

ARAŞTIRMA

Tükürük ve Diş Eti Oluğu Sıvısı *Developmental Endothelial Locus-1* (Del-1) ve *Lymphocyte function-associated antigen-1*(LFA-1) Seviyelerinin Farklı Periodontitis Tiplerinde Değerlendirilmesi

Emine Elif Mutafçılar(0000-0003-1882-553X)^α, Seyit Ali Kayıs(0000-0003-4791-8946)^β,
Sema S. Hakkı(0000-0001-8665-6235)^α

Selcuk Dent J, 2021; 8: 61-68 (Doi: 10.15311/selcukdentj.635681)

Başvuru Tarihi: 22 Ekim 2019
Yayına Kabul Tarihi: 02 Aralık 2019

ÖZ

Tükürük ve Diş Eti Oluğu Sıvısı *Developmental Endothelial Locus-1* (Del-1) ve *Lymphocyte function-associated antigen-1*(LFA-1) Seviyelerinin Farklı Periodontitis Tiplerinde Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı; farklı yıkım paterni gösteren periodontal hastalığa sahip bireylerde nötrofil adezyon yolağının sıkı adezyon basamağında düzenleyici sitokinler olan *Developmental Endothelial Locus-1*(Del-1) ve *Lymphocyte function-associated antigen-1*(LFA-1) tükürük ve diş eti oluğu sıvısı seviyelerinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntemler: Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvuran sağlıklı ve sigara içmeyen 42 birey çalışmaya dahil edildi. Klinik ve radyolojik muayene sonucu *Grade B* periodontitis(n=23) ve *Grade C* periodontitis (n=19) grubuna dahil edilen bireylerin sondlama cep derinliği(SCD), klinik ataçman seviyesi(KAS), plak indeksi(PI), gingival indeks(GI), sondlamada kanama yüzdesi(SKY) gibi klinik kayıtlarının alınmasını takiben tükürük ve diş eti oluğu sıvısı(DOS) örnekleri toplandı. Del-1 ve LFA-1 sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz için gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. p<0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak belirlendi.

Bulgular: Klinik parametreler değerlendirildiğinde; SCD, PI ve SKY değerleri anlamlı şekilde, KAS ve GI değerlerinin anlamlı olmaksızın *Grade C* periodontitis grubunda yüksek olduğu görüldü. ELISA analizleri sonucu LFA-1 ve Del-1 tükürük ve DOS seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Proenflamatuvar LFA-1 tükürük ve DOS seviyelerinin, görece daha şiddetli periodontal hastalığa sahip bireylerin bulunduğu *Grade C* grubunda daha yüksek olma eğiliminde olduğu görüldü. LFA-1 antagonisti olarak bilinen Del-1 tükürük seviyelerinin *Grade B* grubunda, DOS Del-1 seviyelerinin ise *Grade C* grubunda yüksek olma eğilimi olduğu tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışma ile nötrofillerin transendotelial migrasyonunda rol oynayan Del-1 ve LFA-1 sitokin düzeylerinin periodontal hastalık şiddeti ile ilgili bilgi verebileceği ancak bu sitokinlerin periodontal hastalığıdaki rollerinin kesin olarak belirlenebilmeleri için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELE

Diş Eti Oluğu Sıvısı, Periodontitis, Sitokin, Tükürük

Periodontal hastalıkların mikrobiyal plak ile konak cevabı arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıktı; genetik, diyabet gibi faktörlerin ise konak cevabını yönlendirdiği bilinmektedir.¹ Periodontal patogeneizde konak cevabı

ABSTRACT

Salivary and Gingival Crevicular Fluid levels of *Developmental Endothelial Locus-1* (Del-1) and *Lymphocyte function-associated antigen-1*(LFA-1) in Different Types of Periodontitis

Background: The aim of this study is to evaluate salivary and gingival crevicular fluid(GCF) levels of *Developmental Endothelial Locus-1*(Del-1) and *Lymphocyte function-associated antigen-1*(LFA-1) which are regulators of firm adhesion of neutrophils in neutrophil recruitment in different grades of periodontitis.

Methods: A total of 42 non-smoker and healthy individuals who applied to Selcuk University, Faculty of Dentistry, Department of Periodontology were included in this study. After clinical and radiographical examination, patients were grouped as *Grade B*(n=23) or *Grade C*(n=19). Probing pocket depth(PPD), clinical attachment level(CAL), plaque(PI) and, gingival index(GI) and bleeding sites on probing(BOP) were recorded. Saliva and GCF samples were collected and cytokine analysis were performed by ELISA. Mann-Whitney U test is used for statistical analysis and level of significance was determined as p≤0.05.

Results: All clinical parameters were found higher in *Grade C* periodontitis group, while CAL and GI values showed no significance. In biochemical analysis, there was no significance between groups in salivary and GCF levels of LFA-1 and Del-1. Besides these findings; there was a tendency to be higher in salivary and GCF levels of LFA-1 in *Grade C* group. As an antagonist mediator of LFA-1, salivary Del-1 tends to be higher in *Grade B* periodontitis group while GCF levels of Del-1 tends to be higher in *Grade C* periodontitis group.

Conclusion: Findings of this study suggested that salivary and GCF level of Del-1 and LFA-1 might give information about disease severity. Further longitudinal studies with greater numbers of participants are required to define the roles of these cytokines in periodontal pathogenesis.

KEYWORDS

Cytokine, Gingival Crevicular Fluid, Periodontitis, Salivary

mekanizmalarının ilk basamaklarından olan nötrofillerin transendotelial migrasyonu enflamasyonun temel olaylarından. Nötrofiller; transendotelial migrasyonla enflamasyon

^α Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji AD, Konya, Türkiye

^β Karabük Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik AD, Karabük, Türkiye

sahasına ulaşarak; bakteri ve bakterilerin virülans faktörlerini elimine etmeye çalışarak bakteriyel invazyonu engellemeye çalışırlar. Nötrofillerin bu görevi patojene karşı non-spesifik ilk savunma hattını oluşturması açısından akut immün yanıtta önem taşımaktadır. Bakteri ürünlerinin vazoaktif ürünlerin salınımını uyarmasıyla artan permeabilite sonrası nötrofillerin transendotelyal migrasyonu çeşitli sitokinlerle düzenlenen, iyi organize olmuş basamaklarla gerçekleşmektedir. Bu basamaklar yuvarlanma, sıkı adezyon ve transmigrasyon olarak bilinmektedir. Nötrofil yüzeyinde bulunan L-selektin ve Sialyl-Lewis-x proteini endotel yüzeyindeki E-selektin ile etkileşime girerek nötrofillerin damar içerisindeki akışını yavaşlatarak damar endoteline yakın olacak şekilde yuvarlanma hareketi yapmalarını sağlar. Damar lümenine yakın olarak yuvarlanma hareketi yapan nötrofil sayısının artması diğer enflamatuvar uyarılarla birlikte nötrofilleri sıkı adezyonda görevli LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*), *Mac-1* ve *p150,95* gibi integrin reseptörlerini artırma yönünde uyarırlar. Endotel yüzey adezyon moleküllerine bağlanmada daha etkin bir ligand olan LFA-1 endotel üzerindeki adezyon moleküllerinden ICAM-2 (*Intercellular-adhesion-molecule-1*) ve ICAM-1 (*Intercellular-adhesion-molecule-1*) ile bağlandığında sıkı adezyon gerçekleşmiş olur. Transmigrasyon aşamasında; nötrofiller üzerinde ELAM-1 (*endothelial-leukocyte-adhesion-molecule-1*), VCAM-1 (*vascular-cell-adhesion-molecule-1*), ICAM-1 ve PECAM-1 (*Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1*) gibi adezyon molekülleriyle nötrofilin doku içerisine geçişi sağlanır.² Enflamasyon sahasına ulaşan nötrofiller çeşitli mekanizmalarla bakteri ve bakteri ürünlerini elimine etmeye çalışırken; özellikle myeloperoksidaz, hidrolaz, elastaz ve kollajenaz gibi enzimlerin kullanıldığı ekstraselüler öldürme yöntemi sırasından konak dokusunu da yıkıma uğratırlar. Periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıklarda bu etkinin hastalık şiddetindeki rolü dikkat çektiğinden; transendotelyal migrasyonu sağlayan mediyatörlerin yanında, sınırlayan inhibitör mekanizmalar da önem kazanmıştır. Enflamatuvar hücrelerce sentezlenen Pentraxin-3; P-selektin bağımlı yuvarlanma aşamasını inhibe ederken, Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ailesinden Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) VCAM ve ICAM bağımlı transmigrasyon aşamasını inhibe etmektedir. Çalışmamızda konu aldığımız (Developmental endothelial locus-1) Del-1'in LFA-1 bağımlı ICAM-1 ile bağlanmayı engelleyerek sıkı adezyonu inhibe ettiği bilinmektedir.

Developmental endothelial locus-1 (Del-1) başlıca endotel hücrelerinden sentezlenen; C terminal ucunda 2 adet discoidin benzeri molekülü takiben, N terminal ucunda 3 adet tekrarlayan epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri molekülden oluşan 52 kDa ağırlığında bir moleküldür. Bu moleküler diziliş yapısı nedeniyle; *EGF-like repeats and discoidin 1-like domains 3*

(EDIL3) olarak da isimlendirilmektedir.³ İlk olarak embriyonik süreçte; vasküler formasyonda rol aldığı tespit edilen Del-1'in çok katlı damar duvarı sentezinde gerekli olan osteopontin ve vitronektin gibi ekstraselüler matriks yapılarının endotel hücrelerine bağlanmasında görev alarak anjiyojeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir.⁴ Nötrofillerin sıkı adezyonunun inhibisyonu yoluyla enflamatuvar patogeneze rol olan Del-1; aynı zamanda apoptotik nötrofillerin makrofajlar tarafından fagositozunda yer alarak enflamasyonun rezolusyonunda da görev almaktadır.⁵ LFA-1 de tıpkı Del-1 gibi multifonksiyonel bir mediyatör olarak; transendotelyal migrasyonun yanısıra; T hücre metabolizmasında gerekli gen ekspresyonlarında; hücre iskeletinin organizasyonunda ve bazı sinyal moleküllerinin aktivasyonunda görev aldığı bilinmektedir.⁶

Nötrofillerin endotel yüzey adezyon reseptörü ICAM-1 ile LFA-1 bağımlı sıkı adezyonunun Del-1 yoluyla inhibisyonu; ilk olarak *in-vitro* çalışmalarda saptanmıştır. LFA-1 defektli nötrofillerde, artmış Del-1 seviyeleri ile Del-1 defektli varlığında artmış LFA-1 bağımlı nötrofil infiltrasyonu bu karşılıklı ilişkiyi doğrular niteliktedir. Yapılan hayvan deneyi çalışmalarında da Del-1 defektli hayvanlarda gözlenen artmış nötrofil infiltrasyonu ve enflamasyona bağlı yıkım dikkat çekmektedir. Histolojisinde artmış lökosit infiltrasyonu izlenen, kronik enflamatuvar patogeneze sahip ve periodontitiste LFA-1 ve Del-1 mediyatörleri ele alındığında; Del-1 defektli farelerde; artmış alveolar kemik kaybı olması, bir başka çalışmada Del-1 defektli primatlarda artmış osteoklast sayılarının izlenmesiyle desteklenmektedir. Yapay olarak oluşturulmuş periodontitis modellerinde de artmış LFA-1 seviyeleri ile düşük Del-1 seviyeleri negatif olarak korelasyon göstermektedir. Bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışmalardan birinde; sağlıklı, gingivitisli, kronik ve agresif periodontitisli bireylerden alınan tükürük örnekleri incelenmiş; kronik ve agresif periodontitisli bireylerde, gingivitisli ve sağlıklı bireylere göre yüksek Del-1 seviyeleri ile düşük LFA-1 seviyeleri tespit edilmiştir. Başka bir klinik çalışmada ise periodontitisli bireylerden alınan diş eti oluşu sıvısı örneklerinde cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası artmış Del-1 seviyeleri tespit edilirken; literatürde; bu sitokinlerin, tükürük ve diş eti oluşu sıvısının birlikte ele alındığı çalışmaların bulunmayışı dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada farklı periodontal durumlara sahip bireylerden elde edilen tükürük ve diş eti oluşu sıvısı örneklerinde Del-1 ve LFA-1 sitokin düzeylerinin incelenmesi ve farklı periodontitis tiplerinde bu düzeylerin kıyaslanması amaçlanmaktadır.

BİREYLER VE YÖNTEM

Hasta gruplarının oluşturulması

Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Kliniğine başvuran sistemik olarak sağlıklı bireyler klinik ve radyografik olarak incelenerek 1999 sınıflandırmasına uygun olarak 23 kronik periodontitis ve 19 agresif periodontitis olmak üzere toplam 42 hasta çalışmaya dahil edildi.⁷ Çalışma süresi içinde 2017 European Federation of Periodontology (EFP) ve American Academy of Periodontology (AAP)'nin 2017 çalıştayında 'Periodontal ve Periimplant Hastalıklar ve Durumların Sınıflaması' sınıflandırmasının yayınlanmasından sonra, hastalar bu kapsamda geriye dönük değerlendirildiğinde, 26 birey *Grade B* ve 21 birey *Grade C* olacak şekilde projeye dahil edildi.⁸ Çalışmaya dahil edilen kronik periodontitis grubunda 2, agresif periodontitis grubundan 6 kişi; *Grade B* veya *C* grubuna dahil edilebilecek şekilde net ayırım yapılamadığından çalışma kapsamından çıkarıldı. Bireylerin yeni sınıflamaya göre evre ve dereceleri **Tablo 1.**'de görülmektedir.

Tablo 1.

Dahil edilen bireylerin dağılımı

2017 Sınıflamasına Göre Bireylerin Dağılımı		
<i>Grade B</i> n=23	Evre 2	n=17
	Evre 3	n=6
<i>Grade C</i> n=19	Evre 2	n=1
	Evre 3	n=13
	Evre 4	n=5

Çalışmaya dahil edilme kriterleri; 18-50 yaş aralığında olmak, herhangi bir sistemik problem bulunmaması, hamilelik ve laktasyon döneminde bulunmaması, sigara içmiyor olmak, kemoterapi, radyoterapi ya da immunsupresyon tedavisi görmemiş olmak ve ağız içinde en az 20 daimi diş bulunması olarak belirlenmiştir. Bireyler; 6 ay içinde periodontal sağlığı etkileyebilecek antibiyotik ve antienflamatuvar ilaç kullanımı ve 6 ay içerisinde herhangi bir periodontal tedavi görülmüş olması durumunda çalışma kapsamına dahil edilmemiştir.

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 15.11.2016 tarih ve 06 sayılı onay ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu desteği ile (Proje No: 17102013) ile gerçekleştirildi. Bireyler araştırma kapsamıyla ilgili detaylı olarak bilgilendirilip, kendilerinden bilgilendirilmiş onam formu alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Klinik Kayıtların Alınması

Sondlama cep derinliği ölçümü; diş eti kenarı ve cep tabanındaki mesafenin ölçümü ile belirlenirken; klinik ataçman seviyesi ölçümü ise mine-sement sınırı esas alınarak, her diş için vestibül ve lingual yüzeyde mezial, distal ve orta noktalar olmak üzere toplam 6 noktadan Williams (Hu-Friedy®, Chicago, Illinois, USA.) periodontal sondu kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen veriler ile her hasta için ortalama KAS ve ortalama SCD değerli kayıt altına alınmıştır. Plak indeksi ölçümleri, dişlerin tüm yüzeylerine değerlendirilerek verilerin ortalamaları dişlerin her biri için plak indeksi skorunu belirlerken, tüm skorların toplamının diş sayısına bölünmesi ile de bireylerin plak skor değerleri hesaplandı.⁹ Gingival dokudaki enflamasyonun gözle görülür belirtilerinin skorlanması ile ölçülen indeks değerleri her bir dişin tüm yüzeylerinden alınarak diş için ortalama indeks değeri tespit edildi. Hastalara ait gingival indeks ortalamaları da tüm indeks değerlerinin toplamının, toplam diş sayısına bölünmesi sonucu belirlendi.¹⁰ Sondun kendini ağırlığına yapılan sondlama işleminden 30 sn sonra gingival sulkusta kan varlığı pozitif (+) değer alırken, kanama yoksa negatif (-) değerler her bir dişin 6 bölgesi için değerlendirildi. Veriler ile tüm ağız sondlamada kanama yüzdesi hesaplandı.¹¹ Aynı zamanda DMFT ve vücut kitle indeksi (VKI) değerleri her birey için hesaplanarak kaydedildi.

Tükürük ve Diş Eti Oluğu Sıvısı Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya dahil edilen hastaların periodontal indeks değerlerinin ölçümü öncesi uyarılmamış tükürük örnekleri toplandı. Hastalar tükürük örneği toplamadan en az 1 saat önce yemek yememeleri, dişlerini fırçalamamaları, sakız çiğnememeleri konusunda uyarıldı. Örnekleme işlemi kliniğin belli bir köşesinde, mümkün olduğunca uyanarlardan uzak, oturur pozisyonda 15 dakika boyunca ağızda biriken tükürüğün, ağırlığı bilinen bir kaba tükürülmesiyle elde edildi. Elde edilen örnekler hassas terazide (Precisa, XB220A, Labor Technique, Swissmade) tartılarak toplam tükürük hacmi (1gr=1ml) hesaplandı. Örnekler her birinde 1 ml tükürük olacak şekilde Eppendorf (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Bahnhofstrasse 10, Wertheim, Germany.) tüplere konuldu.

Diş eti oluğu sıvısı örnekleri, tükürük örneği toplandıktan ve periodontal ölçümler yapıldıktan en az 48 saat sonra yapıldı. Örnekleme yapılacak dişler; herbiri kendi grubunun en derin cebine sahip olması şartı ile bir tek köklü, bir çift köklü, bir üç köklü toplam 3 diş olmak üzere belirlendi. Aynı kök sayısına ve eşit cep derinliğine sahip dişler arasında tükürük kontaminasyonunu en aza indirmek amacıyla üst çene dişleri tercih edildi. Dişler pamuk tamponlarla izole edilerek, hava spreyi ile hafifçe kurutulduktan sonra Periopaper stripler diş eti oluğuna 1mm derinlikte yerleştirilerek 30 sn beklendi. Kâğıt striplere emilen diş eti oluğu sıvısı hacmi Periotron cihazında μ l cinsinden ölçüldü. Üç ayrı diştan alınan

stripler 1000 µl fosfat tampon (Phosphate Buffer Saline; PBS, pH=7,4) solüsyon içeren Eppendorf tüplere kondu.

Örnekleme seanslarının; çalışmaya dahil edilen hastaların hepsinde, sirkadiyen ritim ile tükürük akış hızının ve hacminin değişebileceği gerekçesiyle günün benzer saatlerinde olmasına dikkat edildi. Tükürük ve DOS örnekleri sitokin analizi süresine kadar -80C°'de kontaminasyonu ve hacim kaybını engellemek için Parafilm (ISOLAB, Akron, Ohio, USA) ile kapatılarak saklandı.

Biyokimyasal Analiz

ELISA analizi öncesine dek -80C°'de saklanan örnekler, oda ısısına getirildikten sonra hücre debrisinin elimine edilmesi için 1 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi. Çalışılacak kitlerin analizine her bir sitokin için değişik konsantrasyonlarda standart solüsyonu hazırlanarak başlandı. 96 kuyucuklu plâtelere; kit prosedür bilgilerine uygun olarak 100 µl standart, tükürük veya DOS örneği konularak 37C°'de 1 saat inkübe edildi.

Daha sonra tüm kuyucuklara 100 µl A reaktif ajanı eklenip 37C°'de 1 saat inkübasyon tekrarlandı. İnkübasyon sonrası 350 µl yıkama solüsyonu kullanılarak otomatik yıkama cihazında 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası 100 µl B reaktif ajanı her bir kuyucuğa eklenerek 37C°'de 30 dakika inkübe edildikten sonra kuyucuklar 5 kez daha yıkandı. 90 µl substrat solüsyonu eklenen kuyucukların; 37 C°'de yaklaşık 10 dakika inkübasyonu sonucu mavi renk aldığı gözlemlendi. Reaksiyonu durduran 50 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklendiğinde kuyucukların renginin maviden sarıya döndüğü izlendi. Reaksiyonun tamamlanması sonrası ELISA optik okuyuculu cihazda 450 nm dalga boyunda okumalar gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizi öncesi, verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk test ve Anderson Darling test ile belirlendi. Normal dağılım göstermeyen verilerinin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

Demografik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen bireylerin cinsiyet dağılımları incelendiğinde, gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark görülmezken, yaş ortalamaları açısından gruplar arası anlamlı fark izlendi. Analiz sonuçlarına göre *Grade C* grubunun (31.21 ± 5.34), *Grade B* grubuna göre (38.83 ± 5.94) anlamlı olarak düşük yaş ortalamasına sahip olduğu görüldü. VKİ değerleri açısından gruplar arası herhangi bir fark izlenmezken, *Grade B* grubunun anlamlı şekilde daha yüksek DMFT değerlerine sahip olduğu tespit edildi. (Tablo 2.)

Tablo 2.

Çalışmaya dahil edilen bireylerin demografik parametrelerinin karşılaştırılması

Demografik Parametreler	GRADE Grade B n=23 Grade C n=19	Ortalama+Standart Sapma	Minimum	Ortanca	Maximum	p değeri*
YAŞ	B	38.83±5.94	31.00	38.00	50.00	0.0003
	C	31.21±0.916	2.870	3.725	6.344	
VKİ	B	27.314±3.836	207010	26.881	35.640	p> 0.05
	C	26.41±4.47	17.35	25.34	33.98	
DMFT	B	6.591±3.362	2.000	6.000	14000	0.023
	C	4.412±1.970	1.000	4.000	8.000	

*:Mann Whitney U test ile elde edildi (VKİ: Vücut kitle indeksi. DMFT: D:çürük, M:kayıp, F:dolgu T:diş sayısı oranı)

Klinik Bulgular

Alınan periodontal parametreler değerlendirildiğinde; tüm ağız ve diş eti oluşu sıvısının örnekleme için seçilen dişlerden ölçülen bölgesel SCD, Gİ ve SKY değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde *Grade C* periodontitis grubunda yüksek olduğu görülürken, tüm bölgesel periodontal parametrelerin anlamlı şekilde *Grade C* periodontitis grubunda yüksek olduğu görüldü.

Tablo 3.

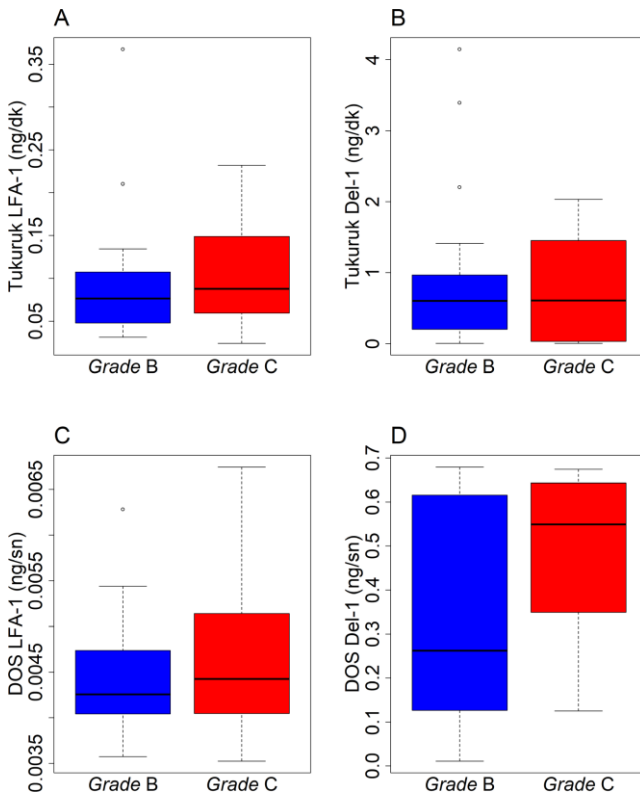
Periodontal parametreler.

Periodontal Parametreler	GRADE	Ortalama+Standart Sapma	Minimum	Ortanca	Maximum	p değeri*
SCD (mm)	B	3.121±0.624	2.036	3.136	4.940	0.001113
	C	3.970±0.916	2.870	3.725	6.344	
KAS (mm)	B	2.896±0.579	2.018	2.870	4.993	p> 0.05
	C	2.8451±0.4082	2.3148	2.8154	4.0816	
Pİ	B	2.3116±0.2888	1.2857	2.4042	2.6428	p> 0.05
	C	2.3941±0.4259	1.2068	2.4285	3.000	
Gİ	B	1.9457±0.2533	1.500	2.000	2.4071	0.004591
	C	2.3146±0.4005	1.7272	2.2592	2.9642	
SKY (%)	B	0.5518±0.1897	0.1954	0.5384	0.9642	0.03592
	C	0.6867±0.1940	0.3214	0.6309	1000	

*:Mann-Whitney U test ile elde edildi (SCD:Sondlama cep derinliği.KAS:Klinik ataçman seviyesi. Pİ:Plak indeks. Gİ:Gingival indeks. SKY:Sondlamada kanama yüzdesi)

Biyokimyasal Bulgular

Tükürük hacimlerinin, örnekleme süresine bölünmesiyle hesaplanan tükürük akış hızları değerlendirildiğinde; gruplar arası anlamlı fark tespit edildi. DOS hacimleri açısından bakıldığında ise *Grade C* grubunda anlamlı şekilde yüksek DOS hacimleri izlendi. Örneklerin sitokin analizi sonucu; Del-1 tükürük seviyelerinin *Grade B* grubunda daha yüksek olduğu; DOS Del-1 seviyelerinin ise *Grade C* grubundan daha yüksek olduğu izlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0.05$). LFA-1 seviyeleri açısından bakıldığında; tükürük ve DOS seviyelerinin *Grade C* grubunda *Grade B* grubuna kıyasla daha yüksek olduğu izlenmekle birlikte gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. ($p>0.05$).



Grafik 1

Diş eti oluşu sıvısı ve tükürük Del-1 ve LFA-1 seviyelerinin *Grade B* ve *Grade C* grupları arasında karşılaştırılması

TARTIŞMA

Bu çalışmada periodontitisin farklı yıkım paternine sahip, iki periodontitis hasta grubu oluşturularak, tükürük ve diş eti oluşu sıvısı örneklerinde transendotelial migrasyonda görevli LFA-1 ve LFA-1 ile antagonist çalışarak enflamasyonu sınırlamaya çalışan antiinflamatuvar Del-1 sitokin seviyeleri değerlendirilmiştir. Dahil edilen bireylerin demografik verilerin değerlendirilmesi sonucu *Grade C* grubunda anlamlı şekilde daha düşük yaş ortalaması tespit

edilmesi çalışmamızın bir limitasyonu olmakla beraber, periodontal hastalık sınıflamasına göre *Grade C* grubunda izlenen; yüksek kemik kaybı/yaş oranı, yani erken yaşta benzer yaş grubu ortalamasına göre şiddetli kayıp izlenmesi ile açıklanabileceği düşünülmektedir.⁸ DMFT oranlarının *Grade B* grubunda fazla olması ise; sınıflamaya göre *Grade C* grubunda izlenen mikrobiyal yük ile doğru orantılı olmayan yıkım ve *Grade B* grubunda yaş ortalamasının yüksek olması dolayısıyla eksik diş ve dolgulu diş sayısının da fazla olması ile açıklanabilir. Bölgesel ve tüm ağız SCD, Gİ, Pİ ve SKY değerleri değerlendirildiğinde; *Grade C* grubunda periodontal parametrelerin daha yüksek olduğu görüldü. Benzer olarak bölgesel KAS değerlerinin *Grade C* grubunda yüksek olduğu izlenirken tüm ağız KAS değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Tükürük hacimleri açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı fark izlenmezken; *Grade C* grubunda yüksek DOS hacimleri izlenmesinin; *Grade B* ye göre daha şiddetli enflamasyona sahip olunmasıyla açıklanabileceği düşünülmektedir.

Kronik enflamasyonda artan nötrofil infiltrasyonu bakteriyel invazyonu engellemeyi yanı sıra konak kaynaklı doku hasarına da yol açtığından antiinflamatuvar mekanizmalar ile enflamasyonun sınırlandırılması önem taşımaktadır. Ancak literatürde, enflamatuvar yanıtı artıran çok sayıda adezyon reseptörü tespit edilmişken, lökosit adezyon yolağındaki endojen inhibitörlerle ilgili çok daha az bilgi bulunmaktadır. Transendotelial migrasyonun sıkı adezyon aşamasında görülen LFA-1 yüzey reseptörü ile interselüler adezyon molekülü olan ICAM bağımlı lökosit adezyonunun Del-1 yoluyla inhibisyonu antiinflamatuvar mekanizmaların bir örneği olarak çalışmamızda ele alındı. Choi ve ark., endotel hücrelerinden sentezlenen, yaralanma durumunda anjiyojenez ve remodelasyon ilişkili glikoprotein yapıdaki Del-1'in; enflamatuvar süreçte endotel hücreleri ve lökosit hücreleri arasındaki etkileşimi değerlendirmiştir. Çalışmada *in-vitro* olarak; LFA-1 defektli nötrofillerde artmış Del-1 seviyeleri izlenirken, Del-1 defektli varlığında, LFA-1'in görev aldığı nötrofil adezyonunun arttığı görülmüştür. Bu inhibitör rol tespit edildiğinde, laboratuvar ortamında oluşturulmuş peritonitte ekstrinsik çözülebilir intravenöz Del-1 uygulamasının ICAM bağımlı lökosit adezyonunun inhibe ettiği gözlenmiştir. Choi ve ark.'nın bu çalışmada Del-1'in LFA-1 ile antagonist çalışan antiinflamatuvar potansiyeline dikkat çekerken; kronik enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda Del-1'in sağladığı antiinflamatuvar etkinin önemli olabileceği fikri ortaya konmuştur.¹² Eskin ve ark.'nın yaptığı çalışmada sistemik enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların yanısıra periodontal hastalıkların da Del-1 ile LFA-1 ilişkisinin belirlenebilmesi için doğru bir model olduğu, Del-1'in; kendisi gibi nötrofil

infiltrasyonunu inhibe eden Pentraxin'in aksine lokal olarak dokulardan sentezlenmesi nedeniyle de periodontitis gibi lokal olarak enflamatuvar yıkım izlenen bir hastalıkla birlikte ele alınması gerektiği belirtilmiştir.

Belirtilen çalışmada; Del-1 defektli farelerde kontrol grubu farelere göre, TNF, IL-6 ve RANKL ve özellikle IL-17 olmak üzere proenflamatuvar sitokinler ve kemik yıkım belirteçlerinde artışla birlikte azalmış alveolar kemik seviyesi gözlenmiştir. Aynı farelerden alınan gingival biyopsi örneklerinde gerçekleştirilen immünohistokimyasal deneylerde artmış nötrofil infiltrasyonu gözlenirken; artan enflamatuvar yıkımın LFA-1 bağımlı nötrofil infiltrasyonu ile ilişkisini belirlemek için hem Del-1 hem LFA-1 defektli fareler incelendiğinde ise azalan nötrofil infiltrasyonu, azalan IL-17 ekspresyonu ve azalan kemik yıkımı tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular sonucu; Del-1 defektinin; LFA-1 bağımlı nötrofil infiltrasyonu ile periodontal enflamasyonu şiddetlendirerek kemik kaybına neden olabileceği düşünülmüştür. Del-1'in, periodontal hastalıkta enflamasyonun şiddetini baskılayarak terapötik olarak kullanıma potansiyeli fikrinden yola çıkılarak eksojen *P.gingivalis* ile indüklenmiş periodontitisli ve kendiliğinden gelişen periodontitisli farelerde Del-1'in çözülebilir formu gingivaya enjekte edildiğinde proenflamatuvar sitokin, kemokin, kemokin reseptörü seviyelerinde azalma izlenmiştir. Fare molar dişine ligatür uygulanması sonucu yapay olarak indüklenen periodontitis modelinde çözülebilir Del-1 uygulanması sonucu kemik yıkımının yüksek oranda inhibe olduğu ancak bu etkinin LFA-1 defektli farelerde etkisiz denilebilecek kadar az olduğu tespit edilmiştir. Bu durum Del-1'in antienflamatuvar rolünde LFA-1 bağımlı yolun önemini ortaya koymaktadır. Bu görüşü destekleyen bir başka bulgu da LFA-1'in direk inhibitörü olan LFA878 molekülünün gingivaya enjeksiyonunun; çözülebilir Del-1 uygulaması ile oluşan inhibisyonunda daha az etkili olduğunun tespit edilmesidir. Eskin ve ark., tüm bu bulgulara dayanarak Del-1'in endojen bir antienflamatuvar sitokin olarak kronik enflamatuvar bir hastalık olan periodontitisin tedavisinde potansiyel taşıdığı sonucuna varmışlardır.¹³

Del-1'in osteoklastogenezdeki etkisini ele alan başka bir çalışmada; genellikle endotelden sentezlendiği bilinen Del-1 kemik yıkım bölgelerinde izlenmiş ve Shin ve ark. yaptıkları çalışmada; osteoklastogenez için örnek model olarak kullanılan RANKL ile uyarılan fare makrofajları ile Del-1 ekspresyonu susturularak incelenmiş ve artmış osteoklastogenez tespit edilmiştir. Katepsin K ve TRAP gibi osteoklastogenez belirteçlerindeki artış da artmış osteoklastogenezle birlikte izlenmiştir. Kalsiyum fosfat kaplı platelelerdeki kemik rezorpsiyonu ile oluşan çukur formasyonunun da Del-1 ekspresyonu susturulduğunda arttığı

görülmüştür. Del-1'in enflamatuvar kemik kaybını inhibe edebileceği düşüncesiyle; maymun üst sağ ve sol molar dişlerinde ligatürle indüklenmiş periodontitis oluşturulduktan ekstrinsik çözülebilir Del-1 uygulanan test grubu dişlerde periodontal enflamasyon ve kemik kaybının kontrol grubuna göre azaldığı, periodontal indekslerde de bunları destekler şekilde iyileşme gösterdiği klinik olarak izlenmiştir. Bölgeden alınan gingival biyopsi örneklerinde kontrole göre düşük izlenen osteoklast sayıları klinik bulguları kuvvetlendirmiştir.³

İnönü ve ark.'nın yaptıkları çalışmada; değişik periodontal durumlardaki bireylerin Del-1 ve LFA-1 tükürük seviyeleri incelendiğinde; sağlıklı ve gingivitisli bireylerde, kronik ve agresif periodontitisli bireylere oranla yüksek tükürük Del-1 seviyesi tespit edilirken agresif periodontitisli bireylerde kroniğe oranla istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın daha düşük Del-1 seviyesi olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda da periodontal olarak görece daha şiddetli yıkım izlenen bireylerin dahil olduğu *Grade C* grubunda; *Grade B* grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın daha düşük tükürük Del-1 seviyeleri tespit edilirken, DOS Del-1 seviyelerinin ise anlamlı olmaksızın *Grade C* periodontitis grubunda daha yüksek olduğu görüldü. İnönü ve ark.'ın çalışmasında LFA-1 tükürük seviyelerinin kronik periodontitis ve gingivitisli bireylerde sağlıklı bireylere göre, agresif periodontitisli bireylerde sağlıklı, gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylere göre yüksek seviyelerde olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da tükürük örneklerinde; *Grade C* grubunda *Grade B* grubuna göre yüksek tükürük LFA-1 seviyesi izlenirken istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. İnönü ve ark.'nın yaptığı kesitsel ve tükürükte yapılan analizler sonrası, bu çalışmada hem tükürük hem DOS örnekleri elde edilerek periodontal hastalık klinik parametreleri ve sitokinler arasındaki ilişki ele alındı. İnönü ve ark.'nın yaptığı çalışma ile bizim çalışmamız LFA-1 açısından hem tükürük hem DOS değerleri açısından benzer iken; DOS Del-1 değerlerinin paralel olmaması çalışmaya dahil etme kriterlerinde farklı sınıflandırmaların kullanılmasından ve demografik verilerdeki (yaş, cinsiyet, VKI) farklılıklardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.¹⁴ Belirtilen her iki sitokinin de periodontal hastalık şiddetiyle ilgili bilgi vermesinin yanı sıra; net bir istatistiksel anlamlılık seviyesinde *Grade B* ve *Grade C* grubu arasında fark göstermemesinin; hem LFA-1'in hem Del-1'in; enflamasyonun transendotelial migrasyon basamağı haricinde ek patogenez yollarında görev almalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Örneğin LFA-1'in akut enflamatuvar cevapta transendotelial migrasyona ek olarak kronik enflamatuvar süreçte T-hücre metabolizmasında gerekli bazı gen ekspresyonlarında; intraselüler moleküllerin hücre iskeleti için organize edilmesinde,

yine hücre iskeleti için gerekli sinyal moleküllerinin aktivasyonunda da görev aldığı görülmüştür.¹⁵⁻¹⁷ Yakın dönemde yapılan başka bir çalışmanın bulgusu olarak da Del-1'in enflamasyonun rezolüsyonunda, apoptotik nötrofillerin makrofajlar tarafından temizlenmesi olarak bilinen eferositoz yolağında da önemli olduğu belirtilmektedir.⁵

SONUÇ

Sonuç olarak nötrofillerin transendotelial migrasyonunda rol oynayan Del-1 ve LFA-1'in periodontal hastalık şiddeti ile ilgili bilgi verebileceği düşünülmektedir. Ancak Del-1 ve LFA-1'in etkileşim ve etiyopatogenez ve enflamasyonun çözülmesindeki rolünün anlaşılabilmesi için, katılımcı sayısının daha fazla olduğu, bireysel farklılıkların daha aza indirgenebildiği, periodontal tedavi sonrası hastaları ele alan uzun dönemli çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Sitokinlerin analizinde ELISA deneylerinin gerçekleştirilmesindeki yardımları için Niyazi Dündar'a, proje desteği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP-17102013)'ne teşekkür ederiz. Bu çalışma Emine Elif Mutafçılar'ın uzmanlık tezinden türetilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Lang NP, Lindhe J. Clinical periodontology and implant dentistry, 2 Volume Set: John Wiley & Sons; 2015.
2. Hajishengallis G, Chavakis TJ. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. 2013;34(1):1-6.
3. Shin J, Hosur KB, Pyaram K, Jotwani R, Liang S, Chavakis T, et al. Expression and function of the homeostatic molecule Del-1 in endothelial cells and the periodontal tissue. Clinical and developmental immunology. 2013;2013.
4. Rezaee M, Penta K, Quertermous T. Del1 mediates VSMC adhesion, migration, and proliferation through interaction with integrin $\alpha\beta3$. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2002;282(5):H1924-H32.
5. Kourtzelis I, Li X, Mitroulis I, Grosser D, Kajikawa T, Wang B, et al. DEL-1 promotes macrophage efferocytosis and clearance of inflammation. 2019;20(1):40.
6. Verma NK, Kelleher DJ. Not just an adhesion molecule: LFA-1 contact tunes the T lymphocyte program. 2017;199(4):1213-21.
7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. 1999;4(1):1-6.
8. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. Journal of periodontology. 2018;89:S159-S72.
9. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. 1964;22(1):121-35.
10. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. 1963;21(6):533-51.
11. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. 1967;38(6P2):610-6.
12. Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, Langer HF, Fraemohs L, Economopoulou M, et al. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. 2008;322(5904):1101-4.
13. Eskin MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim J-H, Liang S, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. 2012;13(5):465.
14. İnönü E, Seyit Ali Kayis, Eskin MA, HAKKI SS. Salivary Del-1, IL-17, and LFA-1 Levels in Periodontal Health and Disease. Journal of Periodontal Research. 2019.
15. Verma NK, Dempsey E, Long A, Davies A, Barry SP, Fallon PG, et al. Leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction induces a novel genetic signature resulting in T-cells refractory to transforming growth factor- β signaling. 2012;287(32):27204-16.
16. Smith A, Stanley P, Jones K, Svensson L, McDowall A, Hogg NJr. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. 2007;218(1):135-46.
17. Ramgolam VS, DeGregorio SD, Rao GK, Collinge M, Subaran SS, Markovic-Plese S, et al. T cell LFA-1 engagement induces HuR-dependent cytokine mRNA stabilization through a Vav-1, Rac1/2, p38MAPK and MKK3 signaling cascade. 2010;5(12):e14450.

Yazışma Adresi:

Emine Elif MUTAFÇILAR
 Selçuk Üniversitesi
 Diş Hekimliği Fakültesi
 Periodontoloji AD.
 Konya, Türkiye
 Tel : +90 507 714 77 10
 E Posta: mutafcielif@gmail.com