

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

144405

KRONİK PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA VE PERİODONTAL
OLARAK SAĞLIKLI BİREYLERDE DİŞETİ DOKUSUNDA
MİTOKONDRIYAL DNA DELESYONLARININ İNCELENMESİ

Dt. Cenk Fatih ÇANAKÇI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Recep ORBAK

Doktora Tezi
ERZURUM 2005

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**KRONİK PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA VE PERİODONTAL
OLARAK SAĞLIKLI BİREYLERDE DİŞETİ DOKUSUNDA
MİTOKONDRIYAL DNA DELESYONLARININ İNCELENMESİ**

Dt. Cenk Fatih ÇANAKÇI

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18.04.2005

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 06.05.2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Recep ORBAK

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Selçuk YILMAZ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Varol ÇANAKÇI

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Adnan TEZEL

Enstitü Müdürü : Doç.Dr. Adnan TEZEL

Mayıs 2005

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
1. TEŞEKKÜR.....	III
2. ÖZET.....	IV
3. SUMMARY.....	VI
4. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
5. GENEL BİLGİLER.....	3
5.1. Kronik Periodontitis.....	3
5.2. Kronik Periodontitisin Tipleri.....	4
5.3. Hastalığın İlerlemesi.....	5
5.4. Kronik Periodontitisin Prevalansı.....	5
5.5. Kronik Periodontitisin Etiyolojisi.....	6
5.6. Mitokondri ve Mitokondriyal DNA.....	7
5.7. Mitokondriyal DNA patolojileri.....	10
5.8. Reaktif Oksijen Türleri.....	12
5.9. Reaktif Oksijen Türlerinin biyolojik kaynaklardan üretilmesi.	13
5.10. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontal Patolojiler.....	16
5.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	18
6. MATERYAL VE METOD.....	21
6.1. Çalışma materyali.....	21
6.2. Klinik indeks skorları.....	22
6.3. Örneklerin toplanması.....	23
6.4. DNA izolasyonu.....	23

6.5. Mitokondriyal DNA’da incelenen bölgeler ve primer çiftleri....	24
6.6. PCR ürünlerinin elde edilmesi.....	27
6.7. Agaroz jelin hazırlanması ve PCR ürünlerinin jele yüklenmesi	27
6.8. Kullanılan kimyasal maddeler.....	28
6.9. Kullanılan alet ve cihazlar.....	30
6.10. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	30
7. BULGULAR.....	32
7.1. Klinik Bulgular.....	32
7.2. Laboratuar Bulguları.....	34
7.3.Klinik bulguların ve Laboratuar bulgularının karşılaştırılması.	39
8. TARTIŞMA.....	41
9. SONUÇLAR.....	51
10. KAYNAKLAR.....	53
11. EKLER.....	64

1. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli fikirlerinden istifade ettiğim başta sayın hocam Prof. Dr. Recep ORBAK olmak üzere Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ, Doç. Dr. Varol ÇANAKÇI, Doç. Dr. Adnan TEZEL, Yrd. Doç. Dr. Yasin ÇİÇEK ve yardımı geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmam süresince manevi desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. İrfan BATAT ve tüm laboratuvar çalışmam boyunca kıymetli tecrübelerinden istifade ettiğim Uzm. Dr. Abdulgani TATAR'a teşekkür ederim.

Bu süre zarfında sabırla beni destekleyen eşim Dr. Hümeysra ÇANAKÇI ve tüm aile fertlerime de şükranlarımı sunarım.

2. ÖZET

Bu çalışmanın amacı; kronik periodontitisli hastalarda ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının varlığının araştırılmasıdır.

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalına 2004-2005 tarihleri arasında müracaat eden yaşları 35-72 arasında değişen, 13'ü kadın 17'si erkek 30 kronik periodontitisli hasta ve Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine aynı tarihler arasında farklı nedenlerden dolayı müracaat eden, periodontal olarak sağlıklı, yaşları 25-69 arasında değişen, 16'sı kadın 14'ü erkek 30 hasta olmak üzere toplam 60 birey dahil edildi. Araştırmamıza dahil edilen bireylerden; kronik periodontitisli 30 birey çalışma grubunu, periodontal olarak sağlıklı 30 birey kontrol grubunu oluşturdu. Tüm bireylere çalışmanın yöntem ve amacı hakkında bilgi verilerek onayları alındı. Araştırma kapsamına alınan bireylerin ilk önce klinik muayeneleri yapıldı. Her bir bireyin periodontal durumunu saptamak amacıyla Silness ve Loe'nin plak indeksi (PI), Loe ve Silness'in gingival indeksi (GI) kullanıldı. Ayrıca klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalama derinliğine (SD) bakıldı.

Çalışma grubuna dahil edilen kronik periodontitisli bireylerden flap cerrahisi öncesinde dişeti kenarı bölgesinden biyopsi örnekleri alındı. Kontrol grubuna dahil edilen bireylerden ise klinik kron boyu uzatma işlemi öncesinde veya periodontal hastalık haricindeki nedenlerden dolayı diş çekimi endikasyonu konmuş dişlerin dişeti kenarı bölgesinden biyopsi örnekleri alındı.

Çalışma grubuna ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerden alınan doku örnekleri, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı moleküler

laboratuvarında çalışıldı. Mitokondriyal DNA delesyonlarının araştırılması amacı ile PCR yöntemi kullanılarak biyopsi örnekleri incelendi.

Klinik ve laboratuvar bulguları gruplar arası ve grup içerisi değerlendirilmeye tabi tutuldu. Kontrol grubu içerisinde laboratuvar bulgularında bir farklılık gözlenmediği için grup içi karşılaştırma yapılmadı. Gruplar arası değerlendirmelerde student *t*-testi; grup içi değerlendirmelerde ise eşleştirilmiş *t*-testi; kullanıldı.

Gruplar arası yapılan değerlendirmede; çalışma grubunun laboratuvar bulguları, kronik periodontitisli bireylerde %80 oranında 4881 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonu olduğunu gösterdi. Diğer yandan kontrol grubuna dahil edilen sağlıklı bireylerin hiçbirisinde mitokondriyal DNA delesyonuna rastlanılmadı.

Kronik periodontitisli hastaların oluşturduğu çalışma grubunda yapılan değerlendirmede; klinik bulgular (PI, GI, KAS ve SD) ve laboratuvar bulguları karşılaştırıldı ve delesyonun tespit edilen 24 hasta ile delesyonun tespit edilemeyen 6 hastaya ait klinik parametrelerin birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu görüldü.

Sonuç olarak; iki grup arasında laboratuvar bulgularının anlamlı farklılık göstermesi, kronik periodontitis hastalığının dişeti dokusunda 4881 bp büyüklüğündeki delesyonun oluşumu ile ilişkili olabileceği kanaatini uyandırdı. Yaş ve 4881 bp büyüklüğündeki delesyonun oluşumu arasında direk bir ilişki olmadığı gözlemlendi. Ayrıca çalışma grubu içerisinde yapılan değerlendirmede, kronik periodontitis hastalığının şiddetinin delesyonun oluşumu ile ilişkili olduğu tespit edildi.

3. SUMMARY

The aim of this study is to investigate mitochondrial DNA deletions in gingival tissues of chronic periodontitis patients and periodontally healthy individuals.

Thirty patients with chronic periodontitis (13 female and 17 male) and thirty periodontally healthy individuals (16 female and 14 male) were included the study which they attend Dentistry Faculty of Atatürk University for different causes. All individuals were divided in two groups, which they called study group and control group, according to their periodontal status. The study group consisted of 30 patients with chronic periodontitis, whose age ranged 35 to 72 years. The control group consisted of 30 periodontally healthy individuals, whose age ranged 25 to 69 years. The protocol of investigation was explained to each individual and received his or her approval. Firstly, clinic examination was done in each individual. To determine clinic condition of each individual, plaque index (PI) (Silness&Löe), gingival index (GI) (Löe&Silness), clinical attachment level (CAL) and probing depth (PD) were used.

In study group, the samples were obtained from region of gingival margin during periodontal flap surgery. In control group, the samples were obtained from region of gingival margin during crown lengthening procedure or tooth extraction without periodontal causes.

All samples were investigated in molecular laboratory of Medical Genetics Department. The samples were investigated for detection of mitochondrial DNA deletions via using PCR method.

Clinical results and laboratory results were compared with each other, between two groups and inside study group. Group inside Paired *t*-test; between of groups Student (Unpaired) *t*-test was used.

The results from compared between two groups showed that the frequency of occurrence of the 4881 bp-deleted mitochondrial DNA in gingival tissue was 80% for patients with chronic periodontitis. We did not detect any mitochondrial DNA deletion in gingival tissues of periodontally healthy individuals.

According to laboratory results, study group was divided in two subgroups. The results from inside study group, clinical parameters (PI, GI, CAL and PD) of 24 patients with deleted mitochondrial DNA and clinical parameters of 6 patients with non-deleted mitochondrial DNA were compared each other. We detected significant differences in clinical parameters between two subgroups in study group.

In conclusion, significant differences of laboratory results between two groups indicated that 4881 bp mitochondrial DNA deletion in gingival tissues of chronic periodontitis patients is related with choronic periodontitis. We could not observe direct relationship between aging and 4881 bp mitochondrial DNA deletion in gingival tissues of chronic periodontitis patients. Also the results from inside study group showed that the 4881 bp mitochondrial DNA deletion in gingival tissues chronic periodontitis patients could be related with severity of chronic periodontitis.

4. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik periodontitis diş yüzeyine biriken ve dişeti kenarı ile sıkı temasta bulunan dental plağın mikrobiyal içeriğindeki patojen bakterilerin dişin destek dokularında oluşturduğu yıkıcı iltihabı bir hastalıktır.¹⁻⁷ Geniş epidemiolojik çalışmalar; bu hastalığın prevalansının, etkilediği bölgenin miktarının ve periodontal atışman kaybının şiddetinin yaşla doğru orantılı olarak arttığını açıkça göstermiştir.^{8,9} Çeşitli sistemik hastalıklar, kötü alışkanlıklar, genetik faktörler ve stres gibi etkenlerin hastalığın başlaması ve ilerlemesinde risk faktörü olarak rol aldığı düşünülmektedir.¹⁰⁻²⁶

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, periodontitisli bireylerde dişetinin kronik iltihabına bağlı olarak iltihabı hücrelerin sayısındaki ve aktivasyonundaki artışın çok miktarda reaktif oksijen türünün açığı çıkmasına neden olduğu ve açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin dişeti dokusunda oksidatif hasara neden olduğu rapor edilmiştir.²⁷ Reaktif oksijen türlerinin vücudun değişik dokularında meydana getirdikleri hasarlar göz önünde bulundurularak periodontal patolojilerde açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin lipid peroksidasyon, protein hasarları, önemli bazı enzimlerin oksidasyonu, proenflamatuvar sitokinlerin uyarılması ve DNA hasarları gibi çeşitli mekanizmalar vasıtası ile periodontal dokularda yıkıma neden olabilecekleri vurgulanmıştır.²⁷

Dişeti dokusunda DNA hasarlarının varlığı ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Takane ve arkadaşları²⁷ periodontitisli bireylerde DNA hasarlarının en kalıcı ürünü olan 8-hydroxy-deoxyguanosine molekülünün tükürükteki seviyesinin periodontal olarak sağlıklı bireylere oranla çok daha yüksek olduğunu rapor etmişler ve ağırlıklı olarak polimorfonükleer lökositlerden salınan reaktif oksijen türlerinin çeşitli DNA hasarları meydana getirerek doku yıkımına neden olabileceklerini belirtmişlerdir. Sugano ve

arkadařları²⁸ ise kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda mitokondriyal DNA’da delesyon tipi mutasyonların varlığını rapor etmişler fakat bu delesyonun yaş faktörü ve kronik periodontitis ile ilişkisine açıklık getirememişlerdir.

Mitokondriyal DNA delesyonları ve periodontal hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Literatürde bu konu ile ilgili sadece bir çalışma mevcuttur.²⁸ çalışmamızdaki öncelikli amacımız; kronik periodontitisli hastalarda ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının varlığını araştırmaktır. Buna ilaveten çalışmamızın diğer amaçları; olması muhtemel bir delesyon tipi mitokondriyal DNA mutasyonunun boyutunu ve yerini tespit etmek ayrıca yaşlanma ve kronik periodontitis hastalığıyla olan muhtemel ilişkisine açıklık getirmektir.

5. GENEL BİLGİLER

Periodontal hastalık, insanlarda görülen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir.¹ Periodontal hastalığın ana etkeninin mikrobial dental plak olduğu bilinmektedir. Periodontal hastalık; patojen bakteriler ve doku savunma sistemi arasındaki karmaşık etkileşim sonucu ortaya çıkan, doku yıkımı ve bazen doku kaybı ile karakterize iltihabi bir hastalıktır.²⁻⁴ Dünyada sık görülen ve toplumun her kesimini değişik oranlarda etkileyebilen periodontal hastalık, dişin destek dokularına yayılarak büyük oranda diş kayıplarına yol açabilir. Gingivitis olarak başlayan hastalık tedavi edilmediği takdirde, mikrobiyal dental plaktaki patojen bakterilerin kalitatif ve kantitatif olarak gelişmesi ve buna bağlı olarak konak doku savunma mekanizmalarındaki değişimler sonucu ataşman kaybı, alveol kemik yıkımı ve cep oluşumu ile karakterize kronik periodontitise dönüşebilmektedir.⁴⁻⁶

5.1. Kronik Periodontitis

Kronik periodontitis; gingivitis ile başlayan ve tedavi edilmediği takdirde hastalığın ilerlemesi sonucu ataşman kaybı ve alveol kemik yıkımları ile kendini gösteren kronik iltihabi bir hastalıktır.⁴⁻⁶ Her kronik periodontitisin öncesinde gingivitisin varlığı zorunlu olmakla beraber, her gingivitis vakası uzun yıllar tedavi edilmemiş olsa bile kronik periodontitis ile sonuçlanmaz.⁷

Kronik periodontitis klinik olarak incelendiğinde; dişetinde renk değişikliği, stiplinglerin kaybolması, keskin olmayan yuvarlak hatlı dişeti kenarı ile beraber; kendiliğinden başlayan veya kolayca başlatılabilen dişeti kanaması sıklıkla görülür.^{4,6} Çeşitli derinliklerde dişeti ceplerine rastlanılır ve hem yatay hem de dikey yönde kemik kaybı gözlenir. Kemik kaybının aşırı olduğu ilerlemiş vakalarda sıklıkla mobil dişlere

rastlanır.^{4,6} Kronik periodontitis vakalarında ağrı nadir görülen bir belirtidir ve periodontal apse oluşumu ile ortaya çıkar. Bu durum hastaların tedavi ihtiyacı duymalarına büyük bir engel teşkil eder. Genellikle açığa çıkmış kök yüzeyleri veya kök yüzeylerinde çürük gözlenmesi nedeniyle, hasta sıcağa veya soğuğa karşı hassasiyet şikayeti bildirir. Dişetinde ödem ve kaşıntı hissi vardır.⁴⁻⁶

5.2. Kronik Periodontitisin Tipleri

Kronik periodontitis, etkilediği bölgenin büyüklüğüne bağlı olarak lokalize ve generalize olmak üzere iki grupta tanımlanır. Etkilenmiş dişlerin sayısı tüm dişlere oranla <30% ise lokalize; >30% ise generalizedir.⁴⁻⁶ Hastalık genellikle generalize seyirlidir. Lokalize ve generalize form klinik taşman kaybının miktarına göre üç alt gruba ayrılır; klinik ataşman kaybı 1-3 mm. arasında ise hafif şiddetli, 3-5 mm. arasında ise orta şiddetli, 5 mm veya daha fazla ise şiddetli olarak isimlendirilir. Kronik periodontitisin hafif şiddetli formu büyük azılar bölgesinde minimal furkasyon girişi ile karakterizedir.⁴⁻⁶ Subgingival ve supragingival bölgelerde plak birikimi ve değişik miktarlarda diş taşı mevcuttur. Sondalamada kanama ve radyografik olarak minimal kemik kaybı gözlenir. Orta şiddetli formda azdan orta dereceye kadar değişen mobil dişlere rastlanır. Radyografik olarak kemik kaybı genellikle yatay yönde olup ataşman kaybı %40 civarındadır. Furkasyon bölgesindeki açılma artmış ve radyografide radyolusent bir görünüm vardır. Sondalamada kanama mevcuttur. Şiddetli formda ise ataşman kaybı 5 mm. ve üzerindedir. Belirgin furkasyon defekti ve ilerlemiş diş mobilitesine sıklıkla rastlanılır. Radyografik incelemede kemik kayıpları %40'ın üzerindedir ve yatay yönde kemik kayıplarına ilaveten dikey yönde kemik kayıpları da gözlenebilir.

5.3. Hastalığın İlerlemesi

Kronik periodontitisin ilerleme hızı vakadan vakaya, aynı vakada dönemden döneme ve hatta aynı vakada bölgeden bölgeye oldukça değişkenlik gösterebilmesine rağmen hastalık genellikle yavaş seyirlidir.⁴⁻⁶ Hastalığın ilerleme hızı ağzın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülebilir. Bazı bölgelerde uzun süre pasif kalırken bazı bölgelerde hızlı bir aktivite gösterebilir.⁵ Periodontal hastalığın aktif olarak tespit edildiği bölgelerde; plak birikiminin fazla olduğu ve biriken plağın uzaklaştırılmasının güç olduğu rapor edilmiştir.⁴ Konakçı savunma faktörlerinin etkinliği de bölgedeki hastalığın şiddetinde önemli bir rol oynar.⁴⁻⁶ Dişeti dokusundaki mikroorganizmalar ile konak savunma mekanizması arasında her zaman bir denge mevcuttur. Bu denge eğer mikroorganizmalar lehine bozulacak olursa, hastalık şiddetlenerek daha fazla kemik yıkımına ve nihayetinde diş kaybına sebep olur.⁴⁻⁶

5.4. Kronik Periodontitisin Prevalansı

Kronik periodontitisin görülme sıklığı farklı populasyonlarda değişik oranlarda görülebilmektedir.^{1,4,6} Epidemiyolojik incelemeler periodontal hastalık ve periodontal doku kaybının kadınlara oranla erkeklerde daha yaygın olduğunu göstermektedir.⁸ Ayrıca ırksal farklılıklarında periodontitisin oluşumunda etkili olduğu ve periodontitisin görülme sıklığının siyahlarda beyazlara oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir.⁹ Aynı epidemiyolojik çalışmalarda; periodontal hastalığın prevalansının, etkilediği bölgenin miktarının ve periodontal ataşman kaybının şiddetinin yaşla doğru orantılı olarak arttığını açıkça göstermiştir.^{8,9} Kuzey Amerika kıtasında yapılan cross-sectional epidemiyolojik çalışmalar, kronik periodontitisin prevalansının yaşla doğru orantılı olarak arttığı görüşünü desteklemektedir.⁸ Kronik periodontitis genellikle yetişkinlerde çok görülmesine rağmen nadir olsa da çocuk ve adolesentlerde de görülebilir. Bu

hastalığın prevalansının ve şiddetinin neden yaşla doğru orantılı olarak arttığı konusunda farklı görüşler olmasına rağmen bu konuya kesin açıklık getirilememiştir. Yaş faktörü ile periodontal doku kaybının derecesi arasında belirgin bir klinik ilişki olmasına rağmen yaş faktörü ve periodontal doku kaybı dolayısıyla kronik periodontitis arasındaki klinik ilişkiye açıklık getirebilmek için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

5.5. Kronik Periodontitisin Etyolojisi

Kronik periodontitisin ana etkeninin mikrobial dental plak olduğu bilinmektedir.²⁻⁶ Ana faktör olarak bakteri plağı en önemli etken iken; restorasyonlar, dişin anatomik yapısı, çürük ve kök rezorbsiyonları gibi plağın birikmesini kolaylaştıran veya etkisini artıran değişik lokal faktörlerinde periodontal hastalık için ikincil önem arz ettiği vurgulanmıştır. Diabetes Mellitus¹⁰⁻¹², Osteoporoz^{13,14}, Down's Sendromu^{15,16} ve AIDS^{17,18} gibi hastalıklarda periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili olan sistemik faktörlerdir. Bununla beraber sigara kullanımı gibi kötü alışkanlıklar^{19,20}, genetik faktörler²¹⁻²³, stres²⁴ ve beslenme alışkanlığı^{25,26} gibi etkenlerin periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde risk faktörü olarak rol oynadığı düşünülmektedir.

Son yıllarda genetik ağırlıklı yapılan çalışmalarda, kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda DNA hasarları olduğuna dair kanıtlar rapor edilmiştir.^{27,28} Takane ve arkadaşları²⁷ periodontitisli bireylerde DNA hasarının en kalıcı ürünü olan 8-hydroxy-deoxyguanosine molekülünün tükürükteki seviyesinin periodontal olarak sağlıklı bireylere oranla çok daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışma DNA hasarının çekirdek DNA'sında mı yoksa mitokondriyal DNA'da mı veya her ikisinde birden mi meydana geldiğine dair herhangi bir fikir vermemekle birlikte, moleküler genetik araştırmaları, 8-hydroxy-deoxyguanosine molekülünün tükürükte ki artmış

seviyesinin her iki DNA molekülü için de oluşan hasarın belirtisi olarak değerlendirebileceğini göstermektedir. Sugano ve arkadaşları²⁸ kronik periodontitisli bireylerde dişeti dokusunda mikondriyal DNA delesyonlarının var olduğunu rapor etmişler ve gelecek çalışmaların bu delesyonların yaş, klinik parametreler, risk faktörleri ve doku metabolizması ile ilişkili olarak devam ettirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

5.6. Mitokondri ve Mitokondriyal DNA

Mitokondri; tüm ökaryot hücrelerde bulunan oval görünümlü yaklaşık 1µM uzunlukta ve 0.5µM eninde bir organeldir. Bir hücredeki mitokondri sayısı, hücrenin fonksiyonuna ve ihtiyacına bağlı olarak birkaç taneden binlerce ye kadar değişebilir. Hücrede meydana gelen reaksiyonlar için gerekli enerji mitokondri tarafından karşılanır. Mitokondri, çekirdek haricinde DNA'sı olan tek hücresel organeldir ve mitokondriyal DNA; nükleer DNA'dan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yapma kabiliyetine sahiptir. Mitokondriyal DNA, mitokondri matriksi içerisinde mitokondriyal iç zara yakın bir bölgede 12 nm uzunluğunda granüller şeklinde bulunur. Her mitokondrinin içerisinde 2-10 arası değişen sayıda mitokondriyal DNA varlığı tespit edilmiştir. Bu sayı türden türe, aynı türde kişiden kişiye, aynı kişide dokudan dokuya ve hatta aynı dokuda hücreden hücreye farklılık gösterebilir.^{29,30}

Mitokondri içerisinde iplikler şeklinde DNA moleküllerinin varlığı ilk kez 1963 yılında Nass ve arkadaşları³¹ tarafından gösterilmiştir. 1981 yılında Anderson ve arkadaşları³² mitokondriyal DNA'nın sekans analizini farklı türlerde karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmişlerdir.

İnsan mitokondriyal DNA'sı, çift zincirli kapalı sirküler yapıya sahip olup, 16,569 kb büyüklüğündedir (Şekil 1). Her bir memeli somatik hücresinde 1000-10000 arasında

mitokondriyal DNA kopyası mevcuttur. Memeli mitokondriyal genomunun en belirgin özelliği kompakt organizasyonudur ve bu durum mitokondriyal DNA zincirine ileri derecede ekonomi sağlar. İnsan mitokondriyal DNA'sı, biri H-zinciri (Heavy-strand) diğeri L-zinciri (Light-strand) olmak üzere, çift zincirli yapı gösterir. H-zinciri daha çok pürin bazlarını, L-zinciri ise pirimidin bazlarını içerir. Bütün bazların % 44'ünü G ve C bazları oluşturur.^{33,34} İnsan mitokondriyal DNA'sı 37 gen içerir: bunlardan 28 tanesi ağır zincirde (H-zinciri) ve 9 tanesi de hafif zincirde (L-zinciri) bulunmaktadır.³⁵

Mitokondriyal DNA'nın 37 geninin 22'si tRNA geni, 2'si rRNA (12S ve 16S) geni ve 13 tanesi de polipeptid şifreleyen mRNA genleridir.³⁵ Mitokondriyal DNA da sentezlenen 13 polipeptid, 5 adet solunum kompleksi zinciri (OXPHOS oksidatif fosforilasyon) enzimlerinden 4'ü için gerekli bileşenleri sağlar.²⁹ (Şekil 1)

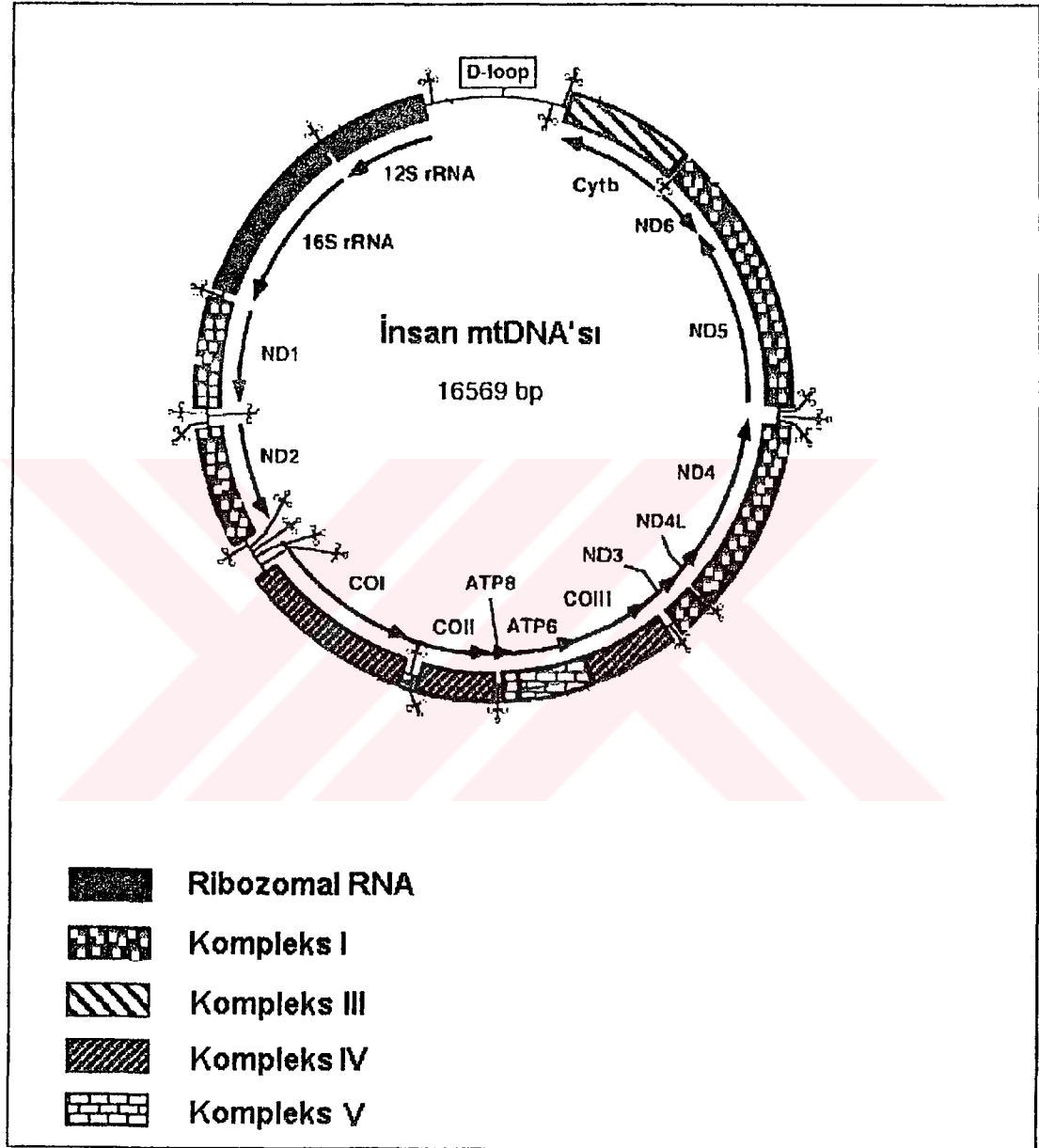
Mitokondriyal DNA da kodlanan 13 mRNA geni;

Kompleks I (NADH dehidrogenaz-ubiquinone oksidoredüktaz) enzimlerini oluşturan 25 alt üniteden 7'si (ND 1, ND 2, ND 3, ND 4, ND 4L, ND 5 ve ND 6).

Kompleks III (ubiquinone-sitokrom C oksidoredüktaz) enzimlerini oluşturan 9 alt üniteden 1'i (cyt.b).

Kompleks IV (sitokrom C oksidaz) enzimlerini oluşturan 13 alt üniteden 3'ü (CO I, CO II ve CO III).

Kompleks V (ATP sentaz) enzimlerini oluşturan 12 alt üniteden 2'si (ATPaz6 ve ATPaz8) dir.



Şekil 1. İnsan Mitokondriyal DNA Molekülü.

5.7. Mitokondriyal DNA patolojileri

İnsanlarda mitokondriyal DNA mutasyonları ile ilgili araştırmalar oldukça yenidir. Mitokondriyal DNA intron, histon ve diğer DNA ile ilişkili proteinlerden yoksundur. Üstelik tamir mekanizması yok denecek kadar zayıftır. Bu nedenlerden dolayı mitokondriyal DNA'nın nükleer DNA'ya oranla mutasyona uğrama ihtimali daha yüksektir.^{36,37} Günümüze kadar yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA mutasyonları; delesyonlar, nükleotid modifikasyonları ve nükleotid nokta mutasyonları gibi değişik şekillerde gözlenmiştir. İlk kez 1988 yılında Wallace ve arkadaşları³⁸ mitokondriyal DNA mutasyonu sonucu ortaya çıkan "LHON" (Leber's Hereditary Optic Neuropathy) hastalığını tanımlamıştır. O tarihten günümüze dek geçen süre içerisinde çeşitli hastalıklarda mitokondriyal DNA'nın rolü ile ilgili düşüncelerde ilerlemeler olmuştur. Günümüzde insanlarda tanımlanan beyin, kalp, iskelet kası, böbrek ve endokrin bezlere ait bir çok kronik dejeneratif hastalıkların moleküler temelinde mitokondriyal DNA mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitokondriyal DNA mutasyonlarının nörodejeneratif hastalıklar³⁶, yaşlanma³⁹ ve kanserlerle^{40,41} ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, kronik iltihap ile ilişkili kanserlerde^{42,43} ve kronik iltihaplı dokularda⁴⁴ DNA hasarları meydana geldiği, bu dokularda mitokondriyal DNA'nın nükleer DNA'ya oranla hasar oluşumuna daha yatkın olduğu rapor edilmiştir.

Mitokondriyal genetik ve bu genomun mutasyonları bir çok açıdan olağan dışı özellikler taşır. İnsanlarda mitokondriyal DNA maternal kalıtmalıdır ve patojenik mitokondriyal DNA mutasyonlarının neden olduğu hastalıklar maternal çizgi boyunca yoğunlaşır. Hücrede aynı anda normal ve mutant mitokondriyal DNA var olabilir. Üstelik her hücrede değişik oranlarda mutant ve normal DNA bulunabilir. Bir dokuda

mitokondriyal DNA mutasyonunun etkisi, doku hücrelerinin mitokondriyal ATP üretimine olan ihtiyacına bağlıdır. Santral sinir sistemi gibi yüksek seviyede ATP ihtiyacı duyan dokular daha fazla etkilenir.

Mitokondriyal DNA delesyonu; kapalı sirküler yapıya sahip mitokondriyal DNA'dan bir veya birkaç gen parçasının yada bir baz çiftinin parçalanarak eksilmesi sonucu ortaya çıkan mutasyondur.²⁹ Ozawa ve arkadaşları,⁴⁵ sistematik olarak değişik PCR primerleri kullanarak tüm mitokondriyal DNA molekülünü taramışlar ve 180'in üzerinde değişik büyüklüklerde delesyonun varolabileceğini rapor etmişlerdir. Mitokondriyal DNA delesyonları ile ilgili yapılan çalışmalar, delesyon tipi mitokondriyal DNA mutasyonlarının yaşlanma⁴⁶ ve yaşlanma ile alakalı hastalıklarla⁴⁷ ilişkili olduğunu göstermiştir. Mitokondriyal DNA delesyonlarının sadece yaşlanmanın belirtisi olmadığı aynı zamanda yaşlanmanın nedeni de olabileceği rapor edilmiştir.⁴¹

Son yıllarda çeşitli hastalıklar ve mitokondriyal DNA delesyonları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumunda yaşlanma kadar hastalık patogenezi ve şiddetinde rol oynadığı gösterilmiştir.^{48,49} Aynı yaş grubundaki hastalıklı ve sağlıklı bireylerden alınan doku örnekleriyle yapılan çalışmalarda, hastalık patogenezi ve şiddetinin mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşma yaşını aşağıya çektiği rapor edilmiştir. Hastalıklı dokularda direk veya dolaylı olarak biriken toksik maddelerin oksidatif etkiyi artırdığı ve dolayısıyla erken oksidatif hasar meydana getirdiği iddia edilmiştir.⁴⁸

Mitokondriyal DNA delesyonlarının görüldüğü dokularda mitokondriyal solunum fonksiyonlarının azaldığı,⁵⁰ lipid peroksidasyonun ve manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) enzimi seviyesinin arttığı⁵¹ gözlenmiştir. Bu durumun ATP üretiminin azalması, daha fazla serbest radikal oluşumu ve hatta doku hücrelerinin ölümü ile

sonuçlanabileceği vurgulanmıştır. Son olarak hasara uğramış mitokondriyal DNA'nın, mitokondriyal fonksiyon eksikliğinin ve mitokondriyal DNA hasarının sürekli arttığı bir döngü içerisine girdiği belirtilmiştir.³⁹

Mitokondriyal DNA' da oluşan mutasyonlar, büyük ölçüde biyolojik kaynaklardan üretilen reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasar sonucunda meydana gelir.⁴⁵ Reaktif oksijen türleri, mitokondriyal solunum zinciri ve iltihap gibi biyolojik kaynaklardan⁵² veya iyonize radyasyon (IR) gibi dış kaynaklardan⁵³ üretilirler.

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra mitokondriyal DNA mutasyonlarına neden olan başka faktörlerde vardır. Deri kanserleri üzerine yapılan çalışmalarda, güneş ışığının bir bileşeni olan ultraviyole radyasyonun (UVR) mitokondriyal DNA hasarlarına neden olduğu rapor edilmiştir.⁵⁴ İleri derece böbrek rahatsızlığı olan hastaların kas dokusunda biriken üremik miltleunun anlamlı derecede oksidatif hasarı artırdığı ve mitokondriyal DNA'da delesyon tipi mutasyonlarına neden olabildiği bildirilmiştir.⁴⁸

5.8. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri moleküler oksijenden kaynağını alan bir grup kimyasal reaktif moleküldür. Bu reaktif moleküller biyolojik organizmalarda çeşitli hücresel mekanizmaların düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Reaktif oksijen türleri çok çeşitli kaynaklardan üretilirler. Memeli organizmalarda bir çok çeşit hücre tipi reaktif oksijen türlerini üretebilir.⁵⁵ Buna ilaveten; iyonize radyasyon ve terapötik ilaçlar gibi birçok dış etken de reaktif oksijen türlerinin üretimini gerçekleştirebilir.⁵⁶ Fakat reaktif oksijen türlerinin doğal olarak üretimi ancak mitokondriyal metabolizma⁵⁷ ve polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu⁵⁸ gibi hücresel fonksiyonlar yolu ile gerçekleşir. Sigara içmek ve sürekli aşırı egzersiz yapmak gibi davranış aktiviteleri ise reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunan faktörlerdir.⁵⁹

Reaktif oksijen türleri, canlı organizmalarda çeşitli hücresel mekanizmaların düzenlenmesi gibi önemli roller üstlenmesinin yanı sıra canlı organizmalarda büyük hasarlara neden olabilecek bir çok zararlı etkilere de sahiptirler. Reaktif oksijen türlerinin canlı organizmalar üzerinde meydana getirdikleri hasara oksidatif hasar denir. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi DNA molekülü de dahil birçok hücresel biyomolekül üzerinde hasar meydana getirebilir.⁵² Direkt veya dolaylı olarak moleküller üzerinde oksidatif hasara neden olabilen reaktif oksijen türleri iki ana grup ta incelenir: serbest oksijen radikalleri ve non-radikal moleküller. Serbest oksijen radikalleri bir yada daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan ve serbest halde varolabilen bir grup kimyasal moleküldür.⁶⁰ Non-radikaller ise gerçekte hasar oluşturabilecek radikal özelliklere sahip olmamalarına rağmen serbest radikal oluşturma potansiyeline sahip moleküllerdir.⁶¹ Serbest oksijen radikalleri ile non-radikal moleküllerin birbirleriyle reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşumuna neden olabilmeleri her iki grup içinde önemli bir özelliktir. En çok bilinen serbest radikal moleküller hidroksili radikal (OH[•]), nitrik oksit (NO[•]) ve süperoksittir (O₂^{•-}). Diğer yandan hidrojen peroksitin (H₂O₂) ve singlet oksijenin (¹O₂) aralarında bulunduğu bir grup molekül ise non-radikaller sınıfına dahildir.

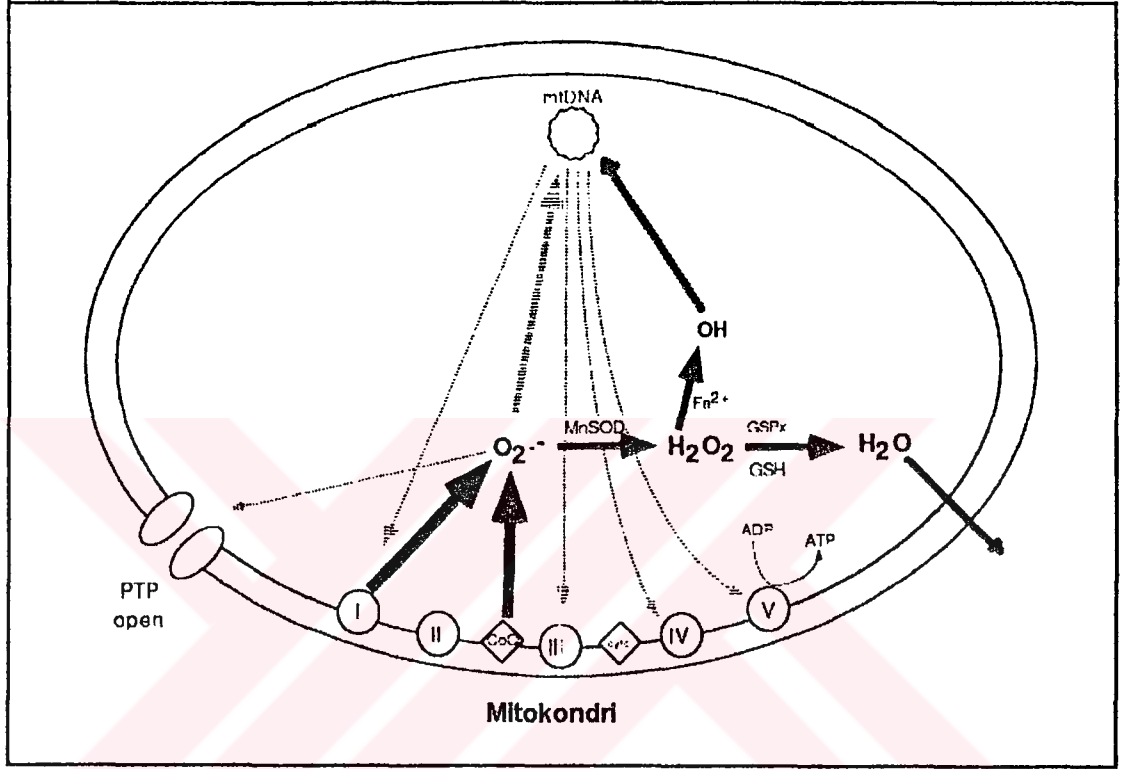
5.9. Reaktif Oksijen Türlerinin biyolojik kaynaklardan üretilmesi

Mitokondri, hücre içerisine giren oksijenin yaklaşık %90'ından fazlasının tüketildiği önemli bir hücresel organeldir.⁶² İç mitokondriyal zarda gerçekleşen solunum zinciri reaksiyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu için önemli bir kaynaktır.⁶³ Kullanılan oksijenin yaklaşık %1-4'ü serbest radikale dönüştürülür.⁶⁴ Solunum zincirinde bir elektronunu kaybeden moleküller oksijen süperoksit radikaline dönüşür. Solunum zinciri komplekslerinden kompleks I (NADH dehydrogenase) ve kompleks III

(ubisemiquinone) süperoksit radikalının büyük bir kısmının üretildiği iki temel bölgedir.⁶⁵⁻⁶⁷ Normal şartlar altında, üretilen süperoksit radikali mitokondriyal bir enzim olan manganese superoxide dismutase (MnSOD) tarafından daha az reaktif olan hidrojen peroksit'e dönüştürülür.⁶⁸ Yeni bir reaktif molekül oluşturma potansiyeline sahip olan hidrojen peroksit ise tamamen etkisiz hale getirilmek üzere glutathione peroxidase (GSPx) enzimi tarafından suya çevrilir.⁶⁸ Mitokondri içerisinde, süperoksit radikalının suya dönüşümüne kadar geçirmiş olduğu reaksiyonlara mitokondriyal temizleme mekanizması ismi verilir. (Şekil 2).

Mitokondriyal temizleme mekanizmasının mevcudiyetine rağmen, hidrojen peroksitin, Fe^{2+} gibi indirgenmiş metallerle reaksiyona girmeye oldukça fazla eğilimi vardır.⁶⁸ Bu eğilim neticesinde hidrojen peroksit ile Fe^{2+} arasında fentom reaksiyonu ismi verilen reaksiyon gerçekleşir ve son ürün olarak hidroksili radikal ortaya çıkar.^{68,69} Hidroksili radikal bilinen en reaktif moleküllerden birisidir. Bulunduğu ortamlarda proteinler, yağ molekülleri ve özellikle DNA molekülleri üzerinde büyük miktarda hasara neden olur.⁶⁹ Mitokondriyum içerisinde üretilebilen diğer önemli bir radikal ise nitrik oksittir. Sınırlı miktarda olsa da mitokondriyum kendi nitrik oksit sentezini yapabilme kabiliyetine sahiptir fakat mitokondriyal moleküller üzerinde hasar oluşturan nitrik oksitin asıl kaynağı mitokondri dışındadır.⁶⁸

Reaktif oksijen türlerinin çok miktarda üretildiği diğer önemli bir kaynak ise kronik iltihaptır. Kronik iltihap esnasında makrofaj ve nötrofil gibi hem sayıları hem de aktiviteleri artmış olan iltihabı hücreler; bakteriler ve bakteriyel ürünlere karşı çok miktarda reaktif oksijen türü üretirler.^{70,71} Özellikle polimorfonükleer lökositlerin çok miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikal ürettiği rapor edilmiştir.⁷² Bunun yanı sıra pro-enflamatuar sitokinler hem konak doku hücrelerini hem de iltihap hücrelerini

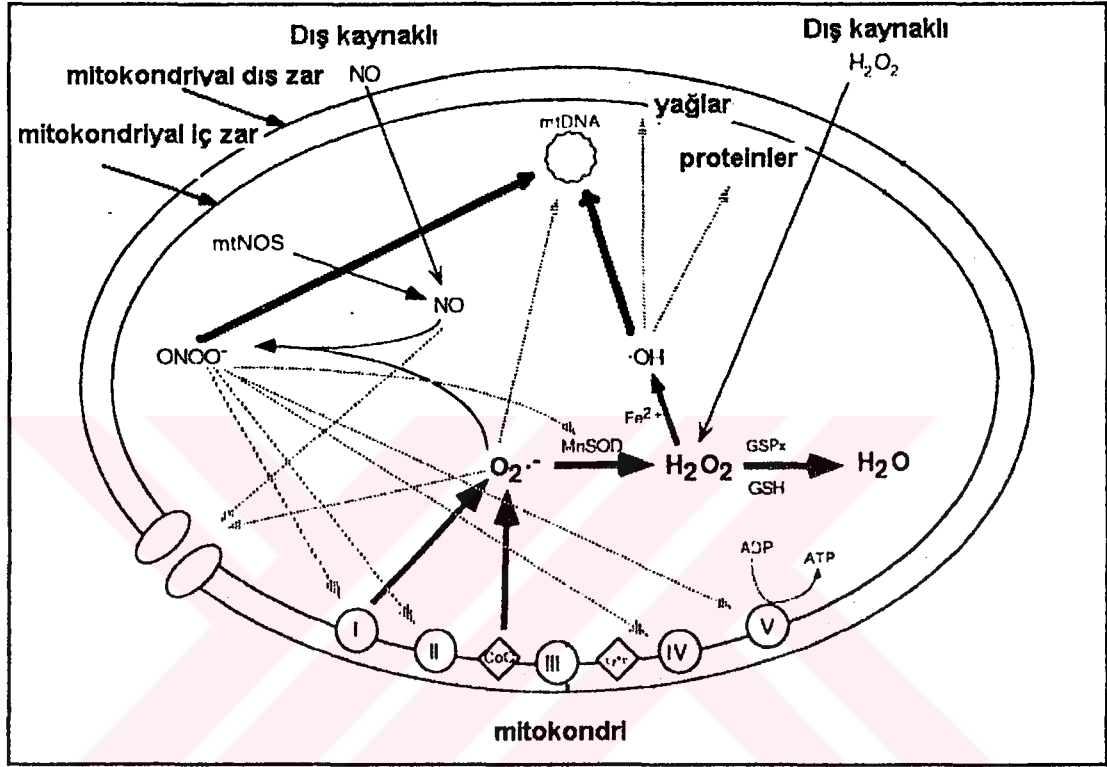


Şekil 2. Mitokondriyal ROS üretimi.

uyararak nitrik oksit üretiminin artmasına neden olurlar.^{73,74} Kronik iltihap esnasında üretilen reaktif oksijen türleri patojen mikroorganizmalara karşı doku savunma sisteminin vazgeçilmez elamanlarıdır. Antibakteriyal etkisinin yanı sıra, reaktif oksijen türlerinin fazla üretimi hem hücreler arası moleküller hem de hücre içi moleküller üzerinde büyük ölçüde hasarlar ve modifikasyonlar meydana getirebilir.⁷⁵ Reaktif özelliği az olmasına rağmen serbest gaz olmaları nedeniyle biyolojik zarlardan geçme kabiliyeti oldukça yüksek olan hidrojen peroksit ve nitrik oksit hücre içerisine kolayca girebilirler.^{68,76,77} Süperoksit radikali ile kolaylıkla reaksiyona girebilen nitrik oksit her ikisinden de daha fazla reaktif özelliği olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşumuna neden olur.⁷⁸ Diğer yandan hücre içerisine giren hidrojen peroksit fenton reaksiyonu yoluyla kendisinden daha fazla reaktif olan hidroksili radikale dönüşür.⁷⁸ Hücre içerisinde özellikle mitokondri içerisinde oluşan peroksinitrit ve hidroksili radikal başta DNA molekülleri olmak üzere çoğu hücresel moleküller üzerinde tamiri zor hasarlar meydana getirirler. (Şekil 3)

5.10. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontal Patolojiler

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin aralarında romatoid artrit, akut solunum yetmezliği ve iltihabi bağırsak hastalıkları gibi patolojik durumlarında bulunduğu 100 den fazla hastalığın patogeneğinde rol oynadığını gösterilmiştir.⁷⁹ Son zamanlarda reaktif oksijen türleri ile periodontal patolojiler arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, periodontal patolojiler esnasında patojen bakteriler ve konak doku savunma hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimin sonucu olarak konak doku savunma hücrelerinden büyük miktarlarda reaktif oksijen türü salgılandığını göstermiştir.^{27,80-84} Periodontal patolojiler esnasında üretilen reaktif oksijen türleri patojenik bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları gibi



Şekil 3. ROS'un mitokondri üzerine etkileri.

konak doku üzerinde de hasar oluşturuca etkiye sahiptirler.⁸⁵ Uzun süre devam eden dişetin kronik iltihabının reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmasının yanı sıra konak dokunun antioksidan savunmasını da azalttığı ve bu durumun hasar oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir.⁸⁵ Periodontal patolojilerde açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin çeşitli mekanizmalar vasıtası ile periodontal dokularda hasara neden olabilecekleri vurgulanmıştır.⁸⁵

Bu mekanizmalar;

- Siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivasyonu yolu ile yağ moleküllerinin peroksidasyonu (Lipid peroxidation).
- Hyaluran ve proteoglikan gibi proteinlerin hasarı.
- Anti-proteaz ve α 1-antitripsin gibi önemli bazı enzimlerin oksidasyonu.
- Nükleer faktör κ B aktivasyonu ile proenflamatuar sitokinlerin uyarılması.
- DNA hasarları

Yapılan çalışmalar içerisinde DNA hasarları ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. En son, Takane ve arkadaşları²⁷ ağırlıklı olarak polimorfontükleer lökositlerden salınan reaktif oksijen türlerinin çeşitli DNA hasarları meydana getirerek doku yıkımına neden olabileceklerini rapor etmişlerdir.

5.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi; bir organizma veya mutant gene ilişkin normal yada parçalanmış DNA yada RNA'nın in vitro çoğaltılmasına imkan veren yöntemdir. İlk olarak 1985 yılında Kary Mulis ve arkadaşları tarafından PCR yöntemi teorik olarak dile getirilmiş daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir.⁸⁶ Tıp, moleküler biyoloji ve arkeoloji gibi bir çok

bilim dalında uygulama alanı bulmuştur. Bu yöntem sayesinde birkaç hücreden elde edilen DNA parçaları çoğaltılabilmekte ve çeşitli amaçlar için kullanılabilir. ⁸⁶

PCR' dan sonuç elde edebilmek için ortama, çoğaltılmak istenilen DNA, bu DNA'ya uygun primerler, DNA polymeras enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar ve uygun tamponlar konulmalıdır. PCR üç aşamadan oluşur:

- 1- Çift sarmal DNA'nın denatürasyonu.
- 2- Primerlerin bağlanması (annealing).
- 3- Primerlerin uzaması (extension).

Denatürasyon aşaması: Bu aşamada çoğaltılması istenen çift sarmal DNA, sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. Çift sarmal DNA 95-100 °C ısıtılarak denature edilir. En uygun denaturasyon ortamı 95 °C'de 30 saniye veya 97 °C'de 15 saniyedir. Çoğaltılması istenilen nükleotid dizisi RNA ise; öncelikle revers transkriptaz ile DNA kopyası elde edilir daha sonra PCR uygulanır. ⁸⁶

Primerlerin bağlanması: Bu aşamada uzunluğu en az 17-19 baz olması gereken primerler, denature haldeki DNA molekülü üzerindeki spesifik bölgelere bağlanırlar. Primerlerin uygun bağlanma ısısı 40-60 °C dir. Bir çift olarak hazırlanan primerlerin uzunluğu arttıkça spesifikliği artar fakat DNA ya bağlanması güçleşir. Çift olarak ortama konan primerlerin biri çoğaltılacak DNA'nın bir dalına bağlanırken diğer primer diğer uçtan DNA'nın öteki dalına bağlanır. Böylece çift zincirli DNA molekülünün her iki zinciri de aynı anda sentezlenmiş olur. ⁸⁶

Primerlerin uzaması: Bu aşama nükleotidlerin istenilen DNA parçasını tamamlamak için primerlere bağlandığı aşamadır. Bu işlem için termostabil özelliği olan ve Thermus

aquaticus adlı bakteri türünden elde edilen Taq Polymeras enzimi kullanılır. Bu aşama için optimum sıcaklık 70-75 °C dir. ⁸⁶

Uygulanan üç aşama bir döngü kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer ve PCR işlemi yaklaşık 20-40 döngüden oluşur. Her döngüde bir önceki döngüdekinin 2 katı DNA molekülü elde edilmiş olur yani döngü sayısı n ise çoğaltılmış DNA materyalinin miktarı 2^n olarak kabul edilir. PCR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan otomatik aletler (thermocycler) geliştirilmiştir.



6. MATERYAL VE METOD

6.1 Çalışma materyali

Çalışma materyalini, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine müracaat eden yaşları 25 ve üzeri 60 birey oluşturdu. Çalışma protokolü gereği bireyler iki gruba ayrıldı. Grupların oluşturulmasında sosyo-ekonomik ve sosyo-kültürel durumların benzer olmasına özen gösterildi. Araştırmaya katılan tüm bireylere çalışmanın yöntem ve amacı hakkında bilgi verildikten sonra katılım için imzalı onayları alındı.

I. Grup (Çalışma grubu); Periodontoloji Ana Bilim Dalına müracaat eden ve kronik periodontitis tanısı alan, 35 yaş üzeri 30 hasta oluşturdu. Hastalarda belirli kriterler arandı;

- Hastaların herhangi bir sistemik rahatsızlığının bulunmaması,
- Hastaların daha önce periodontal tedavi görmemiş olması,
- Hastaların herhangi bir madde bağımlısı olmaması ve sigara içmemesi,
- Hastaların teşhis radyogramlarından alveol kemik kaybının saptanabilir olması ve kronik periodontitis teşhisi konmuş olması.
- Kooperasyonun iyi olması.

II. Grup (Kontrol grubu); Fakültemize farklı nedenlerden dolayı müracaat eden, periodontal olarak sağlıklı ve 25 yaş üzeri 30 birey oluşturdu. Bireyler belirli kriterlere göre seçildi,

- Bireylerin herhangi bir sistemik rahatsızlığının bulunmaması,
- Bireylerin herhangi bir periodontal rahatsızlığının bulunmaması,
- Bireylerin herhangi bir madde bağımlısı olmaması ve sigara içmemesi,
- Bireylerin teşhis radyogramlarından alveol kemik kaybının saptanmamış olması ve hiçbir bölgede 3 mm'den daha fazla sondalanabilir cep derinliğinin olmaması,

- Kooperasyonun iyi olması.

Araştırma kapsamına alınan bireylerin klinik muayeneleri yapıldı. Klinik muayenede her bir bireyin periodontal durumunu saptamak amacıyla Silness ve Løe'nin Plak İndeksi (PI), Løe ve Silness'in Gingival İndeksi (GI) kullanıldı. Ayrıca klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalama derinliğine (SD) bakıldı. Tüm klinik ölçümler, her bir dişin mezial, distal, lingual (palatinal) ve labial (bukkal) olmak üzere 4 yüzeyinden elde edildi. Ölçümlerde Williams'ın periodontal sondu kullanıldı.

Tüm ölçümler hazırlanan anamnez formuna kaydedildi (Ekler). PI, GI, KAS ve SD ortalamaları için önce her bir dişin dört yüzeyinden elde edilen değerler toplanıp ortalamaları alınarak bir dişin ortalaması; daha sonra bu değerler toplanıp ortalamaları alınarak da bireyin PI, GI, KAS ve SD ortalaması elde edildi.

6.2. Klinik indeks skorları

Plak İndeksi Skorları: (Silness ve Løe 1964)⁸⁷

0: Dişeti bölgesinde bakteri plağı yok.

1: Çıplak gözle fark edilemeyen, ancak sond ucunun dişeti oluğunda gezdirilmesiyle açığa çıkarılan plak varlığı.

2: Gözle görülür tarzda dişeti kenarında ve diş yüzeyinde orta dereceli plak varlığı.

3: Dişetinde ve diş yüzeyinde yoğun yumuşak birikintilerin mevcudiyeti.

Gingival İndeks Skorları: (Løe ve Silness 1963)⁸⁸

0: Sağlıklı dişeti.

1: Hafif iltihap, hafif renk değişikliği, hafif ödemle karakterize dişeti, sondalamada kanama yok.

2: Orta dereceli iltihap, dişeti parlak, kırmızı ve ödemlidir. Sondalamada kanama vardır.

3: Şiddetli iltihap, belirgin kırmızılık ve ödem vardır. Ülserasyonlar ve kendiliğinden başlayan kanamaya meyil mevcuttur.

Elde edilen veriler gruplar arası ve grup içi değerlendirmeye tabi tutuldu. Gruplar arası değerlendirmelerde student t-testi; grup içi değerlendirmelerde ise eşleştirilmiş t-testi; kullanıldı.

6.3. Örneklerin toplanması

Çalışma grubuna dahil edilen 30 kronik periodontitisli bireyden flep cerrahisi öncesinde kazıma biyopsi örnekleri toplandı. Kontrol grubuna dahil edilen 30 bireyden klinik kron boyu uzatma işlemi esnasında veya periodontal hastalık haricinde ki nedenlerden dolayı diş çekimi endikasyonu konmuş dişlerin dişeti kenarı bölgesinden biyopsi örnekleri alındı. Kazıma biyopsiler, Kehr Surgical Pvt. Ltd. (Swiss) tarafından üretilen 15 numara tek kullanımlık dental bisturi bıçağı ile alındı. Alınan tüm biyopsiler içerisinde 10 ml fosfat buffer solüsyonu (PBS) bulunan numaralandırılmış 50 ml lik falcon tüplere aktarıldı ve bekletilmeden DNA izolasyonu işlemine tabi tutuldu.

6.4. DNA izolasyonu

İçerisinde biyopsi materyalinin bulunduğu falcon tüp 3000 rpm de 5 dakika santrifüje edilerek materyalin tüpün dibine çökmesi sağlandı. Tüpün yüzeyindeki süpernatant kısım atıldıktan sonra dipte kalan pellet numaralandırılmış 1,5 ml lik ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 200 µl TE Buffer (Tripsin-EDTA) ve 400 µl Lysis solüsyonu eklendi. Tüp 3-5 kez çevrildikten sonra 65 °C lik su banyosunda 20 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarılan tüpe 20 µl proteinaz K eklendi ve tekrar 55 °C lik su banyosunda 30-50 dakika bekletildi. Bu aşamanın sonunda, tüpün içerisindeki pelletin solüsyon içerisinde çıplak gözle görülmeyecek kadar erimiş olmasına dikkat edildi.

Su banyosundan çıkarılan tüp, proteinaz K'nın inaktivasyonu için 10 dakika kaynayan suda bekletildi. Tüpün soğuması için birkaç dakika beklendikten sonra üzerine 600 µl kloroform eklendi ve 3-5 kez çevrildi. Tüp 13000 rpm de 10 dakika santrifüje edildi. Santrifüjden çıkarılan tüpün içerisinde solüsyonun 3 faza ayrıldığı gözlemlendi. DNA moleküllerinin bulunduğu en üst faz numaralandırılmış yeni bir 1,5 ml lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 80 µl presipitasyon solüsyonu 720 µl steril su karışımından elde edilen 800 µl lik solüsyon eklendi. Tüp 3-5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 13000 rpm de 10 dakika santrifüje edildi.

Tüp santrifüje edildikten sonra DNA moleküllerinin tüpün dibine çökelediği ve yapıştığı gözlemlendi. Tüpün içerisindeki süpernatant kısım DNA yerinden hareket ettirilmeden döküldükten sonra tüp içerisine dip kısma yapışmış DNA'nın üzerine 100 µl 1,2 molar NaCl eklendi. DNA'nın NaCl içerisinde çözündüğü gözlemlendikten sonra üzerine 300 µl soğuk saf etanol eklendi ve 20 dakika -20 °C'de bekletildi. Dondurucudan çıkarılan tüp 13000 rpm de 10 dakika santrifüje edildikten sonra tekrar dibe çöken DNA yerinden hareket ettirilmeden tüpün içerisindeki süpernatant döküldü. İki-üç saat tüpün içerisinde kalan süpernatant artıklarının kuruması beklendi ve DNA materyali 100 µl steril su ile sulandırılıp DNA çözeltisi elde edildi. Böylece DNA materyali PCR işlemi için hazır duruma getirildi.

6.5. Mitokondriyal DNA'da incelenen bölgeler ve primer çiftleri

Tüm örneklerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 1 adet kontrol bölgesi, 2 adet delesyon bölgesi olmak üzere toplam 3 bölge için hazırlanan her biri 20 nükleotid uzunluğunda primer çiftleri ile PCR işlemi yapıldı. Kullanılan primer çiftleri;

. 1.çift L 6251; 5'-TATAGTGGAGGCCGAGCAG-3'

H 7261; 5'-GAATGAGCCTACAGATGATA-3'

. 2.çift L 7901; 5'-TGAACCTACGAGTACACCGA-3'

H13631; 5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'

. 3.çift L 8531; 5'-ACGAAAATCTGTTCGCTTCA-3'

H 381; 5'- AAATTTGAAATCTGGTTAGG-3'

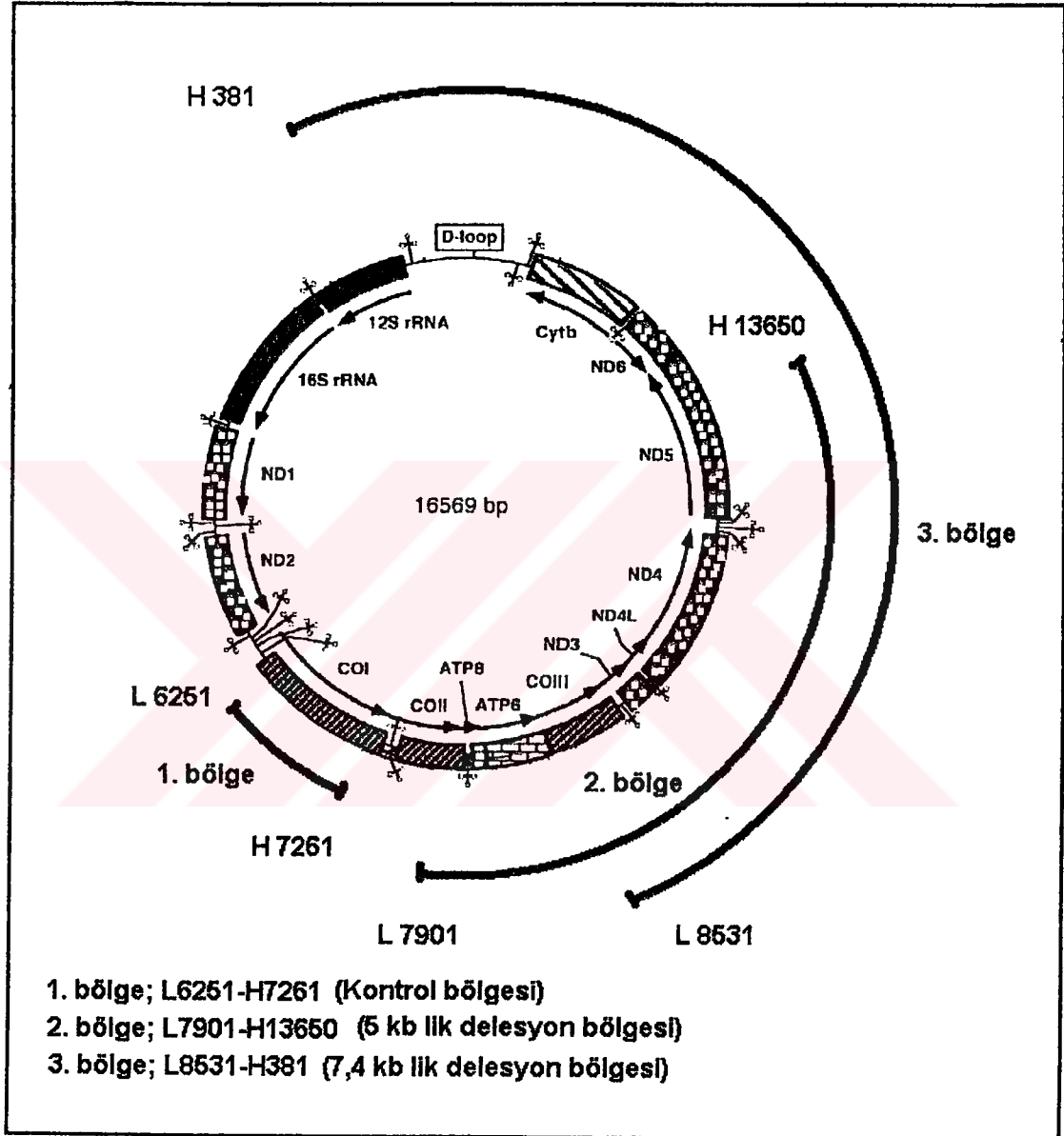
Birinci bölge; L6251-H7261 arasında kalan bölgedir. Bu bölge, doku örneklerinden izole edilen DNA materyali içerisinde mitokondriyal DNA'nın var olduğunu ve PCR işleminin başarılı olduğunu göstermek amacı ile kullanıldı.

Agaroz jel incelenirken, bu primer çiftinin kullanıldığı PCR ürünlerinin yerleştirildiği kuyularda yaklaşık 1 kb lik fragmentlerin gözlenmesi gerekmektedir. Agaroz jel incelemesinde bu kuyularda yaklaşık 1 kb lik fragmentlerin gözlenemediği örneklerin DNA izolasyonlarının veya PCR işleminin başarısız olduğu kabul edildi ve bu örneklerden DNA izolasyon işlemi veya PCR işlemi tekrar edildi.

İkinci bölge; L7901-H13650 arasında kalan bölgedir. Bu bölge, mitokondriyal DNA'da yaklaşık 5 kb büyüklüğünde delesyonun olup olmadığının incelenmesi için kullanıldı.

Üçüncü bölge; L8531-H381 arasında kalan bölgedir. Bu bölge, mitokondriyal DNA'da yaklaşık 7,4 kb büyüklüğünde delesyonun olup olmadığının incelenmesi için kullanıldı.

İncelenen üç bölgenin mitokondriyal DNA molekülü üzerindeki yeri şematik olarak Şekil 4'de gösterilmiştir.



Sekil 4. Mitokondriyal DNA'da kontrol amaçlı ve inceleme amaçlı kullanılan bölgeler.

6.6. PCR ürünlerinin elde edilmesi

DNA izolasyonu tamamlanan numaralandırılmış her örnek için 3 adet 0,5 ml lik ependorf tüp aynı numara ile numaralandırıldı. Üç tüpün birbiriyle karıştırılmaması için numaraların yanına a, b, c harfleri yazılarak ayırım yapıldı.

Her tüpe sırasıyla; 5 µl 10XPCR Buffer (magnezyumsuz), 1,5 µl dNTP mix, 3 primer çiftinden sadece biri olmak üzere primer çiftinin her birinden 1.5 µl primer, 20 µl steril su, 3 µl MgCl₂, 16 µl DNA çözeltisi eklendi. PCR cihazına yerleştirilmeden önce, buharlaşmayı engellemek için tüpün içerisindeki karışımın üzeri 50 µl mineral oil ile kapatıldı. Tüp PCR cihazı içinde 95 °C de 5 dakika bekletildi ve cihaz durdurulup her tüpe mineral oilin altındaki karışımın içine 1,5 µl Taq DNA polimeraz eklendi. Cihaz tekrar çalıştırıldı.

PCR cihazında tüpler;

94 °C	25 saniye
50 °C	25 saniye
72 °C	80 saniye

olmak üzere 30 döngü tamamlandıktan sonra 72 °C de 10 dakika bekletildi. Cihazdan çıkarılan tüpün içinde mineral oil'in altındaki PCR ürünlerinden 26 µl alınarak yeniden aynı numara ve harfle numaralandırılmış başka bir 0,5 ml lik ependorf tüpe aktarıldı ve 3 µl Die (Gel loading buffer) ile karıştırıldı. Böylece PCR ürünümüz agaroz jelde yürütülmeye hazır hale getirildi.

6.7. Agaroz jelin hazırlanması ve PCR ürünlerinin jele yüklenmesi

PCR ürünlerinin yürütülmesi için %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Hassas elektronik terazide tartılan 1,8 gram agaroz cam erlen mayere aktarıldı üzerine 120 ml 1XTBE eklendi ve ısıtmalı manyetik karıştırıcı ile çözelti şeffaflaşmaya kadar karıştırıldı.

Şeffaflaşan çözeltiye 25 ml etidium bromide eklendikten 2 dakika sonra karıştırıcıdan alındı ve yaklaşık 50 °C ye kadar soğutulduktan sonra 15'lik tarak yerleştirilmiş jel tablasına döküldü. Jel donduktan sonra tarak jele zarar verilmeden çıkarıldı.

Daha önce hazırlanmış PCR ürünleri her biri bir tarak boşluğuna yerleştirilmek şartıyla jele yüklendi. PCR ürünleriyle beraber bazı tarak boşluklarına iki değişik marker DNA yerleştirilerek oluşması muhtemel fragmentlerin büyüklüklerinin tespiti amaçlandı. Jel, 1XTBE ile doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi ve 110 Volt akımda katottan anoda doğru 2-2,5 saat yürütüldü.

Elektroforez tankından çıkarılan jel transillüminatör üzerine yerleştirildi. Elde edilen görüntü bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı ile analizi yapıldı.

6.8. Kullanılan kimyasal maddeler

- DNA izolasyon kiti (Fermentas)
- Proteinase K (Sigma)
- PBS (AppliChem)
- Boric acid (AppliChem)
- Ethidium Bromide (Sigma)
- EDTA (AppliChem)
- Glycerol (Sigma)
- Mineral oil (AppliChem)
- dNTPmix (Fermentas)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas)
- Trizma bazı (Sigma)
- 10XTBE
- Die (Gel loading buffer)

- Primerler: 3 çift;

1.çift L 6251; 5'-TATAGTGGAGGCCGGAGCAG-3'

H 7261; 5'-GAATGAGCCTACAGATGATA-3'

. 2.çift L 7901; 5'-TGAACCTACGAGTACACCGA-3'

H13631; 5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3'

. 3.çift L 8531; 5'-ACGAAAATCTGTTCGCTTCA-3'

H 381; 5'- AAATTTGAAATCTGGTTAGG-3'

- Agaroz (Sigma)

- Marker DNA'lar 2 adet;

.Phix 174 (Promega G176A)

.GeneRuler 100bp DNA Ladder

Marker DNA'ların fragment büyüklükleri aşağıdaki şekildedir.

Phix 174 (Promega G176A)

GeneRuler 100bp DNA Ladder

1353

1031

1078

900

872

800

603

700

310

600

271

500

234

400

194

300

118

200

72

100

-

80

6.9. Kullanılan alet ve cihazlar

- Jel görüntüleme ve analiz sistemi (Syngene)
- 50 ml'lik plastik falcon tüp (Greiner)
- 15 numara tek kullanımlık dental bisturi bıçağı (Kehr Surgical Pvt. Ltd.)
- Soğutmalı santrifüj (Harrier 18/80)
- pH metre (Jenway 3010)
- Elektronik terazi (Precisa 160M)
- Otomatik mikropipetler; 3 adet (Brand)
- 1.5 ml'lik ependorf tüp (Axygen)
- 0.5 ml'lik ependorf tüp (Axygen)
- Su banyosu (Fisher Serological Bath)
- Thermal cycler (Sanyo DNA Amplifier)
- Isıtmalı mağnetik karıştırıcı (Velp Scientifica)
- Electrophoretic gel system (15X15 cm; Bio-Rad Sub-cell GT model)
- Dondurucu (-20 °C) (Simtel)
- Mikropipet ucu (0.5-10 ml) (Labtips)
- Mikropipet ucu (10-100 ml) (Labtips)
- Mikropipet ucu (100-1000 ml) (Labtips)

6.10. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

10XTBE'nin hazırlanması;

108 gr. Trizma bazı

55 gr. Boric asid

40 ml 0,5 M EDTA (pH: 8,0)

800 ml distile su

kariştırılıp ısıtmalı mağnetik kariştırıcıda çözdürüldü. 1XTBE hazırlamak için 10XTBE 1/10 distile su ile sulandırıldı.

Die (Gel laoding buffer) hazırlanışı;

%0,4 Bromephenol Blue

%0,4 Xylene Cyanole

%50 Glycerol

kariştırıldı ve filtre edildi.

TE (Tripsin-EDTA) Buffer'ın hazırlanışı;

0,121 gr. TRIS

0,037 gr. EDTA

100 ml distile su

kariştırıldı ve çözdürüldü.

Ethidium Bromide'nin hazırlanışı; 10 mg/ml konsantrasyonda distile su ile hazırlandı. Aliminyum folyo ile sarıldı ve oda ısısında saklandı.

Proteinaz-K'nın hazırlanması;

100 mg proteinaz-K

10 ml distile su

kariştırıldı ve çözündürüldü.

7. BULGULAR

Çalışma grubuna dahil edilen 30 hastanın (13'ü kadın, 17'si erkek) yaşları 35-72 arasında olup, yaş ortalamaları 46.1 ± 8.3 idi. Kontrol grubuna dahil edilen 30 bireyin (14'ü kadın, 16'sı erkek) yaşları da 25-69 arasında değişirken, yaş ortalamaları 45.7 ± 12.1 idi.

Araştırmamızda elde edilen bulgular, klinik ve laboratuvar bulguları olmak üzere iki kategoride ele alındı.

Ayrıca bu bulgular karşılaştırılmalı olarak da değerlendirildi.

7.1. Klinik Bulgular

Çalışma grubuna dahil edilen kronik periodontitisli hastalardan ve kontrol grubuna dahil edilen periodontal olarak sağlıklı bireylerden elde edilen plak indeksi (PI), gingival indeks (GI), klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalama derinliği (SD) ölçümleri Tablo 1'de yansıtıldı.

Bu klinik parametreler bir yandan bireylerin klinik periodontal durumlarının tespit edilmesi için kullanılırken diğer yandan gruplar arasında ve grup içerisinde laboratuvar bulguları ile karşılaştırılması içinde kullanıldı.

Her iki grup karşılaştırıldığında; yaş parametresi haricindeki ($p > 0.05$) diğer parametreler arasında istatistiksel olarak ileri derecede önemli farklılıklar tespit edildi ($p < 0.001$).

Tablo 1. Gruplar arası klinik parametrelerin karşılaştırılması.

Parametre	Grup	n	X±SD	P değeri
YAŞ	Çalışma Grubu	30	46.1±8.3	0,882
	Kontrol Grubu	30	45.7±12.1	
PI	Çalışma Grubu	30	1.73±0.32	0.000***
	Kontrol Grubu	30	0.70±0.35	
GI	Çalışma Grubu	30	1.84±0.40	0.000***
	Kontrol Grubu	30	0.65±0.32	
SD	Çalışma Grubu	30	4.63±0.87	0.000***
	Kontrol Grubu	30	2.07±0.48	
KAS	Çalışma Grubu	30	4.55±1.10	0.000***
	Kontrol Grubu	30	0.00±0.00	

>0.05 istatistiksel olarak önemsiz

***<0.001 istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli

7.2. Laboratuvar Bulguları

Çalışma grubuna ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerden alınan biyopsi örneklerinin değerlendirilmesinde;

Kontrol grubu bireylerinden alınan biyopsi örneklerinin tamamından 1. bölge (kontrol bölgesi) PCR da üretildi ve tüm örneklerden mitokondriyal DNA elde edildi. Birinci bölge incelemesi ile aynı anda yapılan 2. bölge ve 3. bölge incelemeleri sonrasında; kontrol grubu bireylerinden alınan biyopsi örneklerinin hiçbirisinde 2. bölge ve 3. bölge incelemesinde delesyonun varlığı tespit edilemedi. (Şekil 5)

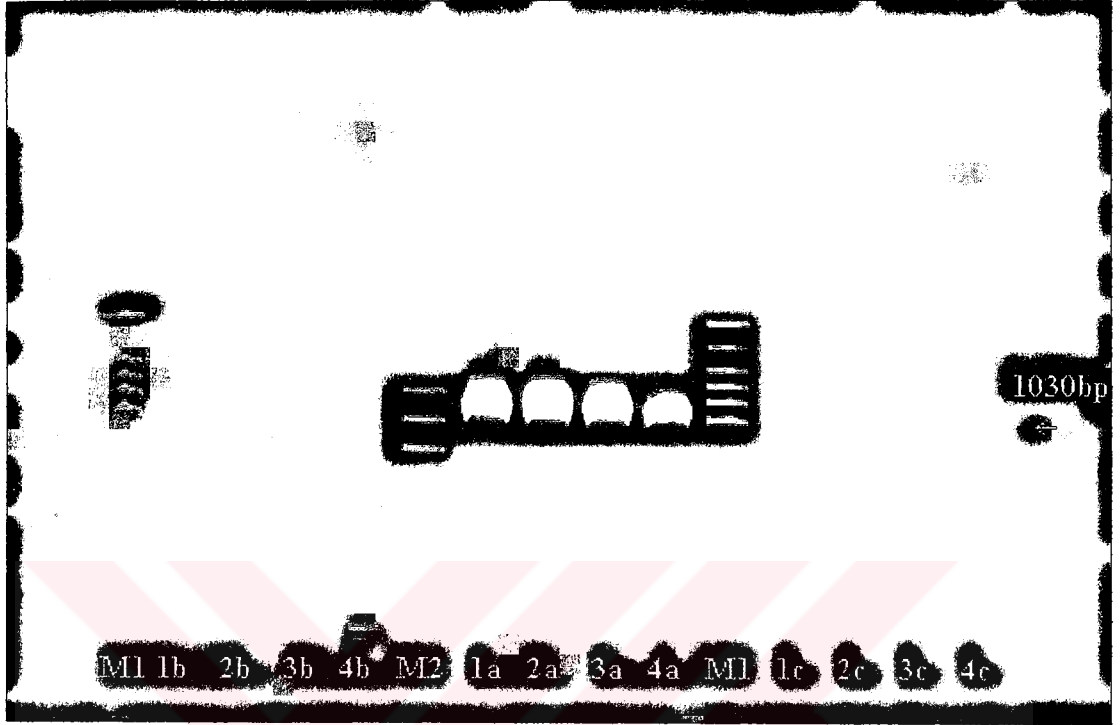
Benzer değerlendirme çalışma grubu bireyleri içinde yapıldı. Bu gruptaki bireylerde 1. bölge (kontrol bölgesi) PCR da üretildi ve tüm örneklerden mitokondriyal DNA elde edildi. Çalışma grubundaki 24 bireyden alınan biyopsi örneklerinde 2. bölge incelemesinde yaklaşık 5 kb büyüklüğünde delesyonun varlığı tespit edilirken 6 bireyin örneklerinde 2. bölge incelemesinde delesyona rastlanmadı. Yine aynı grupta 3. bölgenin incelenmesinde 30 örneğin hiç birisinde yaklaşık 7,4 kb büyüklüğünde delesyonun varlığına rastlanmadı. (Şekil 6, Şekil 7)

Elde edilen laboratuvar bulguları Tablo 2’de verilmiştir.

Çalışma grubunda 2. bölge incelemesinde; 24 örnekte tespit edilen delesyonun büyüklüğü 4881 bp olarak ölçüldü. Kullanılan marker DNA rehberliğinde bu bölgede delesyon varlığında oluşan fragmentin büyüklüğü yaklaşık 872 bp olarak tespit edildi. (Şekil 8, Şekil 9)

Tablo 2. Laboratuvar bulguları.

	n	1. Bölge (Kontrol)		2. Bölge (5 kb delesyon inc.)		3. Bölge (7.4 kb delesyon inc.)	
		n	%	n	%	n	%
Kontrol Grubu	30	30 (+)	100	0 (+)	0	0 (+)	0
		0 (-)	0	30 (-)	100	30 (-)	100
Çalışma Grubu	30	30 (+)	100	24 (+)	80	0 (+)	0
		0 (-)	0	6 (-)	20	30 (-)	100



Şekil 5. 1, 2, 3 ve 4 numaralı bireyler periodontal olarak sağlıklı bireylerdir.

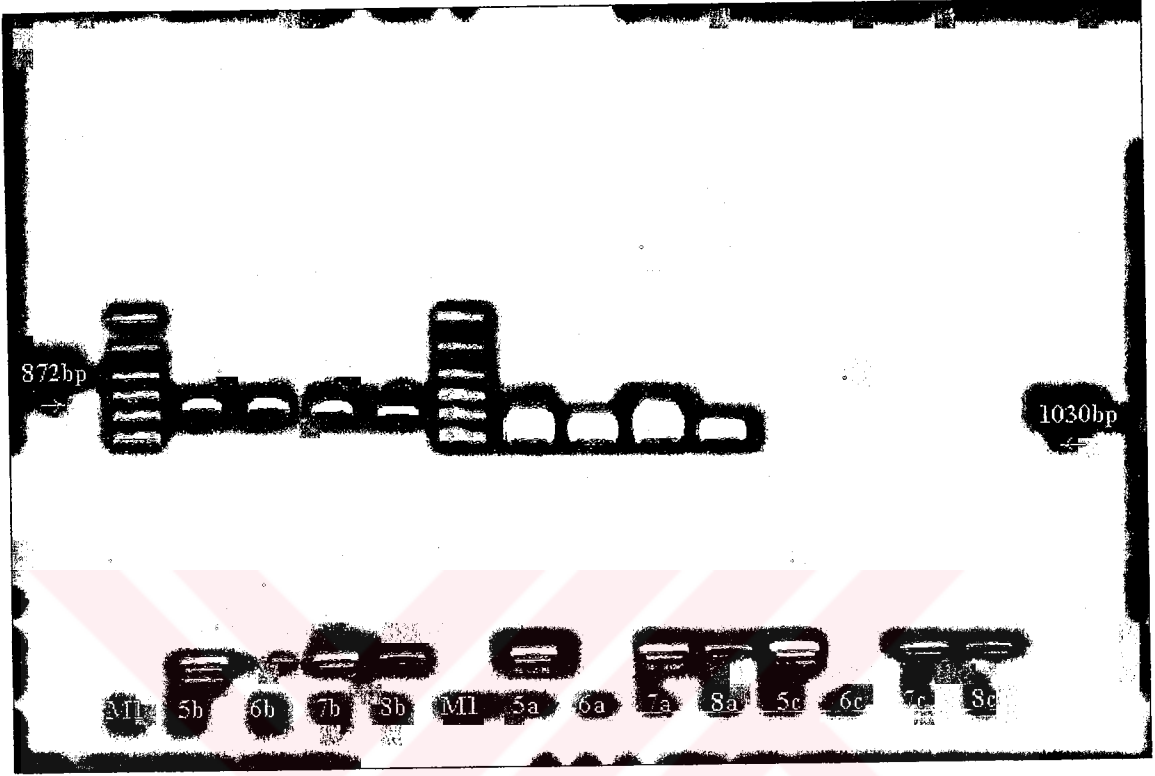
1a, 2a, 3a ve 4a bireylerin 1. bölge (kontrol bölgesi) incelemesi

1b, 2b, 3b ve 4b bireylerin 2. bölge (5 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

1c, 2c, 3c ve 4c bireylerin 3. bölge (7.4 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

M1; GeneRuler 100bp DNA Ladder.

M2; Phix174



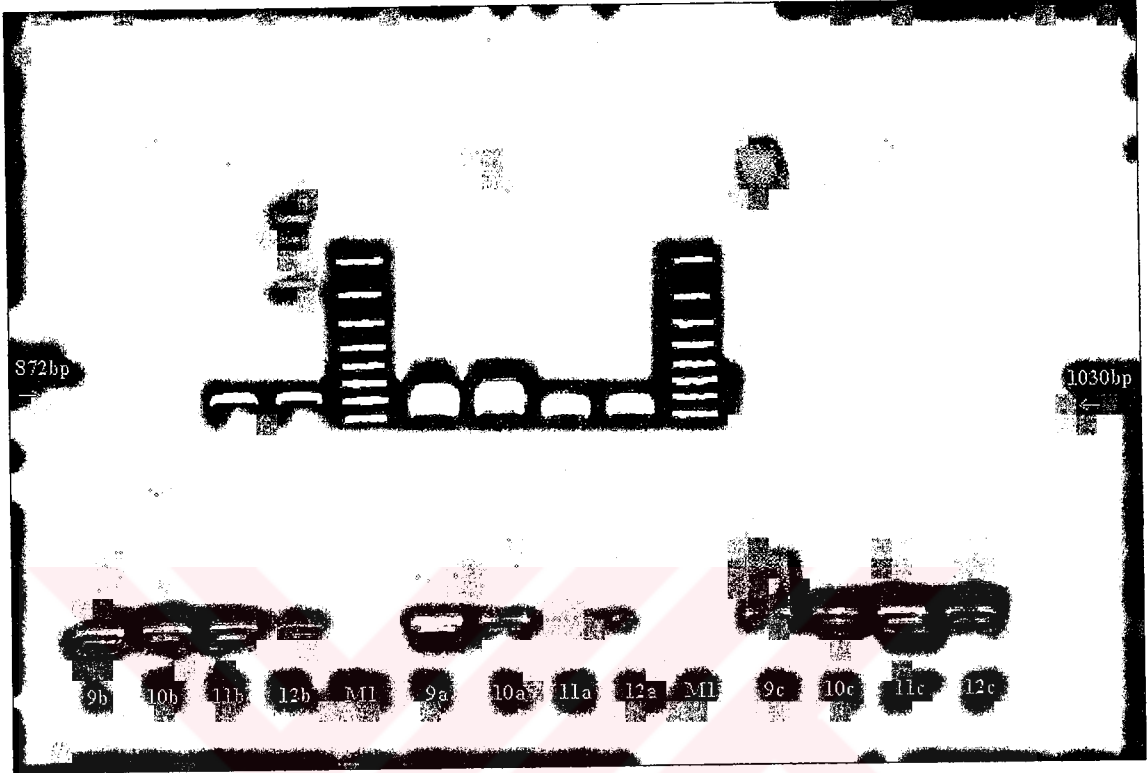
Şekil 6. 5, 6, 7 ve 8 numaralı bireyler kronik periodontitisli bireylerdir.

5a, 6a, 7a ve 8a bireylerin 1. bölge (kontrol bölgesi) incelemesi

5b, 6b, 7b ve 8b bireylerin 2. bölge (5 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

5c, 6c, 7c ve 8c bireylerin 3. bölge (7.4 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

M1; GeneRuler 100bp DNA Ladder.



Şekil 7. 9 numaralı birey periodontal olarak sağlıklı. 10, 11 ve 12 numaralı bireyler kronik periodontitisli bireylerdir.

9a, 10a, 11a ve 12a bireylerin 1. bölge (kontrol bölgesi) incelemesi

9b, 10b, 11b ve 12b bireylerin 2. bölge (5 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

9c, 10c, 11c ve 12c bireylerin 3. bölge (7.4 kb lik delesyon bölgesi) incelemesi

M1; GeneRuler 100bp DNA Ladder.

7.3. Klinik bulguların ve Laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

Laboratuvar bulguları elde edildikten sonra çalışma grubuna ait klinik parametreler grup içerisinde karşılaştırıldı.

Çalışma grubu içerisinde 2. bölge incelemesinde 4881 bp büyüklüğünde delesyon tespit edilen 24 hastanın yaş ortalaması, PI, GI, SD ve KAS ortalaması değerleri ile çalışma grubu içerisinde 2. bölge incelemesinde delesyon tespit edilemeyen 6 hastaya ait yaş ve klinik bulgular karşılaştırıldığında; delesyon tespit edilememiş 6 hastanın yaş, PI, GI, SD ve KAS ortalamalarının 2. bölge incelemesinde delesyon tespit edilmiş 24 hastanın yaş, PI, GI, SD ve KAS ortalamalarına oranla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi ($p<0,001$, $p<0,01$). (Tablo 3)

Laboratuvar çalışması sonucunda hiçbir örnekte 3. bölge incelemesinde delesyona rastlanmadı. Bu nedenle laboratuvar bulgusu olarak 3. bölge incelemesi dikkate alınarak gruplar arası veya grup içi karşılaştırmalar yapılmadı.

Tablo 3. Çalışma grubu; grup içi yaş ve klinik parametrelerin karşılaştırılması.

Parametre		n	X±SD	P değeri
Yaş	Delesyon (+)	24	48.4±7.80	0.002***
	Delesyon (-)	6	37.1±1.47	
PI	Delesyon (+)	24	1.82±0.28	0.010**
	Delesyon (-)	6	1.45±0.35	
GI	Delesyon (+)	24	2.00±0.31	0.000***
	Delesyon (-)	6	1.40±0.41	
SD	Delesyon (+)	24	4.89±0.76	0.000***
	Delesyon (-)	6	3.58±0.32	
KAS	Delesyon (+)	24	5.12±0.86	0.000***
	Delesyon (-)	6	2.15±0.56	

>0.05 istatistiksel olarak önemsiz

**<0.01 istatistiksel olarak önemli

***<0.001 istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli

8. TARTIŞMA

Günümüzde kronik periodontitisin ana etkeninin mikrobiyal dental plak olduğu konusunda fikir birliği vardır.²⁻⁶ Bununla birlikte periodontitisin başlaması ve gelişiminde çeşitli faktörlerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerin en önemlilerinden biride genetikdir. Nitekim periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda DNA hasarları tespit edilmiştir.^{27,28} Ancak yapılan çalışmalarda, periodontitisli bireylerde dişeti dokusunda meydana gelen DNA hasarlarının neden ve hangi DNA molekülünün hangi gen bölgelerinde oluştuğuna dair kesin veriler elde edilememiştir. Kronik periodontitisli bireylerde yapılan çalışmalar, dişeti dokusunda kronik iltihaba bağlı olarak DNA hasarı meydana getirebilen reaktif oksijen türlerinin miktarında artış olduğunu göstermektedir.⁸⁰⁻⁸⁴ Diğer yandan çeşitli dokularda yapılan çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı mitokondriyal DNA'nın nükleer DNA'ya oranla daha savunmasız ve hasar oluşumuna yatkın olduğu rapor edilmiştir.^{36,37} Bu araştırmada; kronik periodontitisli bireylerde dişeti dokusunda mitokondriyal DNA'da delesyon tipi mutasyonların varlığını göstermek, bu delesyonların yaşlanma ve kronik periodontitis hastalığıyla ilişkisine açıklık getirmek çalışmamızın ana amacını oluştururken, eğer varsa bu delesyon tipi mitokondriyal DNA mutasyonunun boyutunu, yerini tespit etmek ve kronik periodontitis hastalığının şiddeti ile olan ilişkisini araştırmak diğer amaçlarını oluşturdu.

Bu amaçlar doğrultusunda; çalışma grubuna daha önce periodontal tedavi görmemiş yaş ortalamaları 46.1 ± 8.3 olan 35-72 yaş aralığında kronik periodontitisli bireyler dahil edilirken, varlığı muhtemel mitokondriyal DNA delesyonunun kronik periodontitis hastalığıyla mı? yoksa yaşlanmayla mı? veya her iki faktörle birden mi? ilişkili

olduğunu araştırmak amacı ile kontrol grubuna yaş ortalamaları 45.7 ± 12.1 olan 25-69 yaş aralığında periodontal olarak sağlıklı bireyler dahil edildi.

Diğer yandan mitokondriyal DNA delesyonlarına neden olabilecek yaşlanma ve kronik iltihap dışındaki faktörlerin elimine edilmesi amacıyla, çalışmamıza dahil edilen tüm bireylerin sistemik olarak sağlıklı bireyler olmasına ve sigara, alkol gibi zararlı maddeler kullanmıyor olmalarına dikkat edildi.

Daha önce yapılan araştırmalarda yaşlı bireylerden alınan karaciğer,⁸⁹ testis,⁹⁰ kas,⁹⁰ kalp⁹¹ ve akciğer⁹² gibi vücudun çeşitli dokularında, 4977 bp ve 7436 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonlarının yaşlanmaya bağlı olarak görüldüğü rapor edilmiştir.

Son yıllarda çeşitli hastalıklar ve mitokondriyal DNA delesyonları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumunda yaşlanma kadar hastalık patogenezi ve şiddetinde rol oynadığı gösterilmiştir.^{48,49} Benzer yaş gruplarındaki hastalıklı ve sağlıklı bireylerden alınan doku örnekleriyle yapılan çalışmalarda, hastalık patogenezi ve şiddetinin mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşma yaşını düşürdüğü rapor edilmiştir.^{48,49,90,93,94} Hastalıklı dokularda direk veya dolaylı olarak biriken toksik maddelerin oksidatif etkiyi artırdığı ve dolayısıyla erken oksidatif hasar meydana getirdiği iddia edilmiştir.^{48,49,90,93,94}

Lee ve arkadaşları⁹⁰ sağlıklı bireylerin iskelet kası dokularından alınan örneklerle yaptıkları araştırmada, yaşlı bireylerde sıklıkla 70 yaş üzerinde 4977 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonlarının varlığını tespit etmişlerdir. Lim ve arkadaşlarının⁴⁸ yaptıkları başka bir araştırmada ise, ileri derecede böbrek hastalığı olan 70 yaş üzeri bireylerin iskelet kası dokusundan alınan örneklerde 4977 bp büyüklüğündeki mitokondriyal DNA delesyonlarının görülme sıklığının aynı yaş grubu sağlıklı bireylere

oranla çok daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Lim ve arkadaşları⁴⁸ 50 yaş altı sağlıklı bireylerin hiçbirisinde iskelet kası dokusunda 4977 bp büyüklüğünde delesyon tespit edemezlerken ileri derecede böbrek hastalığı olan bireylerin iskelet kası dokusunda delesyon görülme yaşının 28'e kadar düştüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ileri derecede böbrek hastası olan 40 yaş altı bireylerde %33, 40-60 yaş arasındaki bireylerde %66 ve 60 yaş üstü bireylerde %100 oranında 4977 bp büyüklüğünde delesyonun varlığını rapor etmişlerdir. İleri derecede böbrek hastalarında iskelet kası dokusunda sürekli biriken üremik toksinlerin reaktif oksijen türlerinin üretimini artırdığı ve buna bağlı olarak erken oksidatif hasar meydana geldiğini bildirmişlerdir.⁴⁸

Kim ve arkadaşları⁴⁹ terminal kalp yetmezliği olan hastalardan ve kalp hastalığı dışındaki nedenlerden dolayı ölmüş kişilerden aldıkları kalp dokusu örnekleri ile yaptıkları araştırmada, terminal kalp yetmezliği olan hastalarda 4977 bp büyüklüğünde ve 7436 bp büyüklüğünde delesyonlar tespit etmişlerdir. Kim ve arkadaşları⁴⁹ yaş-hastalık kombinasyonunun mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumunu artırdığını, dolayısıyla kalp dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının varlığının kalp hastalıklarının patogenezi ve şiddeti ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Fahn ve arkadaşları⁹³ sigara kullanan ve kullanmayan cerrahi rezeksiyon tedavisi gerektiren akciğer hastalıkları olan bireylerden operasyon esnasında aldıkları akciğer dokusu örnekleri ile yaptıkları araştırmada, 4977 bp büyüklüğünde delesyon tespit etmişler ve sigara kullanan bireylerde 4977 bp büyüklüğünde delesyonun görülme oranını 7 kat daha fazla olduğuna dikkat çekmişlerdir. Fakat bireyler arasında sigara kullanımı faktörünün varyasyonunun yüksek olması nedeniyle tespit edilen 4977 bp büyüklüğündeki delesyonun sigara kullanımından daha çok yaşlanmaya bağlı olduğunu

rapor etmişlerdir. Fahn ve arkadaşları⁹⁴ aynı yöntemi kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada, mitokondriyal DNA'da aynı bölgede 4977 bp büyüklüğündeki delesyondan farklı 4839 bp büyüklüğünde delesyon tespit etmişlerdir. Sigara kullanan bireylerde 4839 bp büyüklüğündeki delesyonun sıklığının sigara kullanmayan bireylere oranla anlamlı derecede fazla olduğunu ve bu delesyonun insan akciğerinde sigara kullanımının neden olduğu hasarlar için iyi ve güvenilir bir moleküler marker olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Fahn ve arkadaşları⁹⁴ uzun süre sigara kullanımına bağlı olarak akciğer dokusunda erken oksidatif hasara neden olabilecek serbest radikal birikimi olduğunu ve bu durumun mitokondriyal DNA delesyonlarına neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmalar göstermiştir ki mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumuna, yaşlanma süreci boyunca mitokondri içerisinde doğal olarak biriken reaktif oksijen türlerinin yanı sıra hastalık patogenezi ve sigara kullanımına bağlı patolojik olarak üretilen reaktif oksijen türlerinin de etkisi vardır. Bizim çalışmamızda geniş yaş aralığına sahip gruplar oluşturularak yaşlanma süreci boyunca doğal olarak üretilen reaktif oksijen türlerinin dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumuna etkisi araştırıldığı gibi kronik periodontitisli bir grup oluşturularak kronik iltihap nedeniyle patolojik olarak dişeti dokusunda üretimi artan reaktif oksijen türlerinin bu delesyonun oluşumuna etkisi araştırıldı. Tüm bireylerin sistemik olarak sağlıklı olması, sigara ve alkol gibi zararlı maddeler kullanmıyor olmaları; dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarına neden olabilecek reaktif oksijen türlerinin bu kaynaklardan üretiliyor olma ihtimallerini ortadan kaldırdı.

Çalışmamızın amaçları arasında yer alan dişeti dokusundaki mitokondriyal DNA delesyonlarının büyüklüğünün tespit edilebilmesi için iki değişik marker DNA'dan

faydalanıldı. Ayrıca oluşan delesyonun yaklaşık olarak yerinin tespit edilebilmesi için özel olarak hazırlanmış primer çiftleri kullanıldı.

Bizim araştırmamızda incelediğimiz muhtemel delesyon bölgelerinde daha önce farklı araştırmacılar tarafından çeşitli dokularda değişik büyüklüklerde delesyonların varlığı tespit edilmiştir. Kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonu tespit ettiğimiz bölgede farklı araştırmacılar tarafından daha önce tespit edilmiş değişik büyüklüklerdeki delesyonlar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. 2. bölgede daha önce tanımlanmış delesyonlar.

Delesyon noktaları	Delesyonun boyutu	Tekrarlayan noktalar	N
8271:8281	-9	NR	NR
8426:12894	-4467	8416-8420/12890-12894	D, 5/5
8468:13446	-4977	8470-8482/13447-13459	D, 13/13
8469:13447	-4977	8470-8482/13447-13459	D, 13/13
8482:13460	-4977	8470-8482/13447-13459	D, 13/13
8570:13236	-4665	8566-8571/13237-13242	I, 5/6
8631:13513	-4881	8625-8631/13506-13512	D, 7/7
8631:13580	-4949	-	NR
8710:13549	-4839	8703-8711/13541-13549	D, 9/9
9191:12909	-3717	9189-9191/12906-12908	D, 3/3
9515:13055	-3539	9517-9525/13055-13063	D, 7/9
9574:12972	-3397	9568-9574/12965-12971	D, 7/7
10367:12829	-2461	10365-10367/12826-12828	D, 3/3
10598:13206	-2607	10587-10592/13192-13197	D, 6/6

Bizim araştırmamızda tüm bireylerden alınan biyopsi örneklerinin laboratuvar incelemesi, 24 kronik periodontitisli bireyde 4881 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonunun olduğunu göstermiştir. Bu örneklerin laboratuvar çalışması esnasında kullanılan marker DNA’lar rehberliğinde delesyon varlığında oluşan fragmentin büyüklüğü 872 bp olarak ölçülmüştür. Kontrol amacı ile çalışmamıza dahil

edilen sağlıklı bireylerden alınan örneklerin hiçbirinde mitokondriyal DNA delesyonunun varlığı gözlenmemiştir.

Sugano ve arkadaşları²⁸ 47 yaş üzeri kronik periodontitisli bireylerde dişeti dokusunda mikondriyal DNA delesyonlarının var olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar dişeti dokusunda tespit ettikleri delesyonun 4977 bp büyüklüğünde olduğunu düşünmüşler fakat çalışmaları esnasında bu düşüncelerini doğrulayacak bir yöntem kullanmadıkları gibi aynı yaş grubunda periodontal olarak sağlıklı bireyleri çalışmalarına dahil etmemişlerdir ayrıca çalışmalarına dahil ettikleri kronik periodontitisli hastaların PI, GI, KAS ve SD gibi klinik parametrelerini ölçmemişlerdir. Oysa bizim çalışmamızda varlığı muhtemel delesyonların büyüklüğünün tespiti amacıyla marker DNA kullanılıp tespit edilen delesyonun 4881 bp büyüklüğünde olduğu teyit edildiği gibi benzer yaş aralıklarında periodontal olarak sağlıklı ve hastalıklı bireylerin dahil edildiği iki grup oluşturuldu böylece delesyon oluşumuna yaş faktörünün etkisi değerlendirildi, ayrıca PI, GI, KAS ve SD gibi klinik parametreler ölçüldü ve hastalık şiddetinin delesyon oluşumu ile ilişkisi değerlendirildi.

Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler, periodontal olarak sağlıklı 70 yaş altı bireylerin dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının olmadığını göstermektedir. Ülkemizde yapılan epidemiolojik çalışmalarda, 65 yaş üzeri bireylerde dişsizlik oranının %75 civarında olduğu ve dişli bireylerinde %72'sinin ileri derece periodontal tedaviye ihtiyacı olduğu bildirilmiştir.^{95,96} Bu durum göz önüne alınacak olursa, 70 yaş üzeri dişli ve periodontal olarak sağlıklı bireylerden oluşan bir grubun oluşturulmasının neredeyse imkansız olduğu anlaşılabacaktır. Ancak ileri yaş gruplarında çeşitli sağlıklı dokularda yapılan çalışmalar dikkate alınırsa, 70 yaş üzeri periodontal

olarak sağlıklı bireylerde yaşlanmaya bağlı olarak dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının varolması ihtimal dahilindedir.

Araştırmamız sonucunda kontrol grubundaki sağlıklı bireylerde hiçbir delesyona rastlanmazken çalışma grubundaki kronik periodontitisli bireylerde %80 oranında 4881 bp büyüklüğünde delesyona rastlanması kronik periodontitis hastalığının dişeti dokusunda mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşumu ile ilişkili olduğu sonucunu bize vermektedir. Keza her iki grup arasında farklılık gösteren faktörler klinik parametrelerdir. Grupların yaş ortalamalarının ve yaş aralıklarının benzer olmasına rağmen laboratuvar bulgularının farklı olması dişeti dokusunda tespit edilen 4881 bp büyüklüğündeki mitokondriyal DNA delesyonunun yaşlanma ile direk ilişkisinin olmadığını göstermektedir.

Bizim araştırmamızda dişeti dokusunda elde ettiğimiz bulguları daha önce çeşitli dokularda mitokondriyal DNA delesyonları ile ilgili yapılan çalışmalarla karşılaştıracak olursak; bir dokuda meydana gelen mitokondriyal DNA delesyonları ile dokuda erken oksidatif hasar oluşumuna neden olabilecek faktörlerin varlığı arasında yakın ilişki olduğu savının bizim araştırmamız tarafından da desteklediğini görürüz.

Araştırmamızın sonucunda 4881 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonu tespit ettiğimiz çalışma grubundaki 24 hastaya ve herhangi bir delesyon tespit edemediğimiz çalışma grubundaki diğer 6 hastaya ait klinik parametrelerin grup içi karşılaştırması yapıldığında; her iki alt grup arasında tüm klinik parametrelerde anlamlı farklılıklar olduğu gözlenmiştir. İki alt grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların gözlendiği PI, GI, KAS ve SD parametreleri, periodontal açıdan periodontal hastalık türünün ve şiddetinin belirlenmesinde kullanılan ölçümlerdir. Her iki alt grup arasında klinik parametrelerin anlamlı derecede farklı olması kronik

periodontitis hastalığının şiddetinin dişeti dokusunda 4881 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonunun oluşmasıyla ilişkili olabileceği fikrini vermektedir.

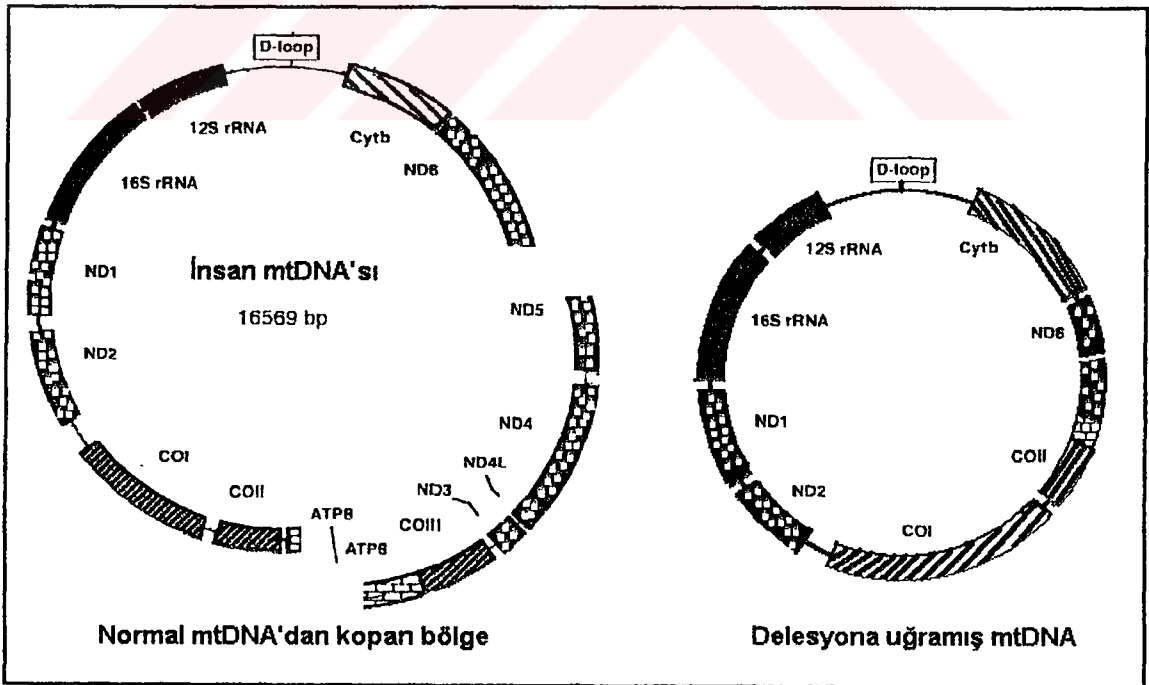
Yine çalışma grubu içerisinde yapılan grup içi değerlendirmede; delesyon tespit ettiğimiz hastalar ile delesyon tespit edemediğimiz hastalar arasında yaş parametresinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği görülmüştür. İlk bakışta çalışma grubu içerisinde delesyon oluşumunda yaş faktörünün önemli olduğu düşünülmüştür. Fakat delesyon tespit edilmiş alt grup içerisinde 40 yaş civarı şiddetli kronik periodontitisli bireylerinde bulunması, delesyon oluşumunda yaş faktöründen daha çok hastalık şiddetinin önemli olduğu kanaatini uyandırmıştır. Zira klinik parametreler dikkate alındığında delesyon tespit ettiğimiz hastaların nadiren orta şiddetli, sıklıkla şiddetli kronik periodontitisli hastalar, delesyon tespit edemediğimiz hastaların ise hafif şiddetli kronik periodontitisli hastalar olduğu dikkat çekmiştir.

Mitokondriyal DNA'nın varlığının tespitinden günümüze kadar yapılan araştırmalar, bu genomun mitokondriyal ATP üretiminde önemli görevler üstlendiğini ortaya koymuştur. ATP sentezinin gerçekleşmesinde 5 adet solunum kompleksi enzimleri öncelikli rolü oynar. Mitokondriyal DNA, 5 adet solunum kompleksi zinciri (OXPHOS: oksidatif fosforilasyon) enzimlerinden 4'ünün alt birimleri için gerekli bileşenleri sağlar.²⁹

Delesyona uğramış mitokondriyal DNA'da oksidatif fosforilasyon için kodlanan 13 mRNA geninin bir kısmının eksilen bölge içerisinde olması ve bu nedenle kodlanamaması ATP üretiminin gerçekleşmesinin önündeki önemli engellerden biridir.³⁹ Hücre içerisindeki tüm mitokondriyal DNA'larda delesyon oluşmamış olabilir. Bu durumda kodlanması zaruri olan mRNA genleri sağlam mitokondriyal DNA'lardan elde edilebilir. Fakat delesyona uğramış mitokondriyal DNA'nın boyunun kısa olması,

delesyonlu mitokondriyal DNA'ya normal mitokondriyal DNA'ya göre replikatif bir üstünlük sağlar. Bu üstünlük zamanla delesyonlu mitokondriyal DNA'nın normallere göre oranını sürekli artmasına neden olur. Oksdatif hasarın devam etmesi ve delesyonlu mitokondriyal DNA'nın replikatif üstünlüğü bir müddet sonra doku hücrelerinde ATP üretimini azaltarak dokuda enerji açığına neden olacaktır.³⁹

Bizim araştırmamızda dişeti dokusunda tespit ettiğimiz 4881 bp büyüklüğündeki mitokondriyal DNA delesyonu, ATPaz8, ATPaz6, CO III, ND 3, ND 4, ND 4L ve ND 5 genlerini içeren bölgenin kopması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu genlerden yoksun olan delesyona uğramış mitokondriyal DNA'nın replikatif üstünlüğünü nedeniyle oranının hızla artması dişeti dokusunda ciddi enerji sorununun ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durum çeşitli mekanizmalar yoluyla başlamış olan doku hasarının ve dolayısıyla doku yıkımının şiddetlenerek artmasıyla sonuçlanabilir. (Şekil 8)



Şekil 8. Mitokondriyal DNA'nın delesyona uğraması.

Araştırmamız irdelendiğinde; Takane ve arkadaşlarının²⁷ ağırlıklı olarak polimorfonükleer lökositlerden salınan reaktif oksijen türlerinin çeşitli DNA hasarları meydana getirerek doku yıkımına neden olabilecekleri savı ile örtüştüğü görülmektedir.

Dişetin kronik iltihabı ile karakterize kronik periodontitisli hastalarımızda dişeti dokusunda oluşan erken oksidatif etkinin sadece hücreler arası moleküller üzerinde değil aynı zamanda mitokondriyal DNA gibi hücre içi moleküller üzerinde de hasarlar meydana getirebildiğini söyleyebiliriz. Klinik bulguların ve laboratuvar bulgularının karşılaştırılması sonucu elde edilen verilerden yola çıkarak; dişeti dokusundaki kronik iltihabın sonucu açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu mitokondriyal DNA delesyonunun kronik periodontitis hastalığının şiddetinden etkilendiğini ve bir müddet sonra delesyonlu DNA'nın replikatif üstünlüğü nedeniyle oranının artması sonucu hastalığın şiddetini etkileyebileceğini düşünebiliriz.

Ancak literatürde periodontal hastalıklarla mitokondriyal DNA delesyonları arasındaki ilişkiye açıklık getirebilecek araştırmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Bizim araştırmamız bu konuyla ilgili yapılmış iki çalışmadan biridir. Dolayısıyla literatürlerle geniş olarak tartışamadığımız araştırmamız ancak kontrol grubu ile mukayese edilerek sonuca varılmaya çalışılmıştır. Bu konuya ışık tutabilecek ileriki çalışmaların yapılmasının yararlı ve gerekli olacağı kanaatindeyiz.

9. SONUÇLAR

1. Kronik periodontitisli bireylerde dişeti dokusunda konak savunma hücrelerinin sayısının ve aktivasyonunun artmasına bağlı olarak açığa çıkan reaktif oksijen türleri erken oksidatif hasar meydana getirmektedirler.
2. Kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda meydana gelen erken oksidatif hasar sadece hücreler arası molekülleri değil aynı zamanda mitokondriyal DNA gibi hücre içi molekülleride kapsamaktadır.
3. Kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda 4881 bp büyüklüğünde mitokondriyal DNA delesyonunun varlığı tespit edilmiştir.
4. Gruplar arası laboratuvar bulgularının incelenmesi sonucu elde edilen veriler, periodontal olarak sağlıklı 70 yaş altı bireylerin dişeti dokusunda yaşlanmaya bağlı olarak mitokondriyal DNA delesyonlarının oluşmadığını göstermektedir.
5. Çalışma grubu içerisinde klinik bulgular ile laboratuvar bulgularının karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler, kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda tespit edilen 4881 bp büyüklüğünde ki mitokondriyal DNA delesyonunun yaşlanma ile direk ilişkisi olmadığını göstermektedir.
6. Çalışma grubu içerisinde klinik bulgular ile laboratuvar bulgularının karşılaştırılması sonucu elde edilen veriler, kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda tespit edilen 4881 bp büyüklüğünde ki mitokondriyal DNA delesyonunun kronik periodontitisin şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir.
7. Araştırmamız sırasında periodontal olarak sağlıklı 70 yaş üzeri bireylerin dahil edilebileceği bir grup oluşturulamamıştır. Bu durum toplumumuzda periodontal

hastalıkların ve erken diş kaybına neden olan diğer diş hastalıklarının prevalansının ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir.



10. KAYNAKLAR

1. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. J Periodontol 1998; 69(2): 269-278.
2. The American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases (position paper). J Periodontol 1999; 70: 457-470.
3. Williams, R.C. Periodontal Diseases. N Engl J Med 1990; 322: 373-381.
4. Flemming TF. Periodontitis. Ann Periodontol 1999; 4: 32-37.
5. Greenstein G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. JADA 2000; 131: 1580-1592.
6. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. Philadelphia London New York St Louis Sydney Toronto: W.B Saunders Company, 2002: 398-402.
7. Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000 1993; 2: 57-71.
8. Albandar JM. Periodontal diseases in North America. Periodontol 2000 2002; 29: 31-69.
9. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. J Periodontol 1999; 70(1): 13-29.
10. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1991; 62(2): 123-131.
11. Lamster IB, Lalla E. Periodontal disease and diabetes mellitus: discussion, conclusions, and recommendations. Ann Periodontol 2001; 6(1): 146-149.

12. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998; 69(1): 76-83.
13. Reddy MS. Osteoporosis and periodontitis: discussion, conclusions, and recommendations. *Ann Periodontol* 2001; 6(1): 214-217.
14. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann Periodontol* 2001; 6(1): 197-208.
15. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol* 2001; 72(3): 368-373.
16. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 1999; 4(1): 54-64.
17. Lamster IB, Grbic JT, Bucklan RS, Mitchell-Lewis D, Reynolds HS, Zambon JJ. Epidemiology and diagnosis of HIV-associated periodontal diseases. *Oral Dis* 1997; 3 (Suppl 1): S141-S148.
18. Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Periodontol* 1990; 61(11): 699-704.
19. Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res* 1996; 75(2): 796-802.
20. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 2001; 28(4): 283-295.

21. Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14: 202-215.
22. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res* 2000; 35(2): 102-107.
23. McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 2000; 71(2): 156-163.
24. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 70(7): 711-723.
25. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Calcium and the risk for periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71(7): 1057-1066.
26. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71(8): 1215-1223.
27. Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol* 2002; 73: 551-554.
28. Sugano N, Kawamoto K, Numazaki H, Murai S, Ito K. Detection of mitochondrial DNA mutations in human gingival tissues. *J Oral Science* 2000; 42: 221-223.
29. Oztas S, Yakan B. Mitokondriyon & Mitokondriyal DNA Patolojileri. Erzurum Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi ofset tesisleri, 2000;1-75.

30. Johns Donald R. Mitochondrial DNA and Disease. *N Engl J Med* 1995; 333/10:638-644.
31. Nass MMK, Nass S. Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Exp Cell Res* 1963;26:424–437.
32. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn BM, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457–465.
33. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410:103–123.
34. Attardi G, Schwartz G. Biogenesis of Mitochondria. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4: 289-333.
35. Borst P, Grivell LA. Small is beautiful—Portrait of a mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:443–444.
36. Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 141-151.
37. Richter C, Park J.M, Ames B.N. Normal oxidative damage to the mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1988; 85: 6465–6467.
38. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242(4884): 1427-1430.
39. Mandavilli B.S, Santos J.H, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Research* 2002; 509:127–151.

40. Lee HC, Yin PH, Yu TN, Chang YD, Hsu WC, Kao SY, Chi CW, Liu TY, Wei YH. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues -- effects of betel quid chewing and oral cancer. *Mutat Research* 2001; 493(1-2): 67-74.
41. Jessie BC, Sun CQ, Irons HR, Marshall FF, Wallace DC, Petros JA. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages. *Exp Gerontol* 2001; 37(1): 169-174.
42. Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Koh N, Takeda T. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 1843-1845.
43. Jackson AL, Chen R, Loeb LA. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1998; 95: 12468-12473.
44. Tamori A, Nishiguchi S, Nishikawa M, Kubo S, Koh N, Hirohashi K, Shiomi S, Inoue M. Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004; 39(11): 1063-1068.
45. Yoneda M., Katsumata K., Hayakawa M., Tanaka M. and Ozawa T. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209(2): 723-729.
46. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(3-4): 225-242.
47. Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179(2): 1023-1029.

48. Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(5): 454-463.
49. Kim UK, Kim HS, Oh BH, Lee MM, Kim SH, Chae JJ, Choi HS, Choe SC, Lee CC, Park YB. Analysis of mitochondrial DNA deletions in four chambers of failing human heart: hemodynamic stress, age, and disease are important factors. *Basic Res Cardiol* 2000; 5(2): 163-171.
50. Shigenaga M.K.; Hagen T.M.; Ames B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994; 91: 10771-10778.
51. Yen TC, King KL, Lee HC, Yeh SH, Wei YH. Age-dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxides and superoxide dismutase in human liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med* 1994; 16: 207-214.
52. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biol Med* 2000; 28: 1387-1404.
53. Nikjoo H, O'Neill P, Terrissol M, Goodhead DT. Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event. *Int J Radiat Biol* 1994; 66(5): 453-457.
54. Krishnan KJ, Harbottle A, Birch-Machin MA. The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. *J Invest Dermatol* 2004; 123(6): 1020-1024.
55. Halliwell, B., Gutteridge, J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J. Biochem* 1984; 219: 1-14.

56. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988, 35: 95–125.
57. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 305–319.
58. Thompson HL, Wilton JM. Effects of anaerobiosis and aerobiosis on interactions of human polymorphonuclear leukocytes with the dental plaque bacteria *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga ochracea*, and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1991; 59: 932–940.
59. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Research* 1999; 428: 17–22.
60. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 1991; 91(Suppl.3C): 3C14S-3C22S.
61. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
62. Wickens A.P. Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* 2001; 128: 379-391.
63. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
64. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 1988; 241: 1-5.

65. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180(2): 248-257.
66. Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN, Ruuge EK. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* 1983; 155(1): 19-24.
67. Shimomura Y, Nishikimi M, Ozawa T. Novel purification of cytochrome c1 from mitochondrial Complex III. Reconstitution of antimycin-insensitive electron transfer with the iron-sulfur protein and cytochrome c1. *J Biol Chem* 1985; 260(28): 15075-15080.
68. Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Developmental Biology* 2001; 12: 449-457.
69. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 435-445.
70. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol* 1982; 107: 395-418.
71. Edwards SW. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, Cambridge University Press. 1994.
72. 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.
73. Tepperman BL, Brown JF, Korolkiewicz R, Whittle BJ. Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells: effect of endotoxin challenge. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271(3): 1477-1482.

74. Salzman AL, Eaves-Pyles T, Linn SC, Denenberg AG, Szabo C. Bacterial induction of inducible nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1998; 114(1): 93-102.
75. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(11): 1287-1312.
76. Bu-Yeo Kim, Min-Joon Han and An-Sik Chung. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(6): 686-698.
77. John W. Coleman. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology* 1 2001 1397–1406
78. Ilias G. Kirkinezosa and Carlos T. Moraes. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *seminars in Cell & Developmental Biology* 2001; 12: 449–457.
79. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.
80. Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connect Tissue Res* 1998; 37: 13-28.
81. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10: 458-476.
82. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000; 6: 138-151.
83. Moseley R, Waddington RJ, Evans P, Halliwell B, Embery G. The chemical modification of glycosaminoglycan structure by oxygen-derived species in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1244: 245–252.

84. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 137-143.
85. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-296.
86. Solak M, Bağcı H, Şengil A, Oztaş S. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon: Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2000: 30-46.
87. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation of between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 121-135.
88. Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalance and severity . *Acta Odontol Scand* 1963; 21: 531-551.
89. Yen TC, Su JH, King KL, Wei YH. Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 124-131.
90. Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. Differential accumulations of 4977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 37-43.
91. Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Sugiyama S, Ozawa T. Fragmentation of human heart mitochondrial DNA associated with premature aging. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202(1): 102-110.
92. Lee HC, Lim ML, Lu CY, Liu VW, Fahn HJ, Zhang C, Nagley P, Wei YH. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 1999; 362(2): 309-316.

93. Fahn HJ, Wang LS, Hsieh RH, Chang SC, Kao SH, Huang MH, Wei YH. Age-related 4,977 bp deletion in human lung mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154: 1141-1145.
94. Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH. Smoking-associated mitochondrial DNA mutations and lipid peroxidation in human lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(6): 901-909.
95. Görgün S, Ozperk G, Yazıcıoğlu B. Kalıcı dişlerde çekim nedenlerinin değerlendirilmesi. *Atatürk Univ. Diş Hek. Fak. Derg* 1995; 5(2): 15-18.
96. Tezel A. Erzurum ve çevresinde periodontal tedavi gereksiniminin saptanması. Atatürk Uni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Erzurum: Doktora Tezi, 1997.

