Cagnard N, Letourneur F, Essabbani A, Devauchelle V, Mistou S, Rapinat A, Decraene C, Fournier C, Chiocchia G. Interleukin-32, CCL2, PF4F1 and GFD10 are the only cytokine/chemokine genes differentially expressed by in vitro cultured rheumatoid and osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. Eur Cytokine Netw. 2005;16:289-92.

Callewaere C, Banisadr G, Rostene W, Parsadaniantz SM. Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. J Mol Endocrinol. 2007;38:355-63.

Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. J Cell Biol. 1996;134:255-66.

Cermakova Z, Petrkova J, Arakelyan A, Drabek J, Mrazek F, Lukl J, Petrek M. The MCP-1 -2518 (A to G) single nucleotide polymorphism is not associated with myocardial infarction in the Czech population. Int J Immunogenet. 2005;32:315-8.

Cha SH, Lee JK, Lee JY, Kim HT, Ryu HJ, Han BG, Kim JW, Oh B, Kimm K, Shin HD, Park BL, Park S, Park HY, Jang Y. Association of CCR2 polymorphisms with the number of closed coronary artery vessels in coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2007;382:129-33.

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

Charo IF, Peters W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. Microcirculation. 2003;10:259-64.

Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circ Res. 2004;95:858-66.

Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK, Park SH, Cho CS, Kim HY. Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. Exp Mol Med. 2007;39:499-507.

Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, Moser B. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. J Biol Chem. 1991;266:23128-34.

Colditz IG, Schneider MA, Pruenster M, Rot A. Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. Thromb Haemost. 2007;97:688-93.

Conti P, DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. Allergy Asthma Proc. 2001;22:133-7.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H. Microbial Biofilms. Annu Rev Immunol. 1995;49:711-45.

de Oliveira RT, Mamoni RL, Souza JR, Fernandes JL, Rios FJ, Gidlund M, Coelho OR, Blotta MH. Differential expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. Int J Cardiol. 2009;136:17-26.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res. 2009;29:313-26.

Emingil G, Atilla G, Huseyinov A. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2004;31:829-34.
Emingil G, Cinarcik S, Baylas H, Coker I, Huseyinov A. Levels of leukotriene B4 in gingival crevicular fluid and gingival tissue in specific periodontal diseases. J Periodontol. 2001a;72:1025-31.
Emingil G, Cinarcik S, Baylas H, Huseyinov A. Levels of platelet-activating factor in gingival crevicular fluid and gingival tissue in specific periodontal diseases. J Periodontol. 2001b;72:1032-7.
Emingil G, Karaarslan F, Keskinoglu A, Coker I, Atilla G. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients. J Int Acad Periodontol. 2001c;3:87-94.
Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol. 1999;4:32-8.
Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, Tondi P, Pola P, Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. Stroke. 2004;35:2270-5.
Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J Periodontal Res. 2003;38:210-7.
Garnick JJ, Pearson R, Harrell D. The evaluation of the periotron. J Periodontol. 1979;50:424-6.
Garrison SW, Nichols FC. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis. J Periodontal Res. 1989;24:88-95.
Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. Clin Exp Immunol. 2001;125:134-41.
Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000. 1997;14:112-43.
Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol. 1992;63:338-55.
Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. Nat Immunol. 2001;2:108-15.
Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature. 1999;398:718-23.
Ghilardi G, Biondi ML, La Torre A, Battaglioli L, Scorza R. Breast cancer progression and host polymorphisms in the chemokine system: role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) -2518 G allele. Clin Chem. 2005;51:452-5.
Giannakopoulou E, Ragia G, Marousi S, Ellul J, Manolopoulos VG, Tavridou A. Association of monocyte chemoattractant protein-1 -2518A>G polymorphism with occurrence, severity, and outcome in ischemic stroke. Neurol Sci. 2013;34:1315-20.
Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, Valenzuela A, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. Hum Immunol. 2003;64:741-4.
Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:13795-800.
Gonzalez P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, Cubero GI, Cortina A, Coto E. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. Genes Immun. 2001;2:191-5.
Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. Periodontol 2000. 2003;31:43-54.
Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. Periodontol 2000. 2003;31:32-42.
Griffiths GS, Sterne JA, Wilton JM, Eaton KA, Johnson NW. Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. J Clin Periodontol. 1992;19:464-70.
Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. J Periodontol. 2011;82:1051-60.
Guncu GN, Caglayan F, Dincel A, Bozkurt A, Saygi S, Karabulut E. Plasma and gingival crevicular fluid phenytoin concentrations as risk factors for gingival overgrowth. J Periodontol. 2006;77:2005-10.

Gunday S, Topcu AO, Ercan E, Yamalik N. Analysis of Daytime Variations in Gingival Crevicular Fluid: A Circadian Periodicity? J Periodontol. 2013;

Gunel T. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR". Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;27:763-66.

Gupta M, Chaturvedi R, Jain A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. Cytokine. 2013;61:892-7.

Gupta PK, Prabhakar S, Sharma NK, Anand A. Possible association between expression of chemokine receptor-2 (CCR2) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients of North India. PLoS One. 2012;7:e38382.

Gustafsson A. Methodological considerations in GCF sampling with paper strips: poor recovery of uncomplexed elastase. J Clin Periodontol. 1996;23:432-6.

Güneş H. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. Tr. J. of Biology. 1999;23:283-292.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. J Clin Periodontol. 2001;28:377-88.

Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. J Lipid Res. 1999;40:1053-63.

Hanazawa S, Kawata Y, Takeshita A, Kumada H, Okithu M, Tanaka S, Yamamoto Y, Masuda T, Umemoto T, Kitano S. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. Infect Immun. 1993;61:5219-24.

Handel TM, Domaille PJ. Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. Biochemistry. 1996;35:6569-84.

Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mantyla P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. J Periodontol. 2010;81:1644-52.

Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009;8:307-18.

Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159:2021-3.

Holla LI, Mrazek F, Petrek M. MCP-1 and CCR2 gene polymorphisms in Czech patients with allergic disorders. Int J Immunogenet. 2009;36:69-72.

Huynh C, Roch-Arveiller M, Meyer J, Giroud JP. Gingival crevicular fluid of patients with gingivitis or periodontal disease: evaluation of elastase-alpha 1 proteinase inhibitor complex. J Clin Periodontol. 1992;19:187-92.

Hwang SY, Cho ML, Park B, Kim JY, Kim YH, Min DJ, Min JK, Kim HY. Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Korean population and in Korean patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease. Eur J Immunogenet. 2002;29:413-6.

Ikic M, Jajic Z, Lazic E, Ivcevic S, Grubisic F, Marusic A, Kovacic N, Grcevic D. Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, pro-inflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis. Int Orthop. 2013;

Irshad M, Scheres N, Anssari Moin D, Crielaard W, Loos BG, Wismeijer D, Laine ML. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in fibroblasts from peri-implantitis lesions in response to viable Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. 2013;48:647-56.

Jia X, Ju H, Yang L, Tian Y. A novel multiplex polymerase chain reaction assay for profile analyses of gene expression in peripheral blood. BMC Cardiovasc Disord. 2012;12:51.

Jiang Y, Russell TR, Graves DT, Cheng H, Nong SH, Levitz SM. Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. Infect Immun. 1996;64:4450-5.

Johnson NW. Crevicular fluid-based diagnostic tests. Curr Opin Dent. 1991;1:52-65.

Jung H, Bhangoo S, Banisadr G, Freitag C, Ren D, White FA, Miller RJ. Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain. J Neurosci. 2009;29:8051-62.

Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Maeda K. The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. Cytokine. 2002;20:70-7.

Kang YS, Cha JJ, Hyun YY, Cha DR. Novel C-C chemokine receptor 2 antagonists in metabolic disease: a review of recent developments. Expert Opin Investig Drugs. 2011;20:745-56.
Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Distler O, Landthaler M, Szeimies RM, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Hellerbrand C. The -2518 promotor polymorphism in the MCP-1 gene is associated with systemic sclerosis. J Invest Dermatol. 2005;124:92-8.
Khocht A, Heaney K, Janal M, Turner B. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontitis in Down syndrome. J Oral Sci. 2011;53:193-202.
Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:430-49.
Kinane DF, Podmore M, Murray MC, Hodge PJ, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. Periodontol 2000. 2001;26:54-91.
Kleinberg I, Golub LM. Gingival crevicular fluid and its use in diagnosis of disease. Int J Dermatol. 1985;24:37-40.
Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000. 1997;14:33-53.
Kraus TA, Sperling RS, Engel SM, Lo Y, Kellerman L, Singh T, Loubeau M, Ge Y, Garrido JL, Rodriguez-Garcia M, Moran TM. Peripheral blood cytokine profiling during pregnancy and post-partum periods. Am J Reprod Immunol. 2010;64:411-26.
Kreutz M, Krause SW, Hennemann B, Rehm A, Andreesen R. Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. Res Immunol. 1992;143:107-15.
Kruger B, Schroppel B, Ashkan R, Marder B, Zulke C, Murphy B, Kramer BK, Fischereder M. A Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. J Am Soc Nephrol. 2002;13:2585-9.
Kumar SN, Boss JM. Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1. Mol Immunol. 2000;37:623-32.
Kurtis B, Tuter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, Bal B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. J Periodontol. 2005;76:1849-55.
Kurtis B, Tuter G, Take G, Sofuoglu IP, Yazici C, Erdogan D, Bal B. Agresif, kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerin dişeti dokusu örneklerindeki monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) pozitif hücrelerin immünohistokimyasal olarak incelenmesi. GÜ Diş Hek Fak Derg. 2006;23(3):149-155.
Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:12053-8.
Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. Periodontol 2000. 2012;58:37-68.
Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. Ann Periodontol. 1997;2:123-37.
Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. Ann N Y Acad Sci. 2007;1098:216-29.
Lamster IB, Harper DS, Goldstein S, Celenti RS, Oshrain RL. The effect of sequential sampling on crevicular fluid volume and enzyme activity. J Clin Periodontol. 1989;16:252-8.
Lamster IB, Novak MJ. Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1992;3:31-60.
Lamster IB, Oshrain RL, Celenti R, Levine K, Fine JB. Correlation analysis for clinical and gingival crevicular fluid parameters at anatomically related gingival sites. J Clin Periodontol. 1991;18:272-7.
Lamster IB, Oshrain RL, Fiorello LA, Celenti RS, Gordon JM. A comparison of 4 methods of data presentation for lysosomal enzyme activity in gingival crevicular fluid. J Clin Periodontol. 1988;15:347-52.
Lamster IB, Oshrain RL, Gordon JM. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. J Clin Periodontol. 1986;13:799-804.
Largo R, Martinez-Calatrava MJ, Sanchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Egido J, Herrero-Beaumont G. Effect of a high dose of glucosamine on systemic and tissue inflammation in an experimental model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;297:H268-76.

Lee E, Yang YH, Ho YP, Ho KY, Tsai CC. Potential role of vascular endothelial growth factor, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal diseases. Kaohsiung J Med Sci. 2003a;19:406-15.

Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 and rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2003b;32:235-9.

Leppilahti JM, Kallio MA, Tervahartiala T, Sorsa T, Mantyla P. Gingival Crevicular Fluid (GCF) Matrix Metalloproteinase -8 Levels Predict Treatment Outcome Among Smoking Chronic Periodontitis Patients. J Periodontol. 2013;

Levinger I, Levinger P, Trenerry MK, Feller JA, Bartlett JR, Bergman N, McKenna MJ, Cameron-Smith D. Increased inflammatory cytokine expression in the vastus lateralis of patients with knee osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2011;63:1343-8.

Lewin B. Genes VIII. International edition. United States of America, Pearson Prentice Hall, 2004: 1-255.

Liu H, Hwangbo Y, Holte S, Lee J, Wang C, Kaupp N, Zhu H, Celum C, Corey L, McElrath MJ, Zhu T. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. J Infect Dis. 2004;190:1055-8.

Liu SC, Hsu CJ, Fong YC, Chuang SM, Tang CH. CTGF induces monocyte chemoattractant protein-1 expression to enhance monocyte migration in human synovial fibroblasts. Biochim Biophys Acta. 2013;1833:1114-24.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25:402-8.

Loe H, Holm-Pedersen P. Absence and Presence of Fluid from Normal and Inflamed Gingivae. Periodontics. 1965;149:171-7.

Loe H, Silness J. Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. Acta Odontol Scand. 1963;21:533-51.

Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. J Exp Med. 1996;184:569-77.

Lohmann T, Laue S, Nietzschmann U, Kapellen TM, Lehmann I, Schroeder S, Paschke R, Kiess W. Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. Diabetes. 2002;51:2474-80.

Lu X, Kang Y. Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. J Biol Chem. 2009;284:29087-96.

Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z, Zhang J. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. J Cell Biochem. 2007;101:676-85.

Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol. 2001;1:108-16.

Lutgens E, Faber B, Schapira K, Evelo CT, van Haaften R, Heeneman S, Cleutjens KB, Bijnens AP, Beckers L, Porter JG, Mackay CR, Rennert P, Bailly V, Jarpe M, Dolinski B, Koteliansky V, de Fougerolles T, Daemen MJ. Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. Circulation. 2005;111:3443-52.

Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. J Clin Periodontol. 2005;32 Suppl 6:57-71.

Mann WV. The correlation of gingivitis pocket depth and exsudate from the gingival crevice. Journal of Periodontology. 1963;34:79-87.

McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. Circulation. 2005;112:1113-20.

Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusis AJ. Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. Genomics. 1991;9:200-3.

Meisner JK, Song J, Price RJ. Arteriolar and venular remodeling are differentially regulated by bone marrow-derived cell-specific CX3CR1 and CCR2 expression. PLoS One. 2012;7:e46312.

Melgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41:998-1001.

Michalowicz B, Pihlstrom B. Genetic factors associated with periodontal disease. In: M. G. Newman, H. H. Takei, P. R. Klokkevold and F. A. Carranza, editors. Carranza's clinical periodontology. 9. China: W.B Saunders Company; 2009. p. 193-208.

Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. Clin Exp Immunol. 2007;148:307-24.

Mishra G, Poojary SS, Raj P, Tiwari PK. Genetic polymorphisms of CCL2, CCL5, CCR2 and CCR5 genes in Sahariya tribe of North Central India: an association study with pulmonary tuberculosis. Infect Genet Evol. 2012;12:1120-7.

Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Tashiro K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2003;145:135-8.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. Nat Immunol. 2001;2:123-8.

Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol. 2004;25:75-84.

Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, Scholmerich J, Hellerbrand C. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. Gastroenterology. 2003;125:1085-93.

Munshi R, Johnson A, Siew ED, Ikizler TA, Ware LB, Wurfel MM, Himmelfarb J, Zager RA. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2011;22:165-75.

Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. Blood. 2000;95:3032-43.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2000;52:145-76.

Nakajima H, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A. Increased Intrathecal Chemokine Receptor CCR2 Expression in Multiple Sclerosis. Biomark Insights. 2007;2:463-8.

Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006;150:191-204.

Noda D, Hamachi T, Inoue K, Maeda K. Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expression of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissues. J Periodontal Res. 2007;42:566-71.

Nowicki D, Vogel RI, Melcer S, Deasy MJ. The gingival bleeding time index. J Periodontol. 1981;52:260-2.

Nussbaum L, McInnes R, Willard H. İmmün Sistem Genetiği. In: D. Aktas, editors. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. 6. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005a. p. 277-288.

Nussbaum L, McInnes R, Willard H. İnsan Genomu: Genlerin ve kromozomların yapısı ve fonksiyonu. In: H. Yurter, editors. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. 6. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005b. p. 17-32.

Nussbaum L, McInnes R, Willard H. İnsanlarda genetik varyasyon: Mutasyon ve polimorfizm. In: S. Emre, editors. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. 6. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005c. p. 79-94.

Nussbaum L, McInnes R, Willard H. Tek gen kalıtım şekilleri. In: S. Balci, editors. Thompson & Thompson Tıbbi Genetik. 6. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005d. p. 51-78.

Nyquist PA, Winkler CA, McKenzie LM, Yanek LR, Becker LC, Becker DM. Single nucleotide polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor act synergistically to increase the risk of carotid atherosclerosis. Cerebrovasc Dis. 2009;28:124-30.

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. Biochem J. 2008;409:635-49.

Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. Rethinking periodontal inflammation. J Periodontol. 2008;79:1577-84.

Okamoto M, Fuchigami M, Suzuki T, Watanabe N. A novel C-C chemokine receptor 2 antagonist prevents progression of albuminuria and atherosclerosis in mouse models. Biol Pharm Bull. 2012;35:2069-74.

Olzinski AR, Turner GH, Bernard RE, Karr H, Cornejo CA, Aravindhan K, Hoang B, Ringenberg MA, Qin P, Goodman KB, Willette RN, Macphee CH, Jucker BM, Sehon CA, Gough PJ. Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E-/- mouse: magnetic resonance imaging assessment. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:253-9.

Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel M, von Korff A, Vesper K, Schmitz F, Mevissen V, Janssens U, Franke A, Hanrath P, Zerres K, Hoffmann R. Additive effects of the chemokine receptor 2, vitamin D receptor, interleukin-6 polymorphisms and cardiovascular risk factors on the prevalence of myocardial infarction in patients below 65 years. Int J Cardiol. 2005;105:90-5.

Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, Schmitz F, Janssens U, Franke A, Hanrath P, Weber C, Zerres K, Hoffmann R. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. J Mol Med (Berl). 2003;81:363-7.

Osterholzer JJ, Chen GH, Olszewski MA, Zhang YM, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB. Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infection. Am J Pathol. 2011;178:198-211.

Ozkavaf A, Aras H, Huri CB, Mottaghian-Dini F, Tozum TF, Etikan I, Yamalik N, Caglayan F. Relationship between the quantity of gingival crevicular fluid and clinical periodontal status. J Oral Sci. 2000;42:231-8.

Ozyurek AR, Gurses D, Ulger Z, Levent E, Bakiler AR, Berdeli A. Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Turkish population and in Turkish patients with juvenile rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2007;26:546-50.

Paavola CD, Hemmerich S, Grunberger D, Polsky I, Bloom A, Freedman R, Mulkins M, Bhakta S, McCarley D, Wiesent L, Wong B, Jarnagin K, Handel TM. Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. J Biol Chem. 1998;273:33157-65.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res. 1991;26:230-42.

Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J Periodontol. 1992;63:356-66.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000. 1997;14:216-48.

Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. J Clin Periodontol. 2000;27:682-9.

Pease JE, Horuk R. Chemokine receptor antagonists: Part 1. Expert Opin Ther Pat. 2009;19:39-58.

Persson GR, DeRouen TA, Page RC. Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. J Periodontal Res. 1990;25:81-7.

Petrkova J, Cermakova Z, Drabek J, Lukl J, Petrek M. CC chemokine receptor (CCR)2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. Immunol Lett. 2003;88:53-5.

Pola R, Flex A, Gaetani E, Proia AS, Papaleo P, Di Giorgio A, Straface G, Pecorini G, Serricchio M, Pola P. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism and risk of Alzheimer's disease in Italians. Exp Gerontol. 2004;39:1249-52.

Porcellini E, Ianni M, Carbone I, Franceschi M, Licastro F. Monocyte chemoattractant protein-1 promoter polymorphism and plasma levels in alzheimer's disease. Immun Ageing. 2013;10:6.

Pradeep AR, Daisy H, Hadge P. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal health and disease. Arch Oral Biol. 2009a;54:503-9.

Pradeep AR, Daisy H, Hadge P. Serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 in periodontal health and disease. Cytokine. 2009b;47:77-81.

Proost P, Wuyts A, Van Damme J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. J Leukoc Biol. 1996;59:67-74.

Puljiz I, Markotic A, Cvetko Krajinovic L, Guzvinec M, Polasek O, Kuzman I. Mycoplasma pneumoniae in adult community-acquired pneumonia increases matrix metalloproteinase-9 serum level and induces its gene expression in peripheral blood mononuclear cells. Med Sci Monit. 2012;18:CR500-505.

Razmkhah M, Jaberipour M, Safaei A, Talei AR, Erfani N, Ghaderi A. Chemokine and chemokine receptors: a comparative study between metastatic and nonmetastatic lymph nodes in breast cancer patients. Eur Cytokine Netw. 2012;23:72-7.

Renga B, Francisci D, D'Amore C, Schiaroli E, Carino A, Baldelli F, Fiorucci S. HIV-1 infection is associated with changes in nuclear receptor transcriptome, pro-inflammatory and lipid profile of monocytes. BMC Infect Dis. 2012;12:274.

Rollins BJ. Chemokines. Blood. 1997;90:909-28.

Rollins BJ, Morton CC, Ledbetter DH, Eddy RL, Jr., Shows TB. Assignment of the human small inducible cytokine A2 gene, SCYA2 (encoding JE or MCP-1), to 17q11.2-12: evolutionary relatedness of cytokines clustered at the same locus. Genomics. 1991;10:489-92.

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004;22:891-928.
Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. Biochem Biophys Res Commun. 1999;259:344-8.
Rufail ML, Schenkein HA, Koertge TE, Best AM, Barbour SE, Tew JG, van Antwerpen R. Atherogenic lipoprotein parameters in patients with aggressive periodontitis. J Periodontal Res. 2007;42:495-502.
Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. Kidney Int. 2000;57:2285-98.
Safonova AV, Petrin AN, Arutyunov SD, Tsarev VN, Akulenko LA, Zorina AO, Rebrikov DV, Rubanovich AV, Borinskaya SA, Yankovsky NK. Association of cytokine gene alleles with the inflammation of human periodontal tissue. Acta Naturae. 2011;3:116-22.
Sakai A, Ohshima M, Sugano N, Otsuka K, Ito K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. J Periodontol. 2006;77:856-64.
Salzberg TN, Overstreet BT, Rogers JD, Califano JV, Best AM, Schenkein HA. C-reactive protein levels in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol. 2006;77:933-9.
Santos JC, de Brito CA, Futata EA, Azor MH, Orii NM, Maruta CW, Rivitti EA, Duarte AJ, Sato MN. Up-regulation of chemokine C-C ligand 2 (CCL2) and C-X-C chemokine 8 (CXCL8) expression by monocytes in chronic idiopathic urticaria. Clin Exp Immunol. 2012;167:129-36.
Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1beta and IL-6. Biomed Res. 2013;34:31-40.
Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. J Dent Res. 2010;89:943-7.
Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. 2010;45:262-70.
Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. 2011;46:407-16.
Schroppel B, Fischereder M, Ashkar R, Lin M, Kramer BK, Mardera B, Schiano T, Murphy B. The impact of polymorphisms in chemokine and chemokine receptors on outcomes in liver transplantation. Am J Transplant. 2002;2:640-5.
Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontol Scand. 2001;59:167-73.
Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. J Dent Res. 2011;90:1140-4.
Shapira L, Soskolne WA, Sela MN, Offenbacher S, Barak V. The secretion of PGE2, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients. J Periodontol. 1994;65:139-46.
Shen Y, Wang D, Wang X. Role of CCR2 and IL-8 in acute lung injury: a new mechanism and therapeutic target. Expert Rev Respir Med. 2011;5:107-14.
Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. Atherosclerosis. 2002;160:91-102.
Shrestha S, Strathdee SA, Galai N, Oleksyk T, Fallin MD, Mehta S, Schaid D, Vlahov D, O'Brien SJ, Smith MW. Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection. J Infect Dis. 2006;193:16-26.
Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. J Exp Med. 1997;185:969-74.
Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Bernasconi S, Allavena P, Gaetano B, Fei F, LaRosa G, Scotton C, Balkwill F, Mantovani A. Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. J Immunol. 2000;164:733-8.
Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. Ii. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condtion. Acta Odontol Scand. 1964;22:121-35.
Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, Aravena O, Lastres P, Pozo P, Vernal R, Gamonal J. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic

periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. J Clin Periodontol. 2008;35:206-14.
Simeoni E, Vassalli G, Seydoux C, Ramsay D, Noll G, von Segesser LK, Fleury S. CCR5, RANTES and CX3CR1 polymorphisms: possible genetic links with acute heart rejection. Transplantation. 2005;80:1309-15.
Simeoni E, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Fleury S, Ruiz J, Kappenberger L, Marz W, Vassalli G. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. Eur Heart J. 2004;25:1438-46.
Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. Science. 1997;277:959-65.
Smith QT, Geegan SJ. Repeated measurement of crevicular fluid parameters at different sites. J Clin Periodontol. 1991;18:171-6.
Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87.
Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-44.
Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. Nat Rev Immunol. 2002;2:372-7.
Sorensen LK, Havemose-Poulsen A, Bendtzen K, Holmstrup P. Aggressive periodontitis and chronic arthritis: blood mononuclear cell gene expression and plasma protein levels of cytokines and cytokine inhibitors. J Periodontol. 2009;80:282-9.
Sorg C. Macrophages in acute and chronic inflammation. Chest. 1991;100:173S-175S.
Spagnolo P, Renzoni EA, Wells AU, Sato H, Grutters JC, Sestini P, Abdallah A, Gramiccioni E, Ruven HJ, du Bois RM, Welsh KI. C-C chemokine receptor 2 and sarcoidosis: association with Lofgren's syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:1162-6.
Stoller NH, Karras DC, Johnson LR. Reliability of crevicular fluid measurements taken in the presence of supragingival plaque. J Periodontol. 1990;61:670-3.
Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. Kidney Int. 2002;62:1160-70.
Suppipat N, Suppipat N. Evaluation of an electronic device for gingival fluid quantitation. J Periodontol. 1977;48:388-94.
Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horvath L, Csaszar A. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. Atherosclerosis. 2001a;158:233-9.
Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. J Allergy Clin Immunol. 2001b;108:375-81.
Tabara Y, Kohara K, Yamamoto Y, Igase M, Nakura J, Kondo I, Miki T. Polymorphism of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) gene is associated with the plasma level of MCP-1 but not with carotid intima-media thickness. Hypertens Res. 2003;26:677-83.
Takahashi K, Ohyama H, Kitanaka M, Sawa T, Mineshiba J, Nishimura F, Arai H, Takashiba S, Murayama Y. Heterogeneity of host immunological risk factors in patients with aggressive periodontitis. J Periodontol. 2001;72:425-37.
Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. J Biol Chem. 1997;272:8050-6.
Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000;43:38-47.
Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol. 2001;2:129-34.
Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. J Periodontal Res. 2010;45:148-52.
Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun. 1994;62:4005-14.

Torheim EA, Yndestad A, Bjerkeli V, Halvorsen B, Aukrust P, Froland SS. Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis - modulating effects of methylprednisolone in vitro. Clin Exp Immunol. 2005;140:376-83.

Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E, Salles J, Malezet C, Astier J, Darmon P, Blouin E, Walrand S, Ye J, Landrier JF. Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF-kappaB. PLoS One. 2013;8:e66515.

Tozum TF, Hatipoglu H, Yamalik N, Gursel M, Alptekin NO, Ataoglu T, Marakoglu I, Gursoy UK, Eratalay K. Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: the potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. J Periodontal Res. 2004a;39:344-57.

Tozum TF, Yildirim A, Caglayan F, Dincel A, Bozkurt A. Serum and gingival crevicular fluid levels of ciprofloxacin in patients with periodontitis. J Am Dent Assoc. 2004b;135:1728-32.

Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, Richards HB. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. Arthritis Rheum. 2004;50:1842-9.

Tucci M, Quatraro C, Frassanito MA, Silvestris F. Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia. J Hypertens. 2006;24:1307-18.

Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2011;38:219-28.

Ustun K, Alptekin NO. The effect of tobacco smoking on gingival crevicular fluid volume. Eur J Dent. 2007;1:236-9.

Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, Spurr NK, Gefter W, Rut A, Groot PH, Rader DJ. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1924-8.

Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev. 1999;10:61-86.

Van Dyke TE, Kornman KS. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. J Periodontol. 2008;79:1503-7.

van Rij RP, de Roda Husman AM, Brouwer M, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. Role of CCR2 genotype in the clinical course of syncytium-inducing (SI) or non-SI human immunodeficiency virus type 1 infection and in the time to conversion to SI virus variants. J Infect Dis. 1998;178:1806-11.

Vaziri ND, Xu ZG, Shahkarami A, Huang KT, Rodriguez-Iturbe B, Natarajan R. Role of AT-1 receptor in regulation of vascular MCP-1, IL-6, PAI-1, MAP kinase, and matrix expressions in obesity. Kidney Int. 2005;68:2787-93.

Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. J Periodontol. 2010;81:99-108.

Vergunst CE, Gerlag DM, Lopatinskaya L, Klareskog L, Smith MD, van den Bosch F, Dinant HJ, Lee Y, Wyant T, Jacobson EW, Baeten D, Tak PP. Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. Arthritis Rheum. 2008;58:1931-9.

Wang Y, Cui L, Gonsiorek W, Min SH, Anilkumar G, Rosenblum S, Kozlowski J, Lundell D, Fine JS, Grant EP. CCR2 and CXCR4 regulate peripheral blood monocyte pharmacodynamics and link to efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Inflamm (Lond). 2009;6:32.

Wara AK, Mitsumata M, Yamane T, Kusumi Y, Yoshida Y. Gene expression in endothelial cells and intimal smooth muscle cells in atherosclerosis-prone or atherosclerosis-resistant regions of the human aorta. J Vasc Res. 2008;45:303-13.

Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. Eur J Immunol. 1999;29:700-12.

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest. 2006;116:115-24.

Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. Clin Chem. 1990;36:1269-81.

Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. J Periodontol. 2008;79:1514-9.

Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. Expert Opin Ther Pat. 2009;19:295-303.
Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. Inflamm Allergy Drug Targets. 2007;6:101-7.
Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta. 2010;411:1570-9.
Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. J Periodontol. 2000;71:460-7.
Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. J Leukoc Biol. 1997;62:634-44.
Yu X, Antoniades HN, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. Infect Immun. 1993;61:4622-8.
Yu X, Graves DT. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflamed human gingiva. J Periodontol. 1995;66:80-8.
Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. J Med Genet. 2004;41:e59.
Zakharyan R, Boyajyan A, Arakelyan A, Melkumova M, Mrazek F, Petrek M. Monocyte chemoattractant protein-1 in schizophrenia: -2518A/G genetic variant and protein levels in Armenian population. Cytokine. 2012;58:351-4.
Zhang Y, Ernst CA, Rollins BJ. MCP-1: Structure/Activity Analysis. Methods. 1996;10:93-103.
Zheng M, Lv LL, Cao YH, Liu H, Ni J, Dai HY, Liu D, Lei XD, Liu BC. A pilot trial assessing urinary gene expression profiling with an mRNA array for diabetic nephropathy. PLoS One. 2012;7:e34824.
Zhong C, Luzhan Z, Genshan M, Jiahong W, Xiaoli Z, Qi Q. Monocyte chemoattractant protein-1-2518 G/A polymorphism, plasma levels, and premature stable coronary artery disease. Mol Biol Rep. 2010;37:7-12.
Zhu X, Meng H, Xu L, Zhang J, Chen Z, Shi D, Feng X. Combined association of CCR2-V64I and MCP-1 -2518A/G polymorphism with generalised aggressive periodontitis in Chinese. Chin J Dent Res. 2010;109-114.
Zhu X, Meng H, Zhang L, Xu L, Chen Z, Shi D, Feng X, Zhang X. Association analysis between the -2518MCP-1(A/G) polymorphism and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. J Periodontol Res. 2011;47:286-92.
Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome Biol. 2006;7:243.

9. EKLER

9.1. EK A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : B.30.2.SEL.0.20.71.00.281- 1131
Konu :

Tarih : 01 MART 2011

Sayın
Prof.Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN
S.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi: 25.01.2011 tarihli dilekçeniz;

"Periodontal hastalık, monosit kemoatraktan protein - 1 ve CC kemokin reseptör 2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişki" başlıklı doktora tez çalışması hakkında Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 27 Ocak 2011 tarihli aldığı 2011/016 sayılı karar ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. Rahmi ÖRS
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki: 1

Adres: S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı 42080 –Meram KONYA
Faks: (0332) 223 61 81
Web Adresi: www.etikmeram@gmail.com
Bilgi İçin : Personel Şubesi Tel : (0332) 2236523
:Etik Kurul Tel : (0332) 2236180

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

Toplantı Sayısı:03	Toplantı Tarihi: 27.01.2011

Karar Sayısı:2011/016: S.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN'in **"Periodontal hastalık, monosit kemoatraktan protein - 1 ve CC kemokin reseptör 2 gen polimorfizmleri arasındaki ilişki"** başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 25.01.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, doktora tez çalışmasının S.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN'in sorumluluğunda S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) desteği sağlandığına dair belgenin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

ASLI GİBİDİR
27.01.2011

Prof.Dr.Rahmi ORS
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

9.2. EK B: Hasta Onam Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Periodontal hastalık gelişimi bölgesel etkenlerin, konak cevabının, çevresel faktörlerin, genetik yatkınlıkların ve alınan tıbbi tedavilerinin önemli rol oynadığı, çok faktörlü bir hastalıktır. Bu nedenle klinik bulguların laboratuarda yapılan ilave tetkiklerle birleştirilerek hastalığın ağızda bulgular vermeden erken dönemde tespiti, sınıflandırılabilmesi, sistemik durum ve mevcut çevresel koşullar göz önüne alınarak doğru tedavi planının uygulanabilmesi ve uzun dönemli tedavi sonuçlarının öngörülebilmesi de son derece önemlidir.

Genetik yapı ile dişeti hastalığı arasında ilişki kurulmaya çalışılması dişeti hastalığına yatkın bireylerin tespit edilmesini sağlayacaktır. Hastalığa genetik olarak yatkınlık gösteren bireylerin tespiti, takibinin daha dikkatli yapılmasını sağlayarak bu hastalarda tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesinde yardımcı olabileceği için bu çalışma oldukça önemlidir. Bu amaçla Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji kliniğine başvuran genel sağlık sorunu olmayan klinik ve radyografik muayene sonucunda dişetlerinde ve çevre kemik dokusunda yıkım olan ve dişeti sağlığı iyi olan bireylerden kan ve dişeti oluğu sıvısı örnekleri alınacaktır. Daha sonra başlangıç periodontal tedavi (ağız bakımı, diştaşı temizliği ve kök yüzeyi düzleştirmesi) yapılarak sağlıklı ağız ortamı için gereken koşullar sağlanmış olacaktır.

Dişeti sağlığı iyi olan bireylerde de alışılageldiği şekilde "rutin" olarak yapılması gerekli olan destekleyici periodontal tedavi (ağız bakımı ve diştaşı temizliği) uygulanacaktır. Daha ileri yaşlarda dişeti hastalığının ortaya çıkma ihtimalinin ve genetik olarak hastalığa yatkınlığın değerlendirilmesi amacıyla kan ve dişeti oluğu sıvısı örnekleri alınacaktır.

Bu çalışmanın kişilere herhangi bir zararı bulunmamakta ve kendilerinden veya kurumlarından herhangi bir mali destek talep edilmemektedir. Bu araştırma sürecinde ve sonrasında hastaların klinik bilgileri gizli tutulacak, sadece hastalığı ile ilişkili bulguları kullanılacaktır. Çalışmamızda hastaları incitici bir işlem veya yeni bir ilaç uygulaması bulunmamaktadır.

Araştırmamıza 102 periodontal olarak sağlıklı ve 102 periodontal olarak hastalıklı toplam 204 gönüllü kişinin katılması planlanmaktadır. Çalışma süresi içinde herhangi bir problem durumunda hastaların araştırma görevlisi Dt. Şadiye COŞKUNER'e (0332) 2231250 numaralı telefondan ulaşması mümkün olacaktır.

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih .../.../….

Gönüllünün adı soyadı, imzası, adresi (varsa telefon/faks no):

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisinin,

Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no):

Açıklamaları yapan araştırıcının adı soyadı, imzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin adı soyadı, imzası, Görevi:

10. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Denizli'de doğdu. İlköğrenimini Beyağaç İlkokulu'nda 1997'de, ortaokul ve lise öğrenimini Muğla Anadolu Lisesi'nde 2003 yılında tamamladı. Aynı yıl girdiği Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden 2008 yılında dönem birincisi olarak mezun oldu. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim dalı'nda doktora programına başladı. 2011 yılında atandığı Sağlık Bilimleri Enstitüsü araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaya devam etmektedir.