



**The Journal of Turkish Dental Research**  
**Türk Diş Hekimliği Araştırma Dergisi**

e-ISSN: 2822-4310, Cilt 2, Sayı 1, Ocak - Nisan 2023  
Volume 2, Number 1, January - April 2023

**Kronik Periodontitisli, Periodontal Sağlıklı, Sigara İçen / İçmeyen Bireylerde Doku  
Düzeyinde Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP) Seviyelerinin İmmünohistokimyasal  
Olarak Belirlenmesi**

Immunohistochemical Determination of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Levels in  
Smokers and Non-Smokers Chronic Periodontitis Patients and Periodontal  
Healthy Individuals

**Vazoaktif İntestinal Peptit Seviyelerinin Belirlenmesi**

**Mustafa ŞİMŞEKYILMAZ<sup>1</sup>, Taner ARABACI<sup>2</sup>, Elif BİLİCİ<sup>3</sup>, Beyza Nur ŞAHİN<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Uz. Dt. Mersin /TÜRKİYE  
msimsekyilmaz@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-1660-6026

<sup>2</sup> Prof. Dr. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE  
tanerarabaci@atauni.edu.tr  
ORCID: 0000-0003-0476-1010

<sup>3</sup> Dt. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Erzurum/TÜRKİYE  
ebilici82@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-9272-5804

<sup>4</sup> Dt. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE  
sahinnurbeyza@gmail.com  
ORCID: 0000-0001-7697-6841

**Makale Bilgisi / Article Information**

**Makale Türü / Article Types:** Araştırma Makalesi / Research Article

**Geliş Tarihi / Received:** 03-03-2023

**Kabul Tarihi / Accepted:** 22-05-2023

**Yıl / Year:** 2023 | **Cilt – Volume:** 2 | **Sayı – Issue:** 1 | **Sayfa / Pages:** 154-162

**Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Elif BİLİCİ

**Etik Kurul Onayı:** Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'na başvuru yapılarak 25.10.2017 tarihi 13/2017 nolu etik kurul oturumunda çalışma için etik kurul onayı alınmıştır.

**Onam:** Tüm hastalara çalışma ile ilgili bilgi verilerek aydınlatılmış onam formu (BGOF) imzalatılmıştır.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Yazarlar arasında herhangi bir çıkar/ilişki çatışması bulunmamaktadır.

Bu çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018/6505 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Yazar Katkıları:** Cerrahi uygulamalar: Taner ARABACI, Mustafa ŞİMŞEKYILMAZ.

Veri toplama, analiz ve yorum: Taner ARABACI, Mustafa ŞİMŞEKYILMAZ. Literatür tarama ve yazma: Elif BİLİCİ, Beyza Nur ŞAHİN

<https://doi.org/10.58711/turkishjdentres.vi.1259516>

## **Kronik Periodontitisli, Periodontal Sağlıklı, Sigara İçen/İçmeyen Bireylerde Doku Düzeyinde Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP) Seviyelerinin İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi**

### **Immunohistochemical Determination of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Levels in Smokers and Non-Smokers Chronic Periodontitis Patients and Periodontal Healthy Individuals**

#### **Vazoaktif İntestinal Peptit Seviyelerinin Belirlenmesi**

##### **ÖZET**

**Amaç:** Periodontal durum ve sigara kullanımının vazoaktif intestinal peptit(VIP) seviyelerine etkisini incelemek.

**Gereç ve Yöntem:** Kronik periodontitisli (KP) ve periodontal sağlıklı sigara içen ve içmeyen dört grup oluşturulmuştur. (Sigara kullanımı yok ve periodontal açıdan sağlıklı bireyler: S, Sigara kullanımı var ve periodontal açıdan sağlıklı bireyler: SS, Sigara kullanımı yok ve kronik periodontitisli bireyler: KP, Sigara kullanımı var ve kronik periodontitisli bireyler: KPS). Alınan periodontal dokular immünohistokimyasal olarak boyanmış ve VIP(+) hücrelerin stereoloji yöntemiyle ortalama sayısal yoğunlukları belirlenmiştir.

**Bulgular:** Bütün gruplar arasında VIP reseptör ortalama sayısal yoğunluk seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). VIP'te ise S, SS, KP grupları arasında anlamlı fark gözlenirken ( $p < 0.05$ ); KP ve KPS grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ).

**Sonuç:** Pro-inflamatuar yolaktaki sitokinleri etkileyen VIP anti-inflamatuar bir nöropeptit olarak çalışmaktadır. Bu proteinde ve reseptöründe, KP ve sigara kullanımı ile periodontal dokulardaki seviyelerinde artış görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Vazoaktif intestinal peptit; kronik periodontitis; sigara kullanımı

##### **ABSTRACT**

**Background:** The main aim of this study to investigate the effect of periodontal status and smoking on vasoactive intestinal peptide(VIP) levels on periodontal tissue.

**Material and Method:** Patients were divided four groups. Groups were named non-smokers and periodontal healthy individuals(H), smokers and periodontal healthy individuals(HS), non-smokers and chronic periodontitis patients(CP), smokers and chronic periodontitis patients(CPS). Collected periodontal tissue were stained immunohistochemically and then the numerical densities of the VIP(+) cells were determined by stereology method.

**Results:** VIP receptor numerical density levels were statistically significant between all groups ( $p < 0.05$ ). A significant difference was observed between H, HS and CP groups at the VIP level ( $p < 0.05$ ). No significant difference was observed between CP and CPS groups ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The VIP acts as an anti-inflammatory neuropeptide that affects the cytokines in the pro-inflammatory pathway. There is an increase at the level of this protein and its receptor in periodontal tissue when patients has periodontal disease or they are smokers.

**Keywords:** Vasoactive intestinal peptide; chronic periodontitis; smoking

## **Giriş**

Periodontal hastalıklar, dişlerin destek dokularını (alveol kemiği, periodontal ligament, ve dişeti) etkileyen inflamatuvar hastalıklardır. Periodontal hastalıkların temel etkeni mikrobiyal dental plakdır.<sup>1</sup> Bununla birlikte eşlik eden genetik özellikler ve sigara kullanımı hastalığın şiddetlenmesine sebep olabilir.<sup>2</sup> Periodontal hastalık bu faktörlerin etkisiyle gingivitis olarak başlayabilir, konak cevabına göre yıllar boyu bu formda kalabilir ya da ataşman ve kemik kaybı ilerleyip periodontitise dönüşebilir.<sup>3</sup>

Periodontitis, multifaktöriyel, inflamatuvar bir hastalıktır. Başlıca özellikleri arasında; diş eti kanaması, periodontal cep oluşumu, alveolar kemik kaybı ve klinik ataşman kaybı vardır. Periodontitis, diş kaybına, çiğneme fonksiyonunun ve estetiğin olumsuz etkilenmesine neden olabilir.<sup>4</sup>

Periodontal hastalık ve durumların sınıflandırılması amacıyla 1999 yılında gerçekleşen periodontoloji çalışmayı sonucunda periodontitis, kronik periodontitis ve agresif periodontitis olarak sınıflandırılmıştır. Kronik periodontitis periodontal dokularda yıkıcı etkiye sahip, yavaş ilerlemesi ile karakterize bir hastalık olarak sınıflandırılmıştır.<sup>5</sup>

Periodontal ve peri-implant hastalık ve durumların sınıflandırılması amacıyla 2017 yılında gerçekleşen periodontoloji çalışmayı sonucunda kronik periodontitis ve agresif periodontitis ayrımı kaldırılmıştır ve periodontitis olarak tek bir başlık altında toplanmıştır. Periodontitis derecelendirme ve evreleme sistemine göre kategorize edilmiştir.<sup>4</sup>

Sigara, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından mental ve davranışsal bozukluklara yol açan psikoaktif bir madde olarak tanımlanmıştır. Sigaranın periodontal sağlık üzerindeki zararlı etkilerini hangi mekanizma veya mekanizmalar ile gerçekleştirdiği ise tam olarak bilinmemektedir.<sup>6</sup> Sigara içmek; periodontal hastalığın başlangıcını, şiddetini, ağız içinde kapsadığı alanı etkileyen ve tedavi şansını azaltan bir risk faktörü olarak değerlendirilmelidir.<sup>7</sup> Sigaranın periodontal hastalığa yatkın hale getirebileceği potansiyel mekanizmalarla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır.<sup>8,9</sup> Sigara içmenin sitokin ve adhezyon molekülü ağları yoluyla damarsal yapıyı, hümmoral bağışıklık sistemini ve hümmesal immün

ve enflamatuvar sistemleri etkileyebileceği bildirilmiştir.<sup>10</sup> Sigara içmeyenlerle kıyaslandığında sigara içenlerin, periodontitisin klinik belirtilerini daha güçlü bir şekilde gösterdikleri ve daha fazla cep derinliği ve daha çok hastalıktan etkilenmiş alana sahip oldukları, dolayısıyla hastalığın daha şiddetli ve yaygın olduğu ortaya konulmuştur.<sup>11,12</sup>

Konak cevabı periodontal hastalığın ilerlemesinde önemli bir faktördür.<sup>13</sup> Sigaranın konak cevabını iki yolla etkilediği düşünülmektedir. Bunlardan ilki sağlıklı periodontal dokularda yıkıma neden olarak ve diğeri ise enfeksiyon nötralizasyonunda normal konak cevabını bozarak gerçekleşmektedir.<sup>14</sup> Sigara kullananlarda, B hümmeslerinin normal fonksiyon görmesinde ve antikör üretiminde etkili olan yardımcı lenfositlerin sayısı azalmaktadır. Buna bağlı olarak IgA ve IgG özellikle de IgG2 seviyelerinde azalma olduğu saptanmıştır.<sup>15</sup> Sigara kullanımının nötrofillerin kemotaksis ve fagositoz yeteneklerini baskıladığı<sup>16</sup> nikotine maruz kalan nötrofillerin ise süperoksit iyonu salgılama yeteneklerinin azaldığı bildirilmiştir.<sup>17</sup> Sigara ve tütün metabolitleri, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) kemotaktik ve fagositik yeteneğini bozmaktadır.<sup>14,18</sup> Sigara içen bireylerde içmeyenlere göre TNF- $\alpha$  düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır.<sup>19</sup> Artan TNF- $\alpha$ 'nın da VIP (vazoaktif intestinal peptit) seviyesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir.<sup>20</sup>

VIP, 28 aminoasitten meydana gelen, yapısal olarak glukagon, sekretin, gastrik inhibitör peptit ve büyüme hormonu serbestleştirilen hormon gibi gastrointestinal sistem peptit hormonları ailesinden olan bir peptittir.<sup>21</sup> Günümüzde VIP'in, geniş fizyolojik ve biyolojik düzenleyici etkiye sahip olduğu, bazı hastalıkların patogeneğinde rol aldığı ve bazı hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde gelecek vadettiği düşünülmektedir.<sup>22</sup> VIP'in VPAC1 (VIP1), VPAC2 (VIP2) ve PAC1 olmak üzere üç çeşit reseptörü bulunmaktadır.<sup>23,24</sup> Her üç tip reseptör de serpentin tipi olup G proteini ile çalışmakta, VPAC1/VPAC2 hümmesinin içinde c-AMP konsantrasyonunu artırırken, PAC1 fosfolipaz C üzerinden hümmesinin içinde IP3 ve DAG yollarını aktive etmektedir.<sup>25</sup> VPAC1/VPAC2 osteoklastlarda ve osteoblastlarda da eksprese edilir. Ayrıca VPAC1 ve VPAC2, makrofajlar, mast hümmesleri, B ve T lenfositleri gibi diğere bağışıklık hümmeslerinde de

tespit edilmiştir.<sup>26</sup> VIP, inflamatuvar kaskattaki birçok aşamayı inhibe ederek inflamatuvar hücrelerin yaptıkları doku hasarlarını azaltmakta, temel inflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-12'nin üretimini inhibe etmekte ve antienflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un üretimini artırmaktadır.<sup>27</sup> VIP, güçlü antioksidan özelliğe sahip endojen bir nöropeptittir ve bu etkisini gerek serbest radikal oluşumunu engelleme gerekse oluşan radikalleri ortadan kaldırma ile göstermektedir. VIP antioksidan etkisini direkt ve indirekt olarak gerçekleştirmektedir. İndirekt etkisini ksantin/ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek ve böylece süperoksit radikal oluşumunu engelleyerek gösterirken, direkt etkisini singlet oksijen ve hidroksil gibi son derece toksik radikalleri süpürerek göstermektedir.<sup>28</sup>

Bu çalışmanın amacı sigara kullanan, sigara kullanmayan, kronik periodontitis tanısı konulan ve periodontal açıdan sağlıklı olan bireylerden alınan periodontal doku örneklerinde VIP ve VIP reseptör seviyelerini immünohistokimyasal olarak incelemek, yoğunluğuna bağlı olarak kronik periodontitis ile ilişkisini açıklamak ve sigara kullanımı bağlı değişimlerini tespit etmektir. Çalışmamızın hipotezi; sigara kullanan ve/veya kronik periodontitisli bireylerde doku düzeyinde VIP ve VIP reseptör seviyeleri, sigara kullanmayan ve periodontal olarak sağlıklı bireylere göre daha yüksektir, şeklindedir.

### **Materyal ve Metod**

Çalışmaya yaşları 18 ila 65 yaş arası 60 hasta dahil edilmiştir. G\*power programı kullanılarak örneklem büyüklüğü belirlenmiştir. Grupların dağılım oranı 1:1 olarak belirlenmiştir. 60 hastanın 24'ü kadın, 36'sı erkeklerden oluşmaktadır. Çalışma 2018 yılında Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Ana Bilim Dalı kliniğinde yapılmıştır. Çalışma için Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'na başvuru yapılarak 25.10.2017 tarihi 13/2017 nolu etik kurul oturumunda çalışma için etik kurul onayı alınmıştır. Tüm hastalara çalışma ile ilgili bilgi verilerek aydınlatılmış onam formu (BGOF) imzalatılmıştır. Hastaların genel sağlık durumları ve sigara içme durumları hakkındaki bilgiler anamnez sırasında bireylerle sorularak elde edilmiştir. Çalışmaya dahil olan kişiler sistemik hastalığı olmayan kişilerdir. Çalışmaya dahil

edilen sigara içen bireylerin en az son 5 yıldır günde 10 adet veya daha fazla sayıda sigara içiyor olması, sigara içmeyen kişilerin hayatında hiç sigara içmemiş olması ya da en az 1 yıl önce sigarayı bırakmış olması dikkate alınmıştır.

*Klinik muayene ve alınan anamnez sonuçlarına göre bireyler her grupta 15 örnek olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır:*

**1.Grup (S):** Sigara kullanımı yok ve periodontal açıdan sağlıklı bireyler;

**2.Grup (SS):** Sigara kullanımı var ve periodontal açıdan sağlıklı bireyler;

**3.Grup (KP):** Sigara kullanımı yok ve kronik periodontitisli bireyler;

**4.Grup (KPS):** Sigara kullanımı var ve kronik periodontitisli bireyler.

### **Klinik Periodontal Parametreler**

Bireylerin klinik periodontal durumlarını tespit etmek için Silness and Loe Plaque İndeksi (Pİ)<sup>29</sup>, Loe and Silness Gingival İndeksi (Gİ)<sup>30</sup>, sondalanabilir cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman seviyesi (KAS)<sup>31</sup> ölçümleri alınmıştır. Tüm bireylerden klinik periodontal muayeneyi takiben mevcut periodontal durumun tam olarak teşhisi amacıyla ortopantomograf ve periapikal radyografiler alındı. Periodontal olarak sağlıklı bir ağızda alveoler kemik kreti yaklaşık olarak mine-sement sınırının 1.5-2 mm apikalindedir. Sağlıklı grup için bu kriter ayırıcı olarak kullanılmıştır. Kronik periodontitis teşhisi için ağız içinde toplamda en az 20 dişin olması, dört veya daha fazla dişte 5 mm veya daha derin sondalanabilir cep derinliği olması, sondalamada kanamanın pozitif olması, klinik ataşman kaybı olması ve radyografik kemik kaybının bulunması kriterleri dikkate alınmıştır.

### **Dişeti Biyopsi Örneklerinin Alınması**

Kronik periodontitis hastalarından umutsuz dişlerin çekimini takiben komşuluğundaki dişetinden 1-2 mm çapında epitel ve bağ dokusu içerecek şekilde 15 numaralı bistüri yardımıyla eksizyonel biyopsi yöntemi ile elde edilmiştir. Kontrol grubunda tam gömülü 20 yaş dişine sahip bireylerden ameliyat esnasında bölgedeki dişetinden, kron boyu uzatılması işlemi yapılan hastalarda çalışma bölgesindeki sağlıklı dişetinden ya da implant cerrahisi sırasında elde edilmiştir. Tüm gruplardan toplanan doku örnekleri % 10'luk formalin

içerisinde immünohistokimyasal inceleme yapılarına kadar ependorf tüplerde +4 C derece bekletilmiştir.

### **Histolojik İşlemler**

Alınan örnekler immunohistokimyasal boyama işlemleri ve ardından da stereolojik yöntemler ile ölçümleri yapılarak birim alan başına düşen VIP ve VIP reseptör pozitif ve negatif hücre sayısı belirlenmiştir. Bu yöntemi uygularken kullanılan immunohistokimyasal boyama, stereolojik metodlar ve stereolojik işlem basamakları aşağıda sunulmuştur.

### **İmmünohistokimyasal Boyama**

Hastalardan alınan dış eti dokusu örnekleri, %10 tamponlu formaldehit çözeltisinde fikse edilmiştir. Kriyostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) kullanılarak dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınıp pozitif şarjlı lamlara aktarılmıştır. Alınan kesitler için VIP ve VIP reseptör immünohistokimyasal reaktivitesi VENTANA BenchMark GX Sisteminde (Ventana Medical Systems, Inc.) otomatik bir yöntemle boyanmıştır. VIP ve VIP reseptör için antijenik determinant bölgeler, sitrat tamponunda 60 dakika boyunca buharla açılmıştır. VIP ve VIP reseptör için sırasıyla IgG sınıfı Rabbit poliklonal (YL Biotech; YID5262) ve IgG sınıfı Rabbit poliklonal (Biorbyt; orb100402) primer antikolar 1:50'lik ve 1:80'lik bir seyreltme ile kullanılmıştır. Kesitler, antikor çözeltisinde 32 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edilmiş, ardından ultraView Universal DAB görüntüleme kiti (Ventana Medical Systems, Inc.) uygulanmıştır. DAB bir kromojen olarak kullanılmış ve hematoksilin ile zıtlanmıştır. Boyamanın özgülüğü, aynı dokularda primer antikorun yokluğunda işlenen negatif kontrol kesitlerin dahil edilmesi ile doğrulanmıştır. VIP ve VIP reseptör immünoaktivitesi stereolojik yöntemle değerlendirilmiştir.

### **Stereolojik Metotlar**

Stereoloji, doku kesitleri ve görüntüleri üzerinde tarafsız ve kantitatif veriler sağlamak için rastgele, sistematik örnekleme kullanan tıbbi bir analitik yöntemdir. Organ, doku ve hücre gibi biyolojik yapıların iki boyutlu düzlemsel kesitleri ile yapılan ölçümlerden üç boyutlu yapıları hakkında sayısal bilgi elde etmek için pratik teknikler sağlar. Tarafsız sayım çerçevesi-parçalama kombinasyonu, doku ve organlardaki hücre, çekirdek gibi sayısal değerleri hesaplamak için kullanılan

stereolojik bir yöntemdir.<sup>32</sup>

Çalışmamızda, dış eti dokularında antikolarla boyanmaya göre hücrelerin sayısal yoğunluğunu tahmin etmek için tarafsız sayma çerçevesi ve parçalama yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlere göre aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

### **Adım 1. Sistematik Rastgele Örnekleme Yöntemiyle Kesit Örnekleme Oranı**

Sistematik randomize örnekleme yöntemine göre kriyostat ile dokular kesilerek 5 mikron kalınlığındaki örneklem kesitleri alınmıştır ve sonra stereolojik inceleme için uygun antikor ile boyanmıştır.<sup>33</sup> Örnekleme, bu çalışmadaki tüm durumlar için kabul edilebilir bir hata katsayısına göre yapılmıştır. Sistematik bir randomize örnekleme için uygun bir katsayı hatasını ( $KH \leq \%5$ ) belirlemek için bir pilot uygulama yapılmıştır.<sup>34</sup>

### **Adım 2. Sayısal Yoğunluğun, Tarafsız Sayım Çerçevesi-Parçalama Kombinasyon Yöntemiyle Hesaplanması**

Stereolojik analizler tarafsız sayım çerçeveleri ile parçalama metodu ile sayım hesaplaması yapan özel bir stereoloji yazılımı içeren Stereo-Investigator (sürüm 9.0, Microbrightfield, Colchester, VT) cihazında gerçekleştirilmiştir. Sözü edilen cihaz kameralı bir mikroskop, mikroskop tablasını hareket ettiren motorize sistem ve bunların kullanımını kontrol eden yazılımı barındıran bir bilgisayardan oluşmaktadır. Örneklenen kesitlerin her biri görüntülerinde, sayım yapılacak alanlar araştırmacı tarafından belirlenmiş ve stereoloji yazılımı aracılığıyla sınırları çizilmiştir. Tarafsız sayım çerçeveleri, sınırlandırılmış alan boyunca eşit aralıklarla otomatik ve sistematik olarak rastgele dağıtılmıştır. Her kesit, stereoloji yazılımının parçalama prensibi kullanılarak düşük büyütmede (10x) örneklendirilmiştir. Antikolar ile boyanma yoğunluklarına göre hücreler, hücrelerin boyanma özelliklerinin tam olarak ayırt edilebileceği büyük büyütmede (63x) işaretleme işlemi yapılmıştır. Kesit üzerindeki bütün örneklem alanlarındaki tarafsız sayım çerçevelerinin içine düşen hücreler skorlanmıştır.

Hücrelerin sayısal yoğunluğu aşağıdaki formül kullanılarak tahmin edilmiştir.<sup>35</sup>

$$SY = \frac{TB}{TSC \cdot ÖAS}$$

SY; sayısal yoğunluk, TB; toplam belirteç, TSC;

tarafsız sayım çerçevesi(XY)( $\mu\text{m}^2$ ) ve ÖAS; örneklenen alan sayısı.

### İstatistiksel Analizler

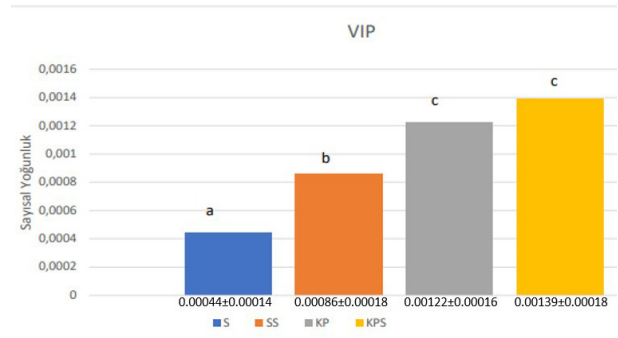
Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS® (IBM 22.0 Windows®) programı ile yapılmıştır. Stereolojik bulguların değerlendirilmesinde öncelikle grup verilerinin normallik dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. VIP değerlerinde parametrik bir dağılım olmadığı için parametrik olmayan bu verilere bağımsız örnek analizi (Kruskal-Wallis) yapılmıştır ( $p<0.05$ ). Grupların ikili kıyaslaması için Mann-Whitney u testi yapılmıştır. Normal dağılıma sahip olan VIP reseptör değerleri için ise çoklu karşılaştırmalı en küçük önemli fark (LSD) testi ( $p<0.05$ ) kullanılmıştır. Grupların ikili kıyaslaması için Independent Samples-t testi kullanılmıştır.

### Bulgular

#### VIP Bulguları

VIP (+) boyanma gösteren hücrelerin stereolojik olarak ortalama sayısal yoğunluk değerleri; S (sağlıklı) grubunda  $0.00044\pm 0.00014$ , SS (sağlıklı-sigara içen) grubunda  $0.00086\pm 0.00018$ , KP (kronik periodontitis) grubunda  $0.00122\pm 0.00016$ , KPS (kronik periodontitis-sigara içen) grubunda ise  $0.00139\pm 0.00018$  olarak görülmüştür. Ortalama sayısal yoğunluk değerlerinin veri dağılımına bakıldığında normal dağılım olmadığı için bağımsız veri analizi testi Kruskal-Wallis ve sonrasında gruplara ikili karşılaştırma yapmak için Mann Whitney U testi yapılmıştır. Analiz sonucunda KPS grubunda S grubu ve SS grubuna göre VIP değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). KP grubunda S grubuna ve SS grubuna göre VIP değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). SS grubunda S grubuna göre VIP değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). KPS grubu ile KP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p=0.069$ ).

VIP (+) boyanma gösteren hücrelerin ortalama sayısal yoğunluk değerleri Şekil 1’de belirtilmiştir. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülen S, SS ve KP/KPS grupları farklı harfler (a,b,c) ile ifade edilirken, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmeyen KP ve KPS grupları aynı harf (c) ile ifade edilmiştir.

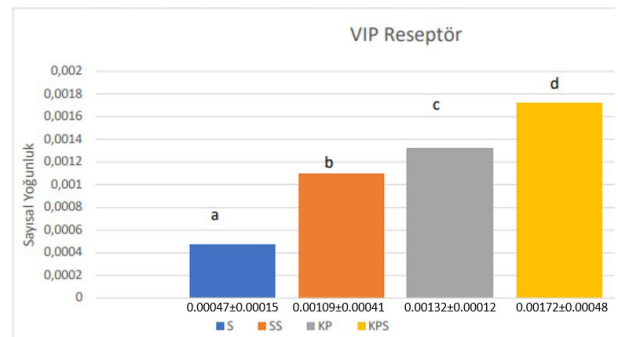


Şekil 1. VIP(+) boyanan hücrelerin ortalama değerleri

#### VIP Reseptör Bulguları

VIP reseptör (+) boyanma gösteren hücrelerin stereolojik olarak ortalama sayısal yoğunluk değerleri; S (sağlıklı) grubunda  $0.00047\pm 0.00015$ , SS (sağlıklı-sigara içen) grubunda  $0.00109\pm 0.00041$ , KP (kronik periodontitis) grubunda  $0.00132\pm 0.00012$ , KPS (kronik periodontitis-sigara içen) grubunda ise  $0.00172\pm 0.00048$  olarak görülmüştür. Ortalama sayısal yoğunluk değerlerinin veri dağılımına bakıldığında normal dağılım olduğu görülmüş ve tek yönlü varyans analizi testi ile LSD çoklu karşılaştırma analizi ve sonrasında gruplara ikili karşılaştırma yapmak için Independent Samples-t testi yapılmıştır. Analiz sonucunda KPS grubunda S grubu, SS grubu ve KP grubuna göre VIP reseptör değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). KP grubunda S grubuna ve SS grubuna göre VIP reseptör değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). SS grubunda S grubuna göre VIP reseptör değeri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

VIP reseptör (+) boyanma gösteren hücrelerin sayısal yoğunluk ortalama değerleri Şekil 2’de belirtilmiştir. Aralarında anlamlı fark görülen S, SS, KP ve KPS grupları farklı harfler (a,b,c,d) ile ifade edilmiştir.



Şekil 2. VIP reseptör(+) boyanan hücrelerin ortalama değerleri

### **Tartışma**

Literatürde VIP ile ilgili olarak dişeti oluğu sıvısı (DOS)'da, serumda, kök kanalı sıvısında ve tükürükte biyokimyasal yöntemle ya da biyopsi dokularında immünohistokimyasal yöntemle yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada periodontal hastalığın ve sigara kullanımının VIP ve VIP reseptör seviyeleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, kronik periodontitise sahip hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan gingival dokuların histolojik kesitleri immünohistokimyasal yöntemle ve stereolojik olarak ayrıntılı incelenmiştir. Çalışma sonucunda kronik periodontitis ve sigaranın, VIP ve VIP reseptör seviyelerini artırıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Luthman ve ark.<sup>36</sup> gingival dokularda hem sağlıklı hem de periodontisten etkilenmiş bölgelerde VIP için pozitif immünoreaktif lifler tanımlamışlardır. Çalışmamızda VIP seviyeleri Luthman ve ark.<sup>36</sup>'nın yaptıkları çalışmada olduğu gibi immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir ve Luthman ve ark.'nın çalışmalarına paralel olarak hem sağlıklı bireylerde hem de periodontal hastalıklı bireylerde VIP (+) hücreler tespit edilmiştir. Linden ve grubu yaptığı çalışmada periodontitise sahip hastalarda periodontal tedaviden 8 hafta sonra alınan DOS örneklerinde başlangıça göre VIP konsantrasyonlarında azalma olduğunu görmüşlerdir. Ek olarak periodontitisli hastaların sağlıklı bölgelerinden alınan örnekler tedavi sonrası örnekler ile karşılaştırıldığında ne miktar açısından ne de konsantrasyon açısından bir fark görememişlerdir.<sup>37</sup>

Delgado ve ark.<sup>38,39</sup> yaptıkları çalışmada LPS'in önce LPS bağlayıcı proteine (LBP) bağlandığını ve bu kompleksin daha sonra monosit/makrofaj ve nötrofillerin yüzeyi üzerinde eksprese edilen hücreye bağlı CD4 reseptörüne bağlandığını böylelikle çeşitli enflamatuar mediatörlerin salınmasına yol açtığını vurgulamışlardır. Buna ek olarak VIP'in, pro-enflamatuar faktörlerin aşırı derecede üretimini önlediğine inanılan makrofaj deaktif edici faktörler olarak adlandırılan düzenleyici moleküllerden biri olduğunu ve aktif makrofajlarda LPS kaynaklı TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-12 üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca VIP'in LPS etkisiyle üretimi artan pro-enflamatuar mediatörlere bağlı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda kronik periodontitise

sahip bireylerdeki VIP artışı Delgado ve ark.<sup>38,39</sup>'nın çalışmalarındaki veriler ile uyumludur. Ganea ve ark.<sup>40</sup> yayınladıkları bir makalede aktive edilmiş makrofajlarda VIP ve hipofiz adenilat siklaz aktive edici faktör (PACAP) nöropeptitlerinin, pro-enflamatuar ajanların üretimini inhibe ettiğinden ve anti-enflamatuar sitokin olan IL-10'un üretimini artırdığından bahsetmişlerdir. Delgado ve ark.<sup>38</sup> bir çalışmada farelerden elde ettikleri peritoneal makrofajları LPS ile uyardıktan sonra VIP ekleyerek etkilerini araştırmışlar. IL-10 üretiminde artış olmuş ve bu durum VIP'in anti-inflamatuar etkisini ortaya koymuştur. Ek olarak IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibisyonunda rol aldığını söylemişlerdir. Yine Delgado ve ark.<sup>41</sup> benzer bir çalışmayla endotoksin verilen farelerin makrofaj kültürlerine VIP eklenmesiyle TNF- $\alpha$  üretimini azaltmayı başarmışlardır. Ayrıca LPS etkisiyle TNF- $\alpha$ , IL-1b ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin VIP salınımına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Kinane ve ark.<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada sigara içiminin sitokin ve adhezyon molekülü ağırları yoluyla damarsal yapıyı, humoral bağışıklık sistemini ve hücrel immün ve enflamatuar sistemleri etkileyebileceğini bildirmiş bu nedenle sigaranın periodontal hastalık riskini önemli ölçüde artırabileceğini belirtmişlerdir. Literatürde sigara ve VIP seviyelerini inceleyen az çalışma vardır. Miotto'nun sigara içen hastalarda yaptığı klinik bir incelemede sigara kullanan ve kronik bronşit semptomları gösteren hastalarda havayolundan alınan mukoza örneklerinde VIP seviyelerinin semptom göstermeyenlere oranla arttığını tespit etmişlerdir.<sup>42</sup> Böstrom ve ekibinin bir çalışmasında sigara kullanımının DOS içerisindeki TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerine etkisi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak TNF- $\alpha$  düzeylerinde sigara içen grupta artış olduğunu ve içmeyen grup ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.<sup>19,43</sup> TNF- $\alpha$  salınımı VIP üretimini indüklediği için sigara kullanımı ile VIP üretiminde de artış olacağı düşünülebilir. Çalışmamızdaki verileri ele aldığımızda periodontal hastalık varlığında VIP seviyesinin sigara kullanımından daha fazla etkilendiğini ortaya çıkarmaktadır.

Literatür tarandığında ve daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alındığında VIP'in periodontal

hastalıkta arttığı ve enflamasyonu azaltacak yollarda immünmodülatör bir rol oynadığı görülmektedir. Periodontal tedavide VIP kullanımı üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. VIP'in görev aldığı ve etki ettiği mekanizmalar tam olarak anlaşıldığında kronik periodontitiste tedavi edici ya da hastalığı önleyici bir ajan olarak kullanılabilceğini düşünmekteyiz. Buna karşın VIP ile ilgili ileride yapılacak çalışmalar ile bu konuda daha detaylı incelemeler yapılması gerekmektedir.

### ***Sonuçlar***

1. Periodontal olarak sağlıklı bireylerde bile VIP (+) boyanan hücreler olduğu gibi sigara kullanan ve periodontal hastalıklı bireylerde VIP (+) boyanan hücrelerde artış saptanmıştır.
2. Kronik periodontitisli bireylerin dokularında VIP (+) boyanan hücrelerin sayısının sağlıklı bireylerden daha fazla olduğu görülmüştür.
3. VIP reseptör değerleri açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.
4. VIP, periodontal hastalıkta ve sigara kullanımı ile birlikte sayısal olarak artmıştır.



**Kaynaklar**

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-1820.
2. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):59-94.
3. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34(1):9-21.
4. Papananou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89:S173-S182.
5. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
6. Erdemir OE. Sigara ve periodontal hastalık. Published online 2005.
7. Borojevic T. Smoking and periodontal disease. *Mater Socio-Medica*. 2012;24(4):274.
8. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012;91(10):914-920.
9. Kocher T, Schwahn C, Gesch D, et al. Risk determinants of periodontal disease—an analysis of the Study of Health in Pomerania (SHIP 0). *J Clin Periodontol*. 2005;32(1):59-67.
10. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):356-365.
11. Leite FRM, Nascimento GG, Baake S, Pedersen LD, Scheutz F, López R. Impact of Smoking Cessation on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Longitudinal Observational and Interventional Studies. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2019;21(12):1600-1608. doi:10.1093/ntr/nty147
12. Eminoğlu Dö, Çanakçı V. Evaluation of Oxidative Status in Patients With Chronic Periodontitis and Additional Tobacco Abuse: A Cross-Sectional Study. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg*. 30(4):536-544.
13. Alkan EA, Dikilitaş A, Alkan Ö, Parlar A. Sigara ve periodontal hastalık ilişkisi. *Acta Odontol Turc*. 2013;30(1):49-53.
14. Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol*. 1995;66(12):1047-1055. doi:10.1902/jop.1995.66.12.1047
15. Graswinckel JEM, Van Der Velden U, Van Winkelhoff AJ, Hoek FJ, Loos BG. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol*. 2004;31(7):562-568.
16. Güntsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klingler G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontol Res*. 2006;41(3):184-188.
17. Kanehira T, Shibata K, Kashiwazaki H, Inoue N, Morita M. Comparison of antioxidant enzymes in saliva of elderly smokers and non-smokers. *Gerodontology*. 2006;23(1):38-42.
18. Kraal JH, Kenney EB. The response of polymorphonuclear leukocytes to chemotactic stimulation for smokers and non-smokers. *J Periodontol Res*. 1979;14(5):383-389.
19. Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1998;25(10):767-773. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02368.x
20. Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol JDD*. 2002;1(3):264-275.
21. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*. 2013;45(1):25-39. doi:10.1007/s00726-011-1184-8
22. Pozo D, Delgado M, Martínez M, et al. Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunol Today*. 2000;21(1):7-11. doi:10.1016/s0167-5699(99)01525-x
23. Abad C, Niewiadomski P, Loh DW, Waschek J. Neurotransmitter and immunomodulatory actions of VIP and PACAP: lessons from knockout mice. *Int J Pept Res Ther*. 2006;(12):297-310.
24. Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des*. 2001;7(2):89-111. doi:10.2174/1381612013398374
25. Korkmaz OT, Tunçel N, Tunçel M, Oncü EM, Sahintürk V, Celik M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *J Mol Neurosci MN*. 2010;41(2):278-287. doi:10.1007/s12031-009-9307-3
26. Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, et al. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific

- binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone*. 2000;27(6):803-810. doi:10.1016/s8756-3282(00)00394-x
27. Delgado M, Ganea D. Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003;17(8):944-946. doi:10.1096/fj.02-0799fje
28. Vacas E, Bajo AM, Schally AV, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ. Antioxidant activity of vasoactive intestinal peptide in HK2 human renal cells. *Peptides*. 2012;38(2):275-281. doi:10.1016/j.peptides.2012.09.011
29. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22(1):121-135.
30. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963;21(6):533-551.
31. Listgarten MA. Periodontal probing: what does it mean? *J Clin Periodontol*. 1980;7(3):165-176. doi:10.1111/j.1600-051x.1980.tb01960.x
32. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984;134(2):127-136.
33. Glaser J, Greene G, Hendricks S. *Stereology for Biological Research: With a Focus on Neuroscience*. mbf Press; 2007.
34. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987;147(3):229-263.
35. Howard V, Reid S, Baddeley A, Boyde A. Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. *J Microsc*. 1985;138(Pt 2):203-212. doi:10.1111/j.1365-2818.1985.tb02613.x
36. Luthman J, Friskopp J, Dahllöf G, Ahlström U, Sjöström L, Johansson O. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis-affected sites. *J Periodontal Res*. 1989;24(4):267-278. doi:10.1111/j.1600-0765.1989.tb01792.x
37. Linden GJ, Mullally BH, Burden DJ, et al. Changes in vasoactive intestinal peptide in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 2002;29(6):484-489. doi:10.1034/j.1600-051x.2002.290602.x
38. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1999;162(3):1707-1716.
39. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN $\gamma$  synthesis by T cells. *J Neuroimmunol*. 1999;96(2):167-181. doi:10.1016/s0165-5728(99)00023-5
40. Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol*. 2002;13(3):229-237. doi:10.1177/154411130201300303
41. Delgado M, Pozo D, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1999;162(4):2358-2367.
42. Miotto D, Boschetto P, Bononi I, et al. Vasoactive intestinal peptide receptors in the airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 2004;24(6):958-963. doi:10.1183/09031936.04.10031504
43. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1999;26(6):352-357. doi:10.1034/j.1600-051x.1999.260604.x