

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

(DOKTORA TEZİ)

**GENERALİZE AGRESİF PERİODONTİTİSLİ
BİREYLERDE BAŞLANGIÇ TEDAVİSİNE DESTEK
OLARAK KULLANILAN SİSTEMİK
METRONİDAZOL+AMOKSİSİLİN KOMBİNASYONUNUN
BİYOKİMYASAL VE MİKROBİYOLOJİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

EMİNE ÇİFCİBAŞI YEK

**DANIŞMAN
PROF.DR.SERDAR ÇİNTAN**

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

22/01/2008

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Doktora
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Periodontoloji A.D.
Tez Sahibi : Araş.Gör.Emine Çifcibaşı Yek
Tez Başlığı : "Generalize Agresif Periodontitisli Bireylerde Başlangıç Tedavisine Destek Olarak Kullanılan Sistemik Metronidazol-Amoksisilin Kombinasyonunun Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi"
Sınav Yeri : İ.Ü.Dişhekimliği Fak. Periodontoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 14 / 01 / 2008

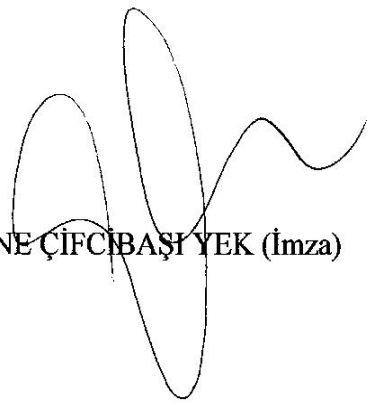
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Özen TUNCER (İ.Ü.Dişhek. Fak. Periodontoloji A.D.)
- 2.Prof.Dr.Utku ONAN (Tez İzleme Komite Üyesi - İ.Ü.Dişhek. Fak. Periodontoloji A.D.)
- 3.Prof.Dr.Güven KÜLEKÇİ (Tez İzleme Komite Üyesi - Dişhek. Fak.Temel Tıp Bilimleri AD, Mikrobiyoloji Bilim Dalı.)
- 4.Prof.Dr.Serdar ÇINTAN (Danışman-Tez İzleme Komite Üyesi - İ.Ü.Dişhek. Fak. Periodontoloji A.D.)
- 5.Prof.Dr.Bahar KURU (Marmara Üniv. Diş Hek. Fak. Periodontoloji A.D.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



EMİNE ÇİFCİBAŞI YEK (İmza)

İTHAF

Doğumundan bir gün öncesine kadar tezimi jüri üyelerine ulaştırmaya çalıştığım
canım oğluma ve sevgili eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince mesleki ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım ve çok değerli hocam **sayın Prof. Dr. Serdar Çintan'a**

Tez aşamalarındaki katkılarından dolayı tez izleme komitesi üyeleri **sayın Prof.Dr. Özen Tuncer** ve **sayın Prof.Dr. Güven Külekçi'ye**

Doktora eğitimim boyunca katkılarından dolayı **Prof.Dr. Utku Onan'a;**
Prof.Dr.Hasan Meriç'e; Prof.Dr.Aslan Gökbuget'e;

Prof.Dr. Gülден Işık'a; Prof.Dr. Erhan Fıratlı'ya; Prof.Dr.Korkud Demirel'e ve Prof.Dr. Funda Yalçın'a; İ.Ü.Tıp Fakültesi Temel Bilimler Mikrobiyoloji, ELISA laboratuvarının tüm olanaklarından yararlanma fırsatı sağlayan **Prof.Dr. Selim Badur'a,** ELISA laboratuvarı değerli çalışanlarına, tezimin kültür ve PCR çalışmaları esnasında her tür desteklerinden yararlandığım **Dr.Nursen Topçuoğlu, Dr. Fahriye Keskin ve Dr. Sevgi Çiftçi, Dr Oya Balkanlı'ya**

Beraber çalıştığım asistan arkadaşlarım **Dt. Dilek Güvenç** ve doktora çalışmamın her aşamasında dostluğu, yardımseverliği ve güleryüzü ile her zaman yanımda olan **Dt. Göze Kara'ya;** beraber çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma;

Anabilim dalı hemşirelerimize, sekreterimiz **Ayşegül Çiftçi'ye** ve tüm **Anabilim Dalı personeline;**

manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim **aileme;**

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Periodontitis	4
2.2. Periodontal Hastalık Etyolojisinde Mikrobiyal Faktörlerin Rolü	5
2.3. Subgingival Plak İçinde Mikrobiyal Birliktelikler	7
2.3.1. Kırmızı kompleks patojenleri	8
2.3.1.1. Porphyromonas gingivalis:	9
2.3.1.2. Treponema denticola	10
2.3.1.3. Tannerella forsythia	11
2.4. Mikrobiyal tanı yöntemleri	12
2.5. Biofilm	16
2.6. Periodontal Hastalık İle Subgingival Biofilm İçeriği İlişkisi.....	18
2.6.1. Periodontal bölgelerde subgingival mikrobiyal içerikle klinik değişkenler arasındaki ilişki.....	18
2.6.2. Periodontitisli bireylerde sağlıklı ve hastalıklı bölgelerdeki mikrofloranın periodontal olarak sağlıklı bireylerdeki sağlıklı bölgelerdeki mikroflora ile karşılaştırılması.....	19
2.6.3. Konak düzeyindeki değişkenlerle subgingival biofilm içeriği arasındaki ilişki.....	20
2.6.3.1. Sigara:	20
2.6.3.2. Obezite:.....	20
2.6.3.3. Genetik özelliklerin subgingival plak içeriğine etkileri:	21

2.6.3.4. Coğrafi yerleşimin subgingival plak içeriğine etkileri:	21
2.7. <i>Porphyromonas gingivalis</i> 'in Periodontitiste Rolü	22
2.8. Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)	26
2.8.1. Matriks metalloproteinaz ailesinin temel özellikleri.....	27
2.8.2. Matriks metalloproteinazların periodontal hastalıktaki rolleri	30
2.8.2.1. Periodontal hastalık-matriks metalloproteinaz ilişkisini destekleyen çalışmalar	30
2.8.2.2. Dokuda yapılan çalışmalar.....	30
2.8.2.3. Dişeti oluk sıvısında yapılan çalışmalar	30
2.8.2.4. <i>In situ</i> hibridizasyon ve immunohistokimyasal çalışmalar.....	32
2.8.2.5. ELISA çalışmaları	34
2.9. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesi ve Periodontal Hastalık.....	37
2.10. MMP İnhibitörleri.....	39
2.10.1. Matriks metalloproteinazlar ve doku inhibitörleri	40
2.11. Latent Metalloproteinazların Etkin Proteinazlara Dönüşümü.....	41
2.12. Periodontal Hastalık Tedavisinde Sistemik Antibiyotikler.....	47
2.12.1. Antibiyotik türleri	50
2.12.1.1. Aktivite	51
2.12.2. Toksisite	51
2.12.3. Farmakoloji.....	51
2.12.3.1. Antimikrobiyal tedavide farmakokinetik değişkenler:	51
2.12.4. İlaç dozu	52
2.12.4.1. Orofasiyal infeksiyonlarda ilaç dozu esasları:	52
2.12.4.2. Antibiyotik kombinasyonları	52
2.12.5. Kombine antimikrobiyal tedavi	54
2.12.6. Agresif Periodontitisli Bireylerde Farklı Sistemik Antibiyotik Uygulamaları	55
2.12.7. Metronidazol+Amoksisilin Kombinasyonuyla İlgili Çalışmalar.....	56
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	62
3.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Gereçler	62
3.2. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Çözeltiler.....	64
3.3. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Gereçler Kitler.....	68
3.4. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Kimyasal Madde Ve Çözeltiler.....	69

3.5. HASTA SEÇİMİ	70
3.6. Klinik Ölçümler.....	71
3.6.1. Plak indeksi (Silness-Löe, 1964) [165]	71
3.6.2. Gingival indeks (Löe-Silness, 1963) [111]	72
3.6.3. Sondalanabilir cep derinliği.....	72
3.6.4. Klinik ataşman düzeyi.....	72
3.7. Tedavi Planı.....	73
3.8. Subgingival Plak Örneklerinin Toplanması	74
3.9. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri	76
3.9.1. Taşıma için kullanılan transport sıvısı	76
3.9.2. Sulandırım İçin Kullanılan Solüsyon	77
3.9.3. Kullanılan Besiyeri	77
3.9.3.1. CDC (Centers for Disease Control) Anaerop Kanlı Agar:	77
3.9.3.2. Tanıda kullanılan besiyerleri.....	77
3.9.4. Hazır tanı kitleri	78
3.9.4.1. Api 20A:	78
3.9.4.2. Api ZYM	78
3.9.5. PCR İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar	79
3.9.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	79
3.9.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	80
3.9.6. Kültür Yöntemi :	81
3.9.6.1. İnokülasyon:.....	81
3.9.6.2. İnkübasyon:.....	81
3.10. Tanı:	81
3.10.1. Bakteri Sayılarının Hesaplanması:.....	81
3.10.2. <i>Porphyromonas</i> ve Pigmentli <i>Prevotella</i> 'ların Tanısı:	82
3.10.2.1. Ön (Cins düzeyinde) Tanı:.....	82
3.10.2.2. İleri (Tür Düzeyinde) Tanı:.....	83
3.10.2.3. İndol oluşumu (Tryptofonaz).....	83
3.10.2.4. Api 20A ile inceleme:.....	83
3.10.2.5. Karbonhidrat Fermentasyonu:.....	83
3.10.2.6. Api 20A ile inceleme:.....	84
3.10.2.7. Eskülin hidrolizi:	84

3.10.2.8. Api20A ile inceleme:	84
3.10.3. Enzim Aktivitititeleri:	84
3.11. PCR ile Tanı Yöntemi:	85
3.11.1. DNA Ekstraksiyonu	85
3.11.2. PCR Protokolü	86
3.11.2.1. PCR Karışımı	86
3.11.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	86
3.11.2.3. Elektroforez Jelin Jazırlanması	86
3.11.2.4. Elektroforez Jelin Yürütülmesi	86
3.12. Dişeti oluk sıvısı (DOS) örneklerinin toplanması	87
3.13. Periotron 6000 [®] Cihazının Kalibrasyonu ([®] Harco Electronics, Winnipeg, Canada)	87
3.14. Dişeti oluk sıvısını filtre kağıtlarından geri kazanılması	88
3.15. DOS örneklerinin işlenmesi	88
3.16. TIMP-1 ve MMP-1'in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile Analizi:	88
3.16.1. MMP-1 ve TIMP-1 ELİSA'sı	88
3.16.2. MMP-1/TIMP-1 ELISA Yönteminin Çalışma İlkesi	89
3.16.3. Dişeti Oluk Sıvısı Örneklerinin Sandwich Elisa Yöntemiyle Çalışılması	89
3.16.4. Standartların ve örneklerin eklenmesi	89
3.17. İstatistiksel İncelemeler	92
4. BULGULAR	94
4.1. Klinik Bulgular	94
4.2. Mikrobiyolojik Bulgular	104
4.2.1. Kantitatif kültür değerlendirmeleri	104
4.3. Biyokimyasal Bulgular	109
5.TARTIŞMA	132
5. SONUÇLAR	153

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Plak örneklerinde mikrobiyal içeriğin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması:	14
Tablo 2-2 Periodontal sağlık, gingivitis ve periodontitisle ilişkilendirilen subgingival türler [40]	25
Tablo 2-3 Periodontal dokularda kollajen tiplerinin dağılımı [145]	44
Tablo 2-4 İnsan matriks metalloproteinazları sınıflama ve özellikleri.....	45
Tablo 2-5 Metronidazol–Amoksisilin farmakokinetik özellikleri, DOS, SERUM konsantrasyonları [155]	53
Tablo 3-3-1: Deney ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin cinsiyete göre dağılımları	70
Tablo 4-1 Plak İndeksi (PI) değerlendirmeleri	94
Tablo 4-2 : Gingival İndeks (GI) değerlendirmeleri	96
Tablo 4-3: Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD) Değerlendirmeleri.....	98
Tablo 4-4: Klinik Ataşman Seviyesi Değerlendirmeleri	100
Tablo 4-5: Klinik indeks değerlerinin farklarına göre değerlendirilmeleri.....	102
Tablo 4-6: Total bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri.....	104
Tablo 4-7: Fakültatif anaerob bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri	105
Tablo 4-8: Zorunlu anaerob bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri	106
Tablo 4-9: Siyah pigmentli bakteri sayılarının örnek zamanına göre değerlendirilmesi	107
Tablo 4-10: Kantitatif kültür bulgularının farklarına göre değerlendirilmeleri.....	109
Tablo 4-11: Total TIMP-1(pg) düzeylerinin değerlendirmesi.....	109
Tablo 4-12: TIMP-1 (pg/vol) düzeylerinin değerlendirilmesi.....	111
Tablo 4-13: Total MMP-1 (pg düzeyi) düzeylerinin değerlendirilmesi.....	113
Tablo 4-14: MMP-1 (pg/vol) ölçümlerinin değerlendirilmesi.....	115
Tablo 4-15: Biyokimyasal ölçümlerin farklarına göre değerlendirilmeleri	116
Tablo 4-16: PCR analizleri sonrası Pi, Pn ve Pp saptanma durumuna göre gruplar arası değerlendirmeler	117

Tablo 4-17: PCR analizleri sonrası Tf, Td ve Pg saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı.....	119
Tablo 4-18: PCR analizleri sonrası Aa saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı	121
Tablo 4-19: Pi varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi	122
Tablo 4-20: Pn varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi.....	123
Tablo 4-21: Pp varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi.....	124
Tablo 4-22: Tf varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi	124
Tablo 4-23: Td varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi.....	125
Tablo 4-24: Pg varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi.....	127
Tablo 4-25: Aa varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi	128
Tablo 4-26: Kırmızı kompleks (Tf, Td, Pg) varlığının gruplara göre değerlendirilmesi	129
Tablo 4-27: Saf kültürde yapılan PCR incelemeleri sonuçları	130
Tablo: 4-28: Direk subgingival plak örneklerinde yapılan PCR incelemeleri	130

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Mikrobiyal kompleksler içindeki ve farklı komplekslerin aralarındaki ilişkinin diagramatik gösterimi (179).....	7
Şekil 2:Periodontal Hastalık Patogenezi (Greenstein G, Lamster I, Changing periodontal paradigms: therapeutic implications. I.J Periodontics Restorative Dent 2000;14:337-57)(73).	26
Şekil 3: Ekstraselüler matriks yıkım yolları.....	
Şekil 4 :Majör antibiyotiklerin etki mekanizması.....	49
Şekil 5: Araştırma Planı.....	74
Şekil 6:MMP-1 standart eğrisi-formülü	90
Şekil 7:TIMP-1 standart eğrisi-formülü	91
Şekil 8: Plak indeksi ölçümlerinin dağılımı.....	94
Şekil 9: Gingival indeks ölçümlerinin dağılımı.....	96
Şekil 10 :Sondalanabilir dep derinliği ölçümlerinin dağılımı.....	98
Şekil 11:Klinik ataşman seviyesi ölçümlerinin dağılımı.....	100
Şekil 12:Siyah pigmentli bakteri sayılarının dağılım grafiği.....	107
Şekil 13: TIMP-1 pg/vol düzeylerinin dağılım grafiği	112
Şekil 14: Total MMP-1(pg) düzeylerinin dağılım grafiği	114
Şekil 15: PCR analizleri sonrası Pi, Pn ve Pp saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı.....	118
Şekil 16: PCR analizleri sonrası Tf, Td ve Pg saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı.....	120
Şekil 17:PCR analizleri sonrası Aa saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı	121

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Aa: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*

Cr: *Campylobacter rectus*, *C. rectus*

Ec: *Eikenella corrodens*, *E. corrodens*

En: *Eubacterium nodatum*, *E. nodatum*

Fn: *Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*

Gİ: Gingival indeks

KAS: Klinik ataşman seviyesi

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

MMP : Matriks metalloproteinaz

Ort: Ortalama

PCR: Polymerase chain reaction

PI: Plak indeksi

Pm: *Parvimonas micra*, *P. micra*

Pg: *Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*

Pi: *Prevotella intermedia*, *P. intermedia*

Pn: *Prevotella nigrescense*, *P. nigrescense*

Pp: *Prevotella pallens*, *P. pallens*

SCD: Sondalanabilir cep derinliği

Ss: Standart sapma

TIMP: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

Td: *Treponema denticola*, *T. denticola*

Tf: *Tannerella forsythia*, *T. forsythia*

ÖZET

Yek, E. (2006). Generalize Agresif Periodontitisli Bireylerde Başlangıç Tedavisine Destek Olarak Kullanılan Sistemik Metronidazol-Amoksisilin Kombinasyonunun Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Parametreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasının amacı generalize agresif periodontitisli bireylerde periodontal başlangıç tedavisine destek olarak uygulanan sistemik metronidazol + amoksisilin kombinasyonu ile klinik iyileşmenin değerlendirilmesi, dişeti oluk sıvısı MMP-1 ve TIMP-1 seviyelerinde meydana gelecek olası değişimin incelenmesi, aynı zamanda bu hastalık grubunda etken patojenlerden olduğu düşünülen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* ve Pigmentli *Prevotella*'ların varlığının araştırılmasıdır.

Bu amaçla 28 agresif periodontitisli birey çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubuna yalnızca başlangıç tedavisi, test grubuna ise başlangıç tedavisi ile birlikte sistemik antibiyotik uygulaması yapılmıştır. klinik ölçümler dizideki tüm dişlerde yapılmıştır. Tedavi öncesi (başlangıçta) ve sonrası 3. ve 6. aylarda grupların plak indeksi (Pİ), gingival indeks (Gİ) sondalanabilir cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman düzeyi (KAD) ölçülmüştür. Başlangıçta klinik ölçümlerden 1 hafta sonra, 3. ve 6. aylarda ise hemen ölçümler öncesinde subgingival plak örnekleri ile birlikte dişeti oluk sıvısı örnekleri de toplanmıştır. Plak örnekleri önceden belirlenmiş olan en derin üç bölgeden havuz yöntemiyle, dişeti oluk sıvısı örnekleri ise en derin bölgeden toplanmıştır. Subgingival plak örnekleri öncelikle kültür yöntemiyle incelenmiş, total, fakültatif anaerop ve siyah pigmentli bakteri sayımları yapılmıştır. Kültür ortamında *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella intermedia* grubunun tanısı yapılmış, elde edilen saf kültürlerde PCR yöntemiyle *Prevotella intermedia* grubu bakterilerin tür ayrımı yapılmıştır. Daha sonra direk olarak subgingival plak örneklerinden yine PCR yöntemiyle diğer bakterilerle birlikte bu grup bakteriler de tekrar incelenmiştir. Dişeti oluk sıvısında ise MMP-1 ve TIMP-1 seviyeleri ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Çalışmanın bulgularına göre her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde klinik iyileşme tespit edilmiştir. Her iki grupta başlangıca göre 3. ve 6. aylarda sondalanabilir cep derinliğinde anlam düzeyde sığlaşma ve klinik ataşman düzeyinde anlamlı düzeyde artış görülmüştür. Dişeti oluk sıvısında her iki grupta da tedavi sonrası total MMP-1 seviyeleri anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). MMP-1 konsantrasyon değerleri ise test grubunda 3. ayda başlangıca göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). TIMP-1 konsantrasyon değerleri ise kontrol grubunda 6. ayda anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0,05$). Siyah pigmentli patojen sayısında her iki grupta da anlamlı azalma meydana

gelmiştir ($p<0,05$). Varlığı araştırılan tüm patojenler içinde *Tannerella forsythia* eradikasyonu sağlanan tek bakteridir.

Bu çalışma bulgularına göre gruplar arasında klinik ölçümlerde anlamlı fark bulunamamıştır. Siyah pigmentli bakteri sayısı her iki grupta anlamlı düzeyde azalmıştır. Benzer şekilde total MMP-1 her iki grupta anlamlı düzeyde azalmıştır. TIMP-1 total ve konsantrasyon değerlerindeki değişim gruplar arasında anlamlı fark ifade etmemiştir. Sonuç olarak sistemik metronidazol-amoksisilin kombinasyonu ile genearalize agresif periodontitisli bireylerde iyileşmenin klinik ve mikrobiyolojik parametrelerinde fark yaratılamamaktadır. Ancak, *Tannerella forsythia* gibi belirli patojenlerin baskın florayı oluşturduğu durumlarda yarar sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: metronidazol, amoksisilin, genearalize agresif periodontitis, periodontal patojenler, matriks metalloproteinazlar, doku inhibitörleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-657/17032005

ABSTRACT

Yek, E. (2006). The evaluation of systemic metronidazole-amoxicillin combined therapy on clinical, microbiological and biochemical parameters in patients with generalized aggressive periodontitis. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Periodontology. Doktora Tezi. İstanbul.

The purpose of this study was to evaluate the clinical healing by clinical indices, to quantify the amount of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors TIMP-1 expressed by human gingival crevicular fluid and assess the periodontal pathogens associated with generalized aggressive periodontitis such as *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Pigmented Prevotella's* when metronidazole-amoxicilline were administerede adjunctive to periodontal initial therapy.

The treatment of aggressive periodontitis has presented a challenge for clinicians. There are still no protocols for efficiently cotrolling this type of disease. By many researchs, contribution of systemic antibiotics are established for the treatment of patiens suffering from aggressive periodontitis. Among all these antibiotics, metronidazole-amoxicilline presents a good choice.

Two study groups and 28 generalized aggressive periodontitis patients were included into the study. As adjunct to scalig and root planing, patients were administered metronidazole and amoxicillin. Clinical data were recorded at all teeth present in dentition., plaque indice (PI), gingival indice (GI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) were measured before sampling at baseline and after sampling at 3rd and 6th months. Plaque samples were collected from three preselected teeth by pooling and gingival crevicular fluid samples from depest sites at baseline, 3 months and 6 months after treatment. At all time points gingival crevicular fluid samples were collected to evaluate the amounts of MMP-1 and TIMP-1. Subgingival plaque samples were analysed for quantitative data and detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Pigmented Prevotella's* by culture technique. Then Prevotella's and other pathogens were detected by PCR directly from subgingival samples.

No differences were observed between the two study groups at any time points for clinical datas. According to the findings, subjects in control and test groups displayed a great reduction from baseline in probing depths and clinical attachment levels. There was not any significant difference in the total amount of MMP-1 between groups. In the test group the concentration values of MMP- 1 was significantly reduced at 3rd month ($p<0.05$). TIMP-1 concentration values was significantly reduced in the control group. According to the microbiological findings, the black pigmented bacteria reduced

significantly in both of the groups ($p<0.05$). *Tannerella forsythia* was the only pathogen eradicated by the antibiotics used in our study.

According to our findings; there was no statistically significant difference for the clinical parameters between groups. Black pigmented bacteria were reduced significantly by both of the treatment strategies. Similarly total MMP-1 levels were reduced to similar levels in both of the groups. The data regarding TIMP-1 total and concentration levels show no significant difference between groups. In conclusion there can't be made any difference for the clinical and microbiological parameters of healing by using this antibiotic combination with generalized aggressive periodontitis. Besides, this combination may be useful for the eradication of specific pathogens as *Tannerella forsythia*.

Key Words: Metronidazole; amoxicillin, generalized aggressive periodontitis, periodontal pathogens, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-657/17032005

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontitisin en önemli klinik özellikleri klinik ataşman kaybı, alveol kemiği kaybı, periodontal cep formasyonu ve dişeti iltihabıdır. Tüm bu özelliklerle birlikte dişetinde çekilme veya büyüme, dişetinde provoke kanama, dişlerde hareketlilik ve/veya diş kayıpları görülebilir.

1999'da yapılan Uluslararası Periodontal Hastalıkların Sınıflaması Toplantısı'nda erken dönem periodontitisler agresif periodontitisler olarak, erişkin periodontitis terimi ise kronik periodontitis olarak değiştirilmiştir [8].

Agresif periodontitis hızlı seyreden ve ailesel geçiş gösteren bir grup periodontitisi içerir. Lokalize ve generalize olmak üzere iki tipi vardır.

Genel olarak olması beklenen, ancak evrensel olmayan klinik özellikleri şunlardır;

1-Mikrobiyal birikintiler hastalığın yıkım şiddetiyle uyumsuzdur.

2-Ataşman ve kemik kaybı kendiliğinden durabilir.

Genaralize agresif periodontitis (GAP);

- ✓ genellikle 30 yaş altı bireyleri etkiler, ancak bireyler daha yaşlı olabilir.
- ✓ birinci büyük azı ve kesiciler dışında en az üç sürekli diş etkilenmiş olmalıdır.

GAP' te tedavi amacı mikrobiyal etyolojik faktörlerle risk faktörlerinin elimine edilerek, hastalığın ilerlemesinin durdurulması ve tekrarlamasının engellenmesidir. Sistemik faktörler, immun bozukluklar ve mikrobiyal flora nedeniyle agresif periodontitis, periodontal hastalıklar içinde tedavisi ve kontrol altına alınması daha güç olan hastalık grubunu oluşturur (8).

Periodontal hastalıkların tedavisinde periodontal başlangıç tedavisinin vazgeçilmez bir yeri vardır. Özellikle iyi plak kontrolü sağlandığı durumlarda diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemleri ile başarılı sonuçlar elde edildiği ve elde edilen iyi halin uzun süreler korunabildiği bilinmektedir [152]. Ancak başarıyla uygulanmış tedaviye rağmen özellikle derin ceplerin bulunduğu

bölgelerde subgingival plağın kalabilmesi, mikroorganizmaların dentin tubulusları ve el aletleri ile yeteri kadar ulaşılamayan furkasyon bölgelerine yerleşmeleri, bazı patojenlerin yumuşak dokuya invaze olabilmeleri gibi nedenlerle her zaman istenilen yanıt alınamayabilir [2;59;29]. İşte bu durumlarda mekanik periodontal tedavinin çeşitli antimikrobiyallerle desteklenmesi gerekebilir. Periodontal hastalıkların karışık mikrobiyal etyolojiye sahip olduğu düşünüldüğünde ise; birden fazla antibiyotik birlikte kullanılarak spektrum genişletilmeye çalışılmıştır. Bu antibiyotik kombinasyonlarından özellikle metronidazol-amoksisilin kıymetli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Pek çok araştırma periodontal tedaviye destek olarak metronidazol+amoksisilin kullanımının oldukça iyi sonuçlar vaat ettiğine dair veri sunmaktadır [149;211;212;223]. Bu kombinasyonun özellikle lokalize agresif periodontitis ve mikrofloralarında Aa'nın dominant olduğu bireylerde oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir [211;212].

Kollajen yıkımı inflamasyon, doku yıkımı, remodeling, yara iyileşmesi veya doku tamiri esnasında gerçekleşir. Bu işlem iki yolla gerçekleşebilir. 1-intraselüler yol, 2-ekstraselüler yol. Patolojik olmayan durumlarda dişeti ve periodontal ligaman gibi yumuşak ve dinamik yapıya sahip bağ dokularında oldukça yüksek düzeylerde fagositoz ve kollajen fibril yıkımı gerçekleşir. Patolojik olaylarda ise sentez ve yıkım arasındaki denge bozulur. Gingivitisin erken dönemlerinde dahi dişetinde bulunan kollajen fibrillerin çoğu bölgeye infiltrat olmak isteyen inflamatuvar hücrelere yer sağlamak amacıyla yıkıma uğrar. Bu süreç dişetin pembe ve sıkı görünümünün kaybolup parlak ve bütünlüğü kaybolmuş bir görünüm kazanmasına yol açar. Bu durum kronikleştikçe periodontitise dönüşüm gerçekleşip periodontal ligaman çevre destek dokularla birlikte kaybedilebilir. Bu patolojik durumda kollajen genelde metallo-proteinazlarla ilişkili olan ekstraselüler yolla yıkıma uğrar. İnterstisyel kollajenaz (MMP-1) bu enzimler arasında en iyi bilinenlerdendir [3;86]. MMP-1 karakteristik N-terminal ve C-terminal fragmanları üreterek tip I ve III kollajeni yıkıma uğratır. MMP'lerin doku inhibitörleri olan TIMP'ler ise matriks yıkımını regüle ederler. Bu regülasyon proteinaz inhibisyonu ya da MMP aktivasyonunun blokajıyla gerçekleşir. TIMP-1 ve TIMP-2'nin farklı MMP'leri kontrol altında tutarlar. TIMP-1 MMP-1'i çok daha etkin şekilde inhibe eder [126].

Bu tez çalışmasının amacı generalize agresif periodontitisli bireylerde periodontal başlangıç tedavisine destek olarak uygulanan sistemik metronidazol + amoksisilin kombinasyonu ile dişeti oluk sıvısı MMP-1 ve TIMP-1 seviyelerinde meydana gelecek olası değişimin incelenmesi, aynı zamanda bu hastalık grubunda etken patojenlerden olduğu düşünülen *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* ve Pigmentli *Prevotella*'ların varlıklarının ve tedaviye bağlı olarak 3. ve 6. aylarda grupların subgingival mikrofloralarında meydana gelen total, fakültatif anaerop ve siyah pigmentli bakteri sayılarındaki değişimin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Periodontitis

Periodontitisin en önemli klinik özellikleri klinik ataşman kaybı (KAK), alveol kemiği kaybı (AKK), periodontal cep formasyonu ve dişeti iltihabıdır. Tüm bu özelliklerle birlikte dişetinde çekilme veya büyüme, dişetinde provoke kanama, dişlerde hareketlilik ve/veya diş kayıpları görülebilir. Belirli birkaç istisnai durum dışında pek çok periodontitis tipi sürekli ilerleyen veya zaman zaman aktivite artışı gösteren kronik bir iltihap olarak kabul edilir.

Periodontitisin histopatolojik özellikleri ise bağlantı epitelinin mine-ament sınırının apikaline gerilemesi, cep epiteline komşu kollajen fibrillerin kaybı; kemik yıkımı; bağlantı epiteli ve cep epitelinde polimorfonüveli lökositlerin varlığı ve sayıca artışı ve plazma hücreleri, lenfosit ve makrofajlardan zengin iltihapsal infiltrat olarak sıralanabilir.

Günümüzde periodontal hastalık etyolojisinde bakteriyel enfeksiyonun primer rol oynadığı kabul edilmektedir. Pek çok bakteri türünün bir biofilm içinde diş yüzeyinde konakladığı ve bakteri plağı olarak ifade edilen bu yapının periodontitisle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bakteri türleri: *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *T.forsythia*, spiroketler, *C.rectus*, *E.nodatum*, *T.denticola*, *P.nigrescens*, *P.micra*, *F.nucleatum*, ve *E.corrodens* tir. Çeşitli putatif periodontal patojen komplekslerinin duyarlı bir konakta periodontal hastalık başlatıp, hastalık seyrini ağırlaştırdığı bilinmektedir [56].

Periodontal hastalıklar içinde agresif periodontitis tedavisi ve kontrol altına alınması daha güç olan periodontitis tipidir. Lokalize ve generalize olmak üzere iki tipi vardır. Generalize agresif periodontitisin klinik teşhisinde birinci büyük azı ve kesici dişler dışında en az üç sürekli dişin etkilenmiş olması koşulu aranır. Ataşman kaybı episodlar halinde ilerler. Hastalık periodontal patojenlerden özellikle *A.actinomycetemcomitans* ve *P.gingivalis* ile ilişkilidir. Ayrıca nötrofil fonksiyon bozuklukları da olabilir. Genellikle enfeksiyon ajanına karşı zayıf serum

antikor yanıtı oluşur [8]. Kronik periodontitisten farklı olarak agresif periodontitis tedavisinin özellikle çeşitli antimikrobiyallerle desteklenmesinden gerekmektedir.

Koch'un Postulatları'nın Socransky ve ark. tarafından periodontal hastalığa modifiye edilmiş hali şu şekildedir :

- Hedef bakterinin çoğunluğu periodontitisle ilişkili olmalıdır.
- Hedef bakterinin eliminasyonu ile hastalığın ilerleyişi durdurabilmelidir.
- Hedef bakteriye karşı belirgin konak yanıtı tanımlanabilmelidir.
- Eğer mümkünse bakterinin patojenitesi hayvan modelleri ile ortaya konulabilmelidir.
- Benzer patojenite mekanizmaları gösterilmelidir [177;178].

Bu kriterlere dayalı olarak pek çok periodontopatojen bakteri belirlenmiş ve daha detaylı olarak çalışılmıştır [45;80;179;181].

Periodontopatojenlerin belirlenmesini hedefleyen ilk çalışmalarda sağlıklı, gingivitisli ve periodontitisli bölgelerden alınan subgingival plak örneklerindeki mikrobiyal kompozisyonlar karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte subgingival plak örneklerinde varlığı saptanan bakterilerin periodontopatojenler mi yoksa çeşitli periodontitis tipleri için indikatör mü oldukları henüz tam olarak belirginlik kazanmamıştır.

Periodontal Hastalık Etiyolojisinde Mikrobiyal Faktörlerin Rolü

İnsanlarda ağız boşluğunda 700'ün üzerinde bakteri türü tespit edilmiştir. Bu türlerin 400'den fazlası periodontal cep içinde bulunur [132]. Cep içinde yaşayan bakterilerin bir kısmı periodontal sağlık, bir kısmı gingivitis, bir kısmı ise periodontitisle ilişkilidir (Tablo 2-2). Daha fazla klinik örnek incelendikçe ve de bakteri izolasyon ve tanı yöntemleri geliştikçe bu sayı artacaktır. Bu bakteri türlerinin bir kısmı yalnızca belirli zamanlarda insan ağız florasında bulunur, ancak çoğunluğu bakteri plağının daimi üyeleridir. Bunlar diş yüzeyi, dişeti epiteli ve oral epitel tarafından sağlanan ortamın aşamalı olarak gelişip ekolojik bir ortama dönüşmesini sağlarlar. Yüksek düzeyde damarlanmaya sahip dişeti bağ

dokusu ve periodontal ligamente oldukça yakın yaşamalarına rağmen bu türler içerisinde yalnızca birkaçı sağlıklı bireylerde sistemik enfeksiyona yol açar. Bu durum konağın doğal bağışıklık sistemlerinin sürekli olarak bakteriyel kolonizasyonu izlemesi ve lokal dokular içine bakteri girişine izin vermemesine bağlanabilir.

Dental plak bakterileri ve konak doğal savunma sistemleri arasında sürekli değişen bir denge vardır. Konak sahip olduğu doğal ve kazanılmış immun yanıtlar ile bakteriyel çoğalmayı kontrol altında tutmaya çalışırken, plak bakterileri de hayatta kalabilmek için sürekli yeni stratejiler geliştirir. Burada planlı ve hazırlıklı bir etkileşim olmamakla birlikte bakteri ve plak arasında gelişmiş bir etkileşim olarak düşünülebilir. Bakteriler konağın yabancı madde olarak tanımladığı ve karşılık verdiği antijenler salarlar. Plak bakterileri kendi lokal çevrelerini sürekli olarak geliştirecek adaptasyon kabiliyetine sahiptirler. Klinik olarak sağlık durumunda bu bakteriler konağın sürekli etkin bir savunma sürdürmesi için telkinde bulunurlar. Bazı daha enfeksiyöz bakterilerin de sahneye çıktığı veya konağın daha az etkin bir savunma yaptığı belirli durumlarda ise yıkıcı inflamasyon başlayabilir. Konağın hayati tehlikeye yolaçacak düzeyde bir bakteriyel enfeksiyona maruz kalmaması için ilerlemiş inflamasyon varlığında mevcut lokal enfeksiyonu uzaklaştırmak amacıyla diş kayıpları meydana gelir.

Günümüzde plak biofilminin oluşumundaki dinamik zincirlerin şu şekilde geliştiği bilinmektedir:

Planktonik hücreler mine üzerindeki pelikül tabakasına bağlanırlar; gram-pozitif koklar.

Tek hücreler sayısal olarak çoğalır ve diş yüzeyine yayılır; ilk yerleşen hücreler. Bu aşamada streptokoklar deneysel gingivitisin oluşumundan bir gün sonra ortamda görülebilir.

Tek hücreler birbirleriyle otoagregasyon veya diğer planktonik hücrelerle koagregasyon oluştururlar.

Bu popülasyonlar bir topluluk veya biofilm halinde büyürler: ilk başarılı oluşum.

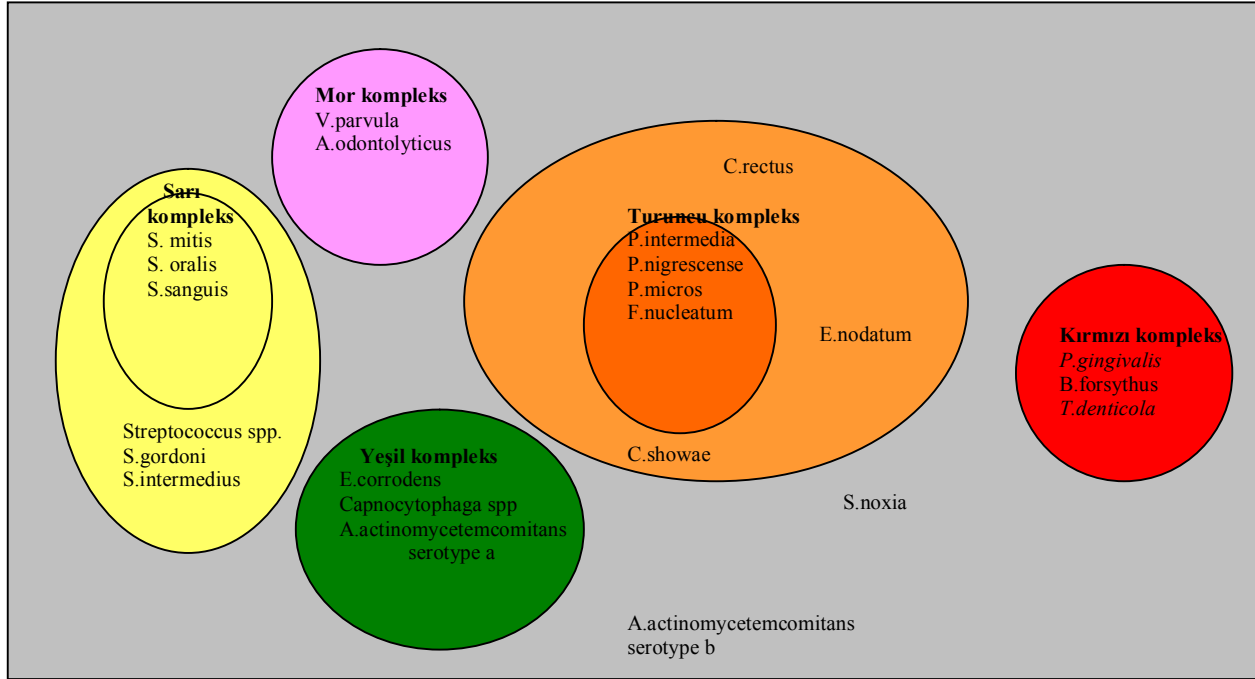
Altta kalan topluluklarda mikroçevreler aerobik/kapnofilikten, fakültatif anaerobik ortama değişmeye başlar.

Ekolojik ortam değişir ve topluluk yeniden organize olur. Bu aşamada deneysel gingivitisin oluşumundan üç gün sonra flament yapısı gözlenir.

Alt katmanlardaki toplulukların oluşturduğu mikroçevreler fakültatiftan zorunlu anaeroba dönüşür.

Daha geniş bakteri türünü ihtiva eden ve artık durağanlaşmış olan bir topluluk kurulur. Bu aşamada deneysel gingivitis gelişiminin yedinci gününde spiroketler ve hareketli mikroorganizmalar gözlenir.

Subgingival Plak İçinde Mikrobiyal Birliktelikler



Şekil 1: Mikrobiyal kompleksler içindeki ve farklı komplekslerin aralarındaki ilişkinin diagramatik gösterimi [181]

Socransky ve ark. tarafından 1998'de gerçekleştirilen çalışmada 13 000'den fazla subgingival plak örneği içinde 40 subgingival mikroorganizma checkerboard DNA-DNA hibridizasyon tekniği kullanılarak periodontal mikroorganizmaların

oluşturdukları komplekslerin (Şekil 1) belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Farklı komplekslerin mikroorganizma içeriğinin mikroorganizmaların birarada bulunma sıklığıyla ilişkili olduğu fikrinden yola çıkılmıştır. Subgingival plağın erken dönem yerleşenleri komplekslerden bağımsız ya da sarı veya mor kompleksler içinde bulunmuştur. Plak içinde ikincil olarak yerleşen mikroorganizmalar ise yeşil, turuncu veya kırmızı kompleksler içinde yer almıştır [181]. Bu kompleksler içinde turuncu kompleks *P. intermedia*, *P. nigrescense*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *C. showae*'yi içerir. Turuncu kompleks periodontal hastalığın erken dönemlerinde görülen patojenlerle kırmızı kompleks patojenleri arasında köprü vazifesi görür. Kırmızı kompleks ise periodontal hastalığın klinik değişkenleriyle olan yakın ilişkisi dolayısıyla mikrobiyolojik çalışmalarda özel bir alan bulmuştur.

2.3.1. Kırmızı kompleks patojenleri

Biofilm gelişim süreci içinde daha geç zamanda yerleşim gösteren kırmızı kompleks *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) ve *Treponema denticola*'yı (*T. denticola*) içerir [181].

Bakteri virulansı: Bir bakterinin virulansından bahsedebilmek için yalnızca mikrobun kendi toksik özellikleri yeterli olmaz, aynı zamanda duyarlı bir konak ve ikisi arasında etkileşim gerçekleşmesi gerekir. Bir bakterinin sahip olduğu virulans faktörleri şu özellikleri gösterilebilir:

- Mikrop-konak arasında etkileşimin başlatılması
- Konak dokularına invaze olabilme
- Konak hücresi içinde çoğalabilme
- Konak savunma sistemleriyle mücadele edebilme

Yaklaşık 20-25 yıl içinde çeşitli çalışma gruplarının yaptıkları araştırmalar sonucunda bir grup gram pozitif bakteri türünün periodontal sağlığın devamı için gerekli olduğu, pek çok gram negatif anaerob türün de gingivitis ve periodontitis gelişimiyle ilişkili olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Artık açıkça bilinmektedir ki

sağlıklı bir oral floradan gingivitis ve periodontitise geçiş için belirli bakteri komplekslerine ihtiyaç vardır. Oral florada bu kompleksler içinde periodontal hastalığın ilerlemesinde en önemli birliktelik kırmızı komplekstir. Bu kompleks patojenlerden *P. gingivalis* ile *T. forsythia* generalize agresif periodontitisle daha fazla ilişkilendirilmiştir [228]. Bu bakterilerin, periodontal hastalığın artan klinik parametreleriyle prevalans ve sayıca arttığı bilinmektedir.

P. gingivalis, *T. forsythia* ve *T. denticola* plak örneklerinde genellikle periodontal cebin epitel duvarına komşu ve birarada bulunurlar. *P. gingivalis*, *T. denticola*'nın besin birlikteliğinden yararlanır. Her iki bakteri kendilerini periodontal doku yıkımının asıl üyeleri yapacak çeşitli özelliklere sahiptir:

- Periodontal yıkım göstergeleriyle birlikte ortaya çıkarlar.
- Gelişen biofilimde topolojik olarak birbirleriyle yakından ilişkili görülürler.
- In vitro çalışmalar dış membran proteinazları (arginin ve lizin spesifik sistein proteazları, kimotripsin benzeri serin proteazı) üretme yeteneğine sahiptirler.

T. forsythia ilk kez Tanner tarafından 1986'da tanımlanmıştır [194]. Gmür ve ark. *T. forsythia* ile *P. gingivalis* arasında kuvvetli ilişki saptamışlardır. *P. gingivalis* farklı periodontal cep bölgelerinden elde edilen plak örneklerinin hiçbirinde Tf yokluğunda gözlenmemiştir [63].

2.3.1.1. Porphyromonas gingivalis:

P. gingivalis küçük, gram negatif, siyah pigmentli periodontal patojendir [40]. *P. gingivalis*'nin patojenitesi ilk olarak oral dokulara bağlanmasıyla başlar. Bakterinin bu bağlantıyı oluşturmada kullandığı çeşitli yapıları vardır: fimbrialar, proteazlar, hemaglutininler, lipopolisakkarid. Bakteri olgun biofilm yapılarında *P. intermedia* ile koagregasyon göstererek potansiyel etkileşime girer. *F. nucleatum* koagregasyonu ile birlikte *P. gingivalis* ve *T. forsythia* kolonizasyonu kolaylaşır.

Bakteri-konak etkileşimi: sağlıklı bir diş yüzeyi biofilm oluşturan bakterilerle karşılaştığında anatomik olarak öncelikle diş yüzeyine bağlanır ve dişeti oluğuna uzanır. Dişeti oluğunun tabanında doğrudan diş yüzeyine bağlanan keratinize olamayan bağlantı epitelini oluşturur. Bağlantı epiteli geçirgen bir yapıya sahiptir ve *P. gingivalis*'in invazyonuna açıktır. Bu nedenle bağlantı epiteli hücreleri

bakteri ve ürünlerine açıktır. *P. gingivalis* dişeti epiteli hücrelerinde saptanmıştır. Bakteri ile konak arasındaki başlangıç etkileşim fibrinojen, histatin ve fibronektini içeren çeşitli konak proteinlerinin varlığında gerçekleşir. Ayrıca Yılmaz ve ark. epitel hücrelerinde bulunan $\beta 1$ integrinlerinin bakterinin yüzeye bağlanmasında reseptör rolü oynadığını göstermişlerdir [230].

Tripsin-benzeri proteazlar olarakta bilinen gingipainler aslında bir grup serin proteazları içerirler. Bu proteazlar bakterinin gösterdiği proteolitik etkinin %85'ini oluştururlar. Interlökin-6 (IL-6) kemik-rezorbe edici ajanların varlığında osteoblastlar tarafından salgılanan bir sitokindir. Aynı sitokin hüce kültür sistemlerinde osteoklast oluşumunu da indükler. Oral epitel hücrelerinin *P. gingivalis* ile karşılaşmaları IL-6 salgılanmasını uyarır. Bakteri ayrıca periferik kan mononükleer hücrelerden monosit kemotaksis protein-1 (MCP-1) ve interlökin-8 (IL-8) salgılanmasını etkiler. Bakteri ayrıca endotel hücrelerinden salgılanan MCP-1 ve IL-8' in yıkımına yolaçar. *P.gingivalis* proteinazlarının periodontal bağ dokusunun majör komponentlerinden tip I ve tip IV kollajeni, ayrıca ekstraselüler matriks proteinlerini yıktığı gösterilmiştir.

P. gingivalis konak hücrelerinden fibroblastlar lökositler ve makrofajlar tarafından salgılanan ve ekstraselüler matriks makromoleküllerinden kollajen, fibronektin ve laminini yıkma yeteneğine sahip olan pek çok matriks metalloproteinaz (MMP)'in ortaya çıkışını sağlar. Bu enzimlerin doku inhibitörleri (TIMP) ise ileride daha ayrıntılı şekilde bahsedileceği gibi MMP'lerin aktif bölgelerine kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar ve bağ dokusunun hücresiz matriksinin yıkımı ve yeniden yapımı arasında denge unsuru olurlar. MMP'ler gelişen periodontal cep içine bakteri girişine yanıt olarak üretilirler. Artan bakteri sayısı ve bunların metabolik son ürünlerine karşı kontrol dışı bir doku yanıtı gelişir ve inflamasyon artar. *P. gingivalis* in periodontitis gelişim aşamasında TIMP-1'i etkisiz hale getirdiği ve tip I kollajenin yıkımında rol aldığı gösterilmiştir. Bakteri ayrıca MMP-2 ve MMP-9 üretimini de indükler.

2.3.1.2. *Treponema denticola*

İlk kez van Leeuwenhoek tarafından 350 yıl önce gözlenen zorunlu anaerob bakteridir [193]. Td'nin dış membran zarı fonksiyonel olarak lipopolisakkaridlere, kimyasal olarak ise diğer gram pozitif lipoteikoikasidlerine benzer. Diğer oral

bakterilerden özellikle *F. nucleatum* ve *P. gingivalis*'le etkileşir. Bu koagregasyon periodontal yıkımın ilerlemesinde önemlidir. Oral spiroketler pek çok kollajen-binding proteini eksprese eder. Li ve ark. *T. denticola*'nın sahip olduğu bu proteinlerle tip I, IV ve V kollajene bağlandığını, bu şekilde de mikroorganizmanın bağlanması ve kolonizasyonunda rol aldığını göstermiştir [108]. Gram negatif bakterilerin sahip olduğu en büyük sitotoksik molekül lipopolisakkariddir (LPS). LPS iltihapsal sitokinlerin salgılanması yoluyla periodontal hastalığın ilerlemesine yol açar. *T. denticola*'nın sahip olduğu majör membran proteini ve kimotripsin-benzeri proteaz kompleksi konak hücrelerinin metabolik inhibisyonuna neden olur. *T. denticola* konak savunma sistemlerinden kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Bakteri immunosupresif protein üretir ve lenfosit proliferasyonunu azaltır. Bu etki geri dönüşümsüz bir yolla gerçekleşir ve bu hücrelerde apoptotik yolu aktive eder.

2.3.1.3. *Tannerella forsythia*

Socransky ve ark. tarafından tanımlanan kırmızı kompleksin [181] üçüncü üyesi olan *T. forsythia* [197] ilk kez Tanner tarafından tanımlanmıştır. Tanner ve ark. bakteriyi gram negatif anaerobik fusiform özellikleriyle *B. forsythus* olarak tanımlamışlardır [194]. Bakteri aktif periodontitisli bölgelerden *P. gingivalis* ile birlikte izole edilmiştir. Erişkinlerde ve çocuklarda subgingival plak örneklerinden, tükürük örneklerinden izole edilmiştir. Tf periodontal doku yıkımıyla ilişkili olan enzimatik peptidaz aktivitesine sahiptir. Asakkarolitik bir mikroorganizma olmakla birlikte in vitro ortamda çeşitli glikozidazlar ürettiği gösterilmiştir. *T. forsythia* dişeti fibroblastlarından IL-6 ve TNF- α (tumor necrosis factor- α) üretimini artıran lipoproteinler üretir. Bakteri ile ilgili çalışmalarda kardiovasküler hastalıklar gibi çeşitli sistemik hastalıkların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [159]. *T. forsythia* *P. gingivalis* ile birlikte periodontal cep içine invaze olur. Bu iki tür konak beyaz kan hücreleri tarafından saldırıya uğrar. Apoptotik aktivite konak savunma hücrelerini baskılar, cep içinde bu savunma hücrelerinin eliminasyonu bakteri kolonizasyonunu artırarak hastalığın hızla ilerlemesine yol açar.

Mikrobiyal tanı yöntemleri

Periodontal hastalıkların etyolojisiyle ilgili çalışmalarla birlikte mikroorganizmaların hastalığın etyolojisindeki yerleri de netlik kazanmaya başlamıştır. Bu aşamada subgingival plak içinde mikroorganizmalar saptanmaya çalışılmış, bununla ilgili ilk çalışmalar ise ışık mikroskobuyla yapılmıştır. Ancak tekil türlerin tanımlanmasında oldukça sınırlı kalmıştır. Bu dönemde dokuz morfortip doğru şekilde tespit edilirken oral biofilm örnekleri içindeki 500 kadar tür [132] saptanamadan varlığını sürdürmeye devam etmiştir. Işık mikroskobu çalışmaları özellikle spiroketleri de içeren hareketli türlerin eradikasyonunun tedavinin başarısında rehber kabul edildiği bir dönemde bir süre etkinliğini korumuştur. Elektron mikroskobunun geliştirilmesiyle birlikte daha fazla çözülmeye sahip plak örnekleri çalışılabilmiştir. Özellikle immunohistokimyasal tekniklerle kombine çalışıldığında bakteri hücrelerinin yerleşimiyle ilgili bilgi vermiştir. Ancak bu yöntemler yalnızca kısıtlı miktarda plak örneğinde ve oldukça az miktarda türün çalışılmasına olanak sağlayabilmiştir.

Kültür yöntemi uzun yıllar boyunca plak bakterilerinin tayininde kullanılan bir yöntem olmuştur. Ancak kültür yöntemi pek çok avantajının yanında kısmen daha uzun zamanda sonuç vermesi ve pahalı olması gibi dezavantajlara da sahiptir. Sonuç olarak ise az sayıda bireyden elde edilen az miktarda plak örneği çalışılabilmiştir. Yine de kültür yöntemi kullanılarak 1970 ve 1980’lerde yapılan çalışmalarda periodontal hastalığı başlatıp ilerlemesine neden olan pek çok tür ortaya konmuştur. Yöntemin en güçlü yönü bakteri türlerinin pek çoğunun kültür ortamında yetiştirilip saptanabilmesidir. Ancak kültüre edilemeyen spiroket gibi türler bu yöntemle saptanamaz. Diğer bazı türler ise özel şartlar gerektirir (örneğin *Tannerella forsythia*). Günümüzde bu yöntem özellikle saf kültürlerin gerektiği durumlarda kullanılmaktadır. Işık mikroskobu, elektron mikroskobu ve kültür yöntemlerinin yerini zaman içinde daha hızlı teknikler almıştır. Bunlardan antikora-dayalı yöntemler ve ELISA ile daha fazla plak örneğinde ancak yine kısıtlı sayıda tür çalışılmıştır. Bu yöntemler kültür yöntemine göre daha hızlı ve daha ucuz olmaları gibi üstünlüklere sahiptir. Ancak her yeni türe özgü antikorların geliştirilmesi gerekir.

Son 10 yıl içinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) subgingival plak örnekleri içinde bakteri türlerinin saptanmasında kullanılmıştır. Hızlı ve kolay bir yöntem olmasının yanısıra az sayıdaki hücreyi de saptayabilme özelliğine sahiptir. Yöntemin en önemli dezavantajı kantitatif veri sağlayamamasıdır. Plak örneği içinde mikroorganizma varlığını veya yokluğunu belirten bir yöntemdir. Belirli uygulamalar için oldukça elverişli olmakla birlikte bakteri seviyelerine ihtiyaç duyulan uygulamalar için uygun değildir. Real-time PCR biofilm örneklerinin incelenmesinde kullanılan yöntemlere eklenmiştir. Bu yöntem spesifik, sensitif (hassas) ve kantitatif veri sağlayabilme özelliklerine sahiptir. Ancak geleneksel PCR’da olduğu gibi yine geniş örneklerin çalışılmasına uygun değildir.

DNA proplar dental biofilm gibi karmaşık topluluklar içinde yaşayan bakteri türlerinin tanımlanmasında ve numaralandırılmasında kullanılan bir başka yaklaşımdır. Bu propların spesifitesi yüksek olup, çapraz reaksiyon olasılığı düşüktür. Oligonükleotid proplar tam genomik proplara göre daha az sensitiviteye sahiptir. Tam genomik proplarda bakteri türünün tüm genomu kullanılır, bu durum ilişkili türler arasında çapraz reaksiyon olasılığını artırır.

Checkerboard DNA-DNA hibridizasyon tekniği kompleks mikroorganizmalar içeren geniş plak örneklerinde birden fazla türün çalışılmasında oldukça uygun bir yöntemdir. Checkerboard tekniği hızlı, sensitif ve kısmen daha ucuzdur. Kültür yönteminde yaşanan kısıtlamalar bu teknik ile aşılmış olur. Ancak bu yöntemle de yalnızca DNA probu hazırlanmış olan türler çalışılabilir. Teknik 10^4 hücreyi saptayabilecek sensitiviteye sahiptir, ancak hibridizasyon şartları değiştirildiği durumda bu sayı 10^3 ’e kadar inebilmektedir [180].

Yukarıda sayılan tüm bu yöntemlerin birbirlerine olan üstünlükleri aşağıdaki tabloda karşılaştırılmıştır (Tablo 2-1).

Tablo 2-1 Plak örneklerinde mikrobiyal içeriğin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması:

Yöntem	Güçlü yanı	Zayıf yanı	Uygulama sahası
Kültür	Tanımlanmamış türleri saptayabilir; ileri analizler için saf kültür sunar	Uzun zaman gerektirir ve pahalıdır; türler her zaman kültüre edilemeyebilir	Yeni ekosistem çalışmaları
Seçici kültür	Ortalama miktarda tür ve plak örneği için uygun	Genellikle ya çok seçici ya da yeteri kadar seçici değil	Ortalama plak örneği için 1-10 türü içeren çalışmalar
İmmunofluoresans	Spesifite; makul düzeyde hızlı	Sınırlı sayıda yararlı antisera; az sayıda örnek çalışılabilir	Diagnostik çalışmalarda daha yararlı olabilir
PCR	Sensitivite; spesifite	Kantitatif veri sunmaz; pahalı, amplifikasyona bağlı	Bir bireydeki türlerin tayini(prevalans); tedavi sonrası düşük sayıdaki türlerin saptanması

Real-time PCR	Sensitivite; spesifite; kantitatif	Kıyasla yavaş; pahalı; çalışılabilecek örnek ve tür sayısı sınırlı	Az-orta sayıda plak örneğinde sınırlı sayıda türle ilgili kantitatif veri gereken çalışmalar
DNA-DNA hibridizasyon	Sensitivite; spesifite; kantitatif	Probları mevcut olan türlerle sınırlı; ortalama sayıda plak ve tür çalışılabilir	Ortalama miktarda örnekte türlerin spesifik gruplarında
Checkerboard DNA-DNA hibridizasyon	Sensitivite;spesifite;kantitatif;tüm örneği kullanabilir;geniş örnek ve tür sayıları;pahalı değil	Probları mevcut türlerde kullanılabilir; çapraz reaksiyon ihtimali	Geniş plak ve tür içeren çalışmalar, akoloji ve tedavi çalışmaları
16SrDNA amplifikasyon klonlama	Kültüre edilebilen ve edilemeyen türlerin saptanması; filogenetik sınıflama	Aşırı pahalı; çok az sayıda örnekle çalışılabilir	Spesifik habitatta bulunan türlerin araştırılması

Socransky SS, Haffajee AD. Perio 2000 2005:38:135-187'den alınmıştır [180].

Biofilm

Dental plak bir mikrobiyal biofilmdir [116;166;221]. Biofilmler birbirlerine ve/veya yüzeylere yapışık ve matriksle çevrelenmiş bakteri popülasyonları olarak tanımlanırlar [33]. Biofilmler içerdiği bakteri topluluklarının bir bütün olarak korunduğu ve yaşamlarının devam ettirildiği ekolojik bir topluluk olarak kabul edilir.

Dişeti kenarının üzerinde oluşan plak tabakası supragingival plak, altında oluşan plak tabakası ise subgingival plak olarak tanımlanır. Supragingival plağın aksine subgingival plak daha iyi korunan bir yerleşime sahiptir ve tükürük ve ağız içi abrazyon gibi savunma bariyerlerine maruz kalmaz. Subgingival plağın gelişimini sınırlayan en önemli etkenler plağın yerleştiği fiziksel boşluğun darlığı ve konağın doğal bağışık yanıtıdır. Dişeti oluk sıvısı subgingival flora için zengin bir besin kaynağıdır [162]. Periodontal olarak sağlıklı bireylerde subgingival aralık, bakterilerin çoğalmasına sınırlı düzeyde olanak tanır. Subgingival plak birikiminin sonuçlarından biri de epitelyal hücre atışmanı seviyesinin azalması ve cep derinliğinin artması yoluyla subgingival aralığın sürekli artışıdır. Dişeti oluk sıvısı zengin besin içeriğine sahip olmakla birlikte bir dizi antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir. Bu sıvı serum ile benzerlik gösterir ve bakteriyemi ve sistemik infeksiyonu önleyecek doğal ve kazanılmış savunma sistemlerine sahiptir. Doğal bağışıklık sistemi komponentleri lizozimler, kompleman ve bradikinin, trombin ve fibrinojen gibi vasküler permeabiliteyi artıran maddelerden oluşur. Kazanılmış bağışıklık komponentleri ise antikorlar ve lenfositlerdir. Polimorfo nüveli lökositlerin bakteriyel çoğalmayı engellemedeki rolü oldukça önemlidir. Lökositlerin damar dışına çıkıp dişeti dokusuna ulaşmalarında ve potansiyel patojenler ile bunların toksik maddelerini kontrol altına almalarını sağlamada düşük seviyelerde E-selektin ve ICAM (intracellular adhesion molecule) ekspresyonu de gereklidir [52]. Ayrıca MCP-1 (monocyte chemotaxis protein-1) ve IL-8 (interleukin-8)'e sağlıklı bireylerde yine düşük seviyelerde rastlanmıştır. IL-8 bakteri-epitelyal doku etkileşiminin yakın olduğu bölgelerde daha yüksekken, derin periodontal dokularda daha az bulunmuştur. Bu iltihapsal medyatörlerin

sağlıklı dokularda düşük seviyelerdeki ekspresyonu dişeti dokusunun etkili bir doğal bağışıklık sistemine sahip olduğunu gösterir.

Dental plağın bakteri kompozisyonu yıkıcı iltihapsal yanıtı açabilir. Sağlıktan hastalığa geçişte bakteri ve salınan bakteri materyalindeki değişim konak yanıtını da değiştirir. Gingivitisle ilişkili mikrobiyal kompozisyon lokal iltihapsal doku yanıtıyla sonuçlanan materyalleri salgılar. Bu bakteri türlerinin periodontal ataşman kaybı ve cep formasyonuna yol açacak doku irritasyonuna sebep olmamalarına şu şekilde açıklama getirilebilir. 1- kolonizasyon seviyesinin düşük olması, 2-türlerin periodontal patojenler kadar yüksek virülansa sahip olmamaları, 3-konağın etkin bir savunma sergilemesi.

Sağlıklı periodontal dokuların veya gingivitisin aksine periodontitiste konak yıkıcı iltihapsal bir yanıt geliştirir. Günümüzde bu yıkıcı iltihapsal yanıtın nasıl başlayıp devam ettiğine dair kesin bir açıklama getirilememektedir. Bununla birlikte genel görüş periodontitisle ilişkilendirilen bakterilerin diğer türlere göre daha fazla kemik yıkım potansiyeline sahip olmaları şeklindedir. Loomer ve ark. tarafından yapılan in vitro çalışmaya göre osteogenezis periodontal patojenler tarafından inhibe edilirken, patojen olmayan bakteriler böyle bir etkiye neden olmamıştır [112].

Porphyromonas gingivalis (Pg) ve *Acinobacillus actinomycetemcomitans*(Aa) bir seri virulan faktör salgılama yeteneğine sahiptir. Pg farklı olarak ekstraselüler proteazlar salgılar. Bunlardan biri olan arginin-spesifik sistein proteaz damarsal permeabilite artışına yol açarak oluk sıvısı akışını artırır. Sıvı artışı ise subgingival mikrobiyal topluluk için besin demektir.

Yapılan çalışmalarda Aa'nın ve Pg'nin dişeti epitel hücrelerine bakteriyel invazyonu gösterilmiştir. Bakteri hücrelerinin konak hücrelerine invazyonu konak ve bakteri arasındaki uzun süreli bir adaptasyon sürecini gösterir. Gerçekleşen invazyon ile bakteri tıpkı biofilm gibi kendini konağın doğal bağışıklık sistemlerinden koruyacak bir başka eminiyetli bölgeye geçmiş olur. A. actinomycetemcomitans ve P. gingivalis barındıran epitel hücreleri mekanik tedavi sonrası re-infeksiyon için uygun ortam oluşturur. A. actinomycetemcomitans'nın konağa invazyonu hücreden hücreye geçişi kolaylaştırarak bakterinin hızla çoğalmasını sağlar, bu şekilde de yaygın doku yıkımı gerçekleşir.

Periodontal Hastalık İle Subgingival Biofilm İçeriği İlişkisi

100 yıldan fazla süredir yapılan çalışmalar hep periodontal açıdan sağlıklı bireylerle periodontitisli bireylerin farklı periodontal mikrofloraya sahip oldukları noktasında buluşmuştur. Bu sonuca ilk olarak ışık mikroskopuyla yapılan çalışmalarla ulaşılmış [110], daha sonra kültür mikrobiyolojisi, elektron mikroskobu, antikora-dayalı teknikler ve moleküler tekniklerle de desteklenmiştir. Bundan 50 yıl önce Ted Rosebury herkesin aynı türlere mi sahip olduğu ya da farkın yalnızca bakteri sayılarıyla mı alakalı olduğu konusundaki çelişmesini belirtmişti. Bugün yapılan geniş örnekli ve çok denek sayılı çalışmalarda periodontal hastalıklı bölgelerde sağlıklı bölgelere oranla daha fazla sayıda mikroorganizma bulunduğu, aradaki en büyük farkın ise kırmızı ve turuncu komplekse ait türler arasında olduğu sonucuna ulaşılmıştır (181). *P. gingivalis*, *T. forsythia*, ve *T. denticola*'nın periodontitisli bireylerde daha sık olarak, daha fazla oranda ve daha fazla sayıda saptandığı artık literatürde kabul gören bir görüş olmuştur. Hastalık kolonize olan türler tarafından başlatılır, ancak başlangıç aşamalarının subgingival bölgede bir veya daha fazla türde meydana gelen değişiklik ya da mikroorganizmaların habitatlarında (konak) meydana gelen lokal veya sistemik değişikliklerle mi gerçekleştiği tam olarak belirgin değildir. Kolonize olan türler tarafından konakta meydana getirilen değişiklikler lokal iltihapsal yanıtı neden olabilir, bunların bir kısmı ise kesin periodontal doku kaybına yolaçar. Konakta meydana gelen değişikliklerle kolonize olan mikrofloranın içeriği ve metabolik aktiviteleri etkilenir. Meydana gelen bu değişikliklerle konak ve parazit arasında hiç de kolay olmayan bir denge oluşturulmaya çalışılır. Periodontitisli bireylerden elde edilen plak örnekleri işte bu yıllar içerisinde oluşturulan yeni toplulukları içerir. Sonuç olarak, sağlık, gingivitis ve periodontitisli farklı mikroorganizma topluluklarına rastlanır. Bu mikroorganizmalar ve ilişkili oldukları klinik durumlar Tablo2-2'de gösterilmiştir.

2.6.1. Periodontal bölgelerde subgingival mikrobiyal içerikle klinik değişkenler arasındaki ilişki

Subgingival mikroflorayı etkileyen en önemli etkenin belkide komşu periodontal dokuların klinik durumu olduğu söylenebilir. Burada önemli olan iki etken vardır:

bunlar periodontal cebin veya dişeti oluşunun iltihapsal durumudur. Socransky ve ark. tarafından yapılan çalışmada pek çok türle periodontal cep derinliği arasında saptanabilir bir ilişki olmadığı, ancak kırmızı ve turuncu komplekslere dahil olan tüm türlerin artan cep derinliğiyle birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir [182]. Derin cep bölgelerinde *P.gingivalis* ve *T.denticola*'nın bağlanabileceği daha geniş epitel yüzeyleri bulunmaktadır. Daha fazla oranda turuncu kompleks içeren sıkı bağlantıya sahip olmayan bakteri zonunun sığ bölgelere kıyasla derin bölgelerde artış gösterdiği bilinmektedir [125]. Ayrıca dişe komşu bölgelerdeki lokal etkenler epitele komşu veya ara zondaki türlerin lehine çalışırken, cebin sert doku duvarında bakteri gelişimini sınırlamaktadır. Örneğin, dişe komşu biofilimde bulunan fermente edilebilir karbonhidratların varlığı sakkarolitik bakterilerin gelişimini sınırlarken, hidrojen, format, asit son ürünleri, protein yıkan ürünler gibi karbonhidrat dışı enerji kaynakları kırmızı ve turuncu komplekslerdeki pek çok asakkarolitik türün gelişimine katkıda bulunur. Bir bölgede dişeti iltihabının varlığı yine o bölgedeki mikroflorayı etkilemektedir. Kırmızı ve turuncu kompleks üyeleri periodontal iltihabın klinik olarak önemli bulgularından sondalama esnasında kanama gösteren bölgelerde anlamlı düzeyde artmaktadır. İltihaplı bölgelerde artan türlerin iltihapla birlikte artan dişeti oluk sıvısına daha yakın oldukları için inflamasyondan kısmen daha fazla yararlandığı söylenebilir.

2.6.2. Periodontitisli bireylerde sağlıklı ve hastalıklı bölgelerdeki mikrofloranın periodontal olarak sağlıklı bireylerdeki sağlıklı bölgelerdeki mikroflora ile karşılaştırılması

Aynı bireyde >6mm cep derinliğine sahip olan ve sondalama esnasında kanama gözlenen bölgelerle <4 mm cep derinliğine sahip olan ve sondalama esnasında kanama gözlenmeyen bölgeler arasında subgingival mikrobiyal profil açısından anlamlı farklılıklar olduğu yine Socransky ve ark. tarafından bildirilmiştir [181]. Bu çalışmada subgingival tür sayıları arasındaki en anlamlı farklılıklara ilerlemiş periodontitisli bireylerde sağlıklı ve hastalıklı bölgelerden elde edilen örneklerde saptanan kırmızı ve turuncu kompleks üyelerinde rastlanmıştır. İncelenen tüm türlerde ise sağlıklı bireylerin sağlıklı bölgeleri ile kronik periodontitisli bireylerin periodontal açıdan sağlıklı bölgeleri arasında belirgin farklılıklar görülmüştür. Farklılıklar en belirgin şekilde yine kırmızı ve turuncu kompleks türlerinde ortaya çıkmaktadır. Bu bulgular klinik açıdan değerlendirilecek olursa; periodontitisli

bireylerin sağlıklı bölgeleri gelecekte oluşabilecek periodontal doku yıkımı açısından periodontal sağlıklı bireylerin sağlıklı bölgelerine oranla daha fazla risk altındadır. Ancak halen lokal habitatlardaki benzerliklere rağmen periodontitisli ve sağlıklı bireylerdeki mikrobiyotanın neden bu kadar farklı olduğu sorusunun cevabı araştırılmaktadır.

2.6.3. Konak düzeyindeki değişkenlerle subgingival biofilm içeriği arasındaki ilişki

Subgingival plak içeriğini belirgin şekilde etkileyen konağa özgü çeşitli faktörler sözkonusudur. Bunlar; genetik özellikler, obezite, sigara gibi alışkanlıklar...

2.6.3.1. Sigara:

Pek çok çalışmada sigara ile periodontal hastalığın klinik değişkenleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sigara içmekte olan bireylerde sigarayı bırakanlar veya sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında daha fazla cep derinliğine sahip bölgeye, daha fazla alveol kemiği ve ataşman kaybına rastlanmıştır. Aynı çalışmalarda sigara içen bireylerde sondalama esnasında daha az kanama gözlenmiştir. Klinik bulgularla sigara arasındaki bu ilişki iyi düzeyde saptanmıştır, ancak aynı kuvvetli ilişki subgingival plak içeriğiyle ilişkili olarak kurulamamıştır. Araştırmacılar bu konuda çelişkili veriler sunmaktadır. Örneğin Preber ve ark. 142 kronik periodontitisli bireyi dahil ettikleri çalışmalarında *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia* sayılarının sigara içen ve içmeyen bireyler arasında anlamlı düzeyde farklılıklar göstermediğini bildirmiştir [137]. Stoltenberg ise 615 erişkini dahil ettikleri çalışmalarında [190] test türlerinden *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* ve *P. Intermedia*, *E. corrodens* ve *F. nucleatum* prevalansları arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Renvert ve ark. [143] ise periodontal tedavi sonuçlarını değerlendirdikleri çalışmalarında tedavi sonrası mikrobiyal değişimin sigaradan çok klinik değişimle ilgili olduğu sonucuna ulaşmıştır. Eggert ve ark. ise sigara içen bireylerin sık bölgelerinden içmeyenlere oranla daha sık *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia* izole edildiğini bildirmiştir [49].

2.6.3.2. Obezite:

Günümüzde tüm dünya literatüründe aşırı kilolu veya obez bireylerin diabet, koroner kalp hastalığı, kanser ve osteoartrit gibi hastalıklara yakalanma oranının

daha fazla olduğu kabul edilmektedir. Aynı ilişki son dönemde periodontal hastalık ve obezite arasındaki ilişkiyi saptamaya yönelik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Kronik periodontitisli bireylerde 40 bakteri türünün checkerboard DNA-DNA hibridizasyon yöntemiyle incelendiği çalışmada (Socransky) vücut kitle indeksi (BMI) yüksek bireylerde plak, sondalamada kanama ile birlikte cep derinlikleri ve ataşman seviyelerinin daha yüksek olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. Obezite ayrıca *T. forsythia*'yı da içeren belirli patojenlerin oranındaki artışla ilişkilendirilmiştir. Bu artış özellikle BMI>35 olan bireylerde belirgin düzeylerde saptanmıştır [180].

2.6.3.3. Genetik özelliklerin subgingival plak içeriğine etkileri:

1997'de Kornman ve ark. [95] sigara içmeyen bireylerde IL-1 gen kümesindeki polimorfizmlerle periodontal hastalık arasındaki ilişkiyi gösteren bulgular sunmuşlardır. IL-1 α ve IL-1 β genlerinde alel 2 polimorfizmi gösteren bireylerin şiddetli periodontitis geçirme oranlarının diğerlerine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. IL-1 polimorfizmi genotiplemesiyle ilgili çalışmalarda pozitif ve negatif genotipli bireylerin subgingival mikrobiyotaları arasındaki en anlamlı farklılıkların >6 mm cep derinliğine sahip bölgelerde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Çalışmanın verileri genotipi pozitif olan bireylerin derin cep bölgelerinde kırmızı ve turuncu kompleks türlerinin artışını mikrobiyal atağa karşı artan bir iltihapsal yanıt gösteren iltihapsal sitokinlerin üretimindeki artışla ilişkilendirmektedir. Artan iltihapsal yanıt dişeti oluk sıvısı miktarını artırarak subgingival biofilmin besin içeriğini de zenginleştirir. Cebin epitelyal duvarına yakın yerleşim gösteren kırmızı kompleks üyeleri bu içerikten en fazla yararlanan türleri oluştururlar.

2.6.3.4. Coğrafik yerleşimin subgingival plak içeriğine etkileri:

Pek çok çalışma aynı tip periodontal hastalığa sahip farklı popülasyonların subgingival mikrobiyotalarında günümüze dek saptanmış olan türlerin yaygın şekilde bulunduğunu göstermiştir [26;37;39;43;156;229]. Doğrudan farklı coğrafik bölgelerde yerleşmiş olan bireylerin mikrofloralarının karşılaştırıldığı çalışmalarda subgingival türlerin genişliği, seviyesi ve prevalansında belirgin farklılıklar bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır [156]. Haffajee ve ark. tarafından 2004'te yayımlanan çalışmada dört farklı coğrafik bölgeden kronik periodontitisli

bireylerden elde edilen subgingival plak örnekleri incelenmiştir. Brezilya'dan 58 birey, Şili'den 26 birey, İsveç'ten 101, Amerika Boston'dan 115 birey klinik olarak izlenmiş ve subgingival plak örnekleri alınmıştır. Örnekler 39 bakteri türü açısından checkerboard DNA-DNA hibridizasyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve her birey için her bir türün ortalama proporsiyonları hesaplanmıştır. 4 farklı bölgeden elde edilen 39 test türünün 12'sinin proporsiyonlarında belirgin farklılıklar bulunmuştur. En yüksek *P.gingivalis* ve *F.periodonticum* oranlarına Şili'li deneklerde rastlanmıştır. *T.forsythia* proporsiyonu ise dört grupta anlamlı farklılıklar göstermemiştir. *T.denticola* ise en yüksek proporsiyonda Brezilya'lı deneklerde gözlenmiştir [79]. Farklı mikrobiyal profillere sahip bireylerin benzer periodontal tedavi stratejilerine farklı yanıtlar vermesi muhtemeldir. Ayrıca bu farklılıklar yine dünyanın farklı bölgelerinde rastlanan hastalık şiddetindeki farklılıklara da açıklama getirebilir.

***Porphyromonas gingivalis*'in Periodontitiste Rolü**

Porphyromonas gingivalis diğer gram-negatif bakterilerden farklı olarak endotel hücrelerinin E-selektin üretimini direkt olarak uyarmaz. Bu nedenle de lökositler ekstraselüler hücrelere bağlanıp, damar dışına geç edemezler. Bu mekanizma ile *P. gingivalis* iltihapsal yanıtın anahtar bir basamağını engellemiş olur. Farelerde yapılan in vivo çalışmalar Pg tarafından salınan lipopolisakkaridin erken doğal bağışık yanıtı sebep olmadığını göstermiştir. E-selektin TNF-a ve IL1-β tarafından indirekt olarak aktive edilebilir, ancak çalışmalar Pg'nin bu sitokinler için zayıf bir uyaran olduğunu göstermektedir. Pg lipopolisakkaridi lipopolisakkarid-bağlayan proteine oldukça zayıf bağlanır, bunun sonucunda da myeloid hücreleri için zayıf bir uyaran oluşturur. Ayrıca Darveau ve ark. çalışmalarında *Porphyromonas gingivalis*'in diğer bakteriler tarafından da endotel hücrelerinde E selektin ekspresyonunun uyarılmasını engellediğini göstermiştir [40].

Pg ve lipopolisakkaridi endotel hücrelerinden, dişeti fibroblastlarından ve dişeti epitel hücrelerinden MCP-1, IL-8 ve ICAM ekspresyonunu engeller. Bu özellikleri ile bakteri doğal iltihapsal yanıtı baskılar. Etkin bir bağışık yanıtın oluşamaması periodontal hastalık meydana gelişinde önemli etkenlerdendir.

Hastalığın gingivitisten periodontitise dönüşümünde yalnızca total mikrobiyal yükteki artış (10^5 - 10^8) değil, aynı zamanda plak içeriğindeki bakterilerin patojeniteleri önemlidir. 1996 yılında yapılan Dünya Periodontoloji Toplantısı'nda Pg, Bf ve Aa bu bakterilerin hastalığın başlamasındaki rollerinin daha iyi anlaşılmasıyla birlikte periodontal hastalık için üç önemli patojen olarak kabul edilmişlerdir [1].

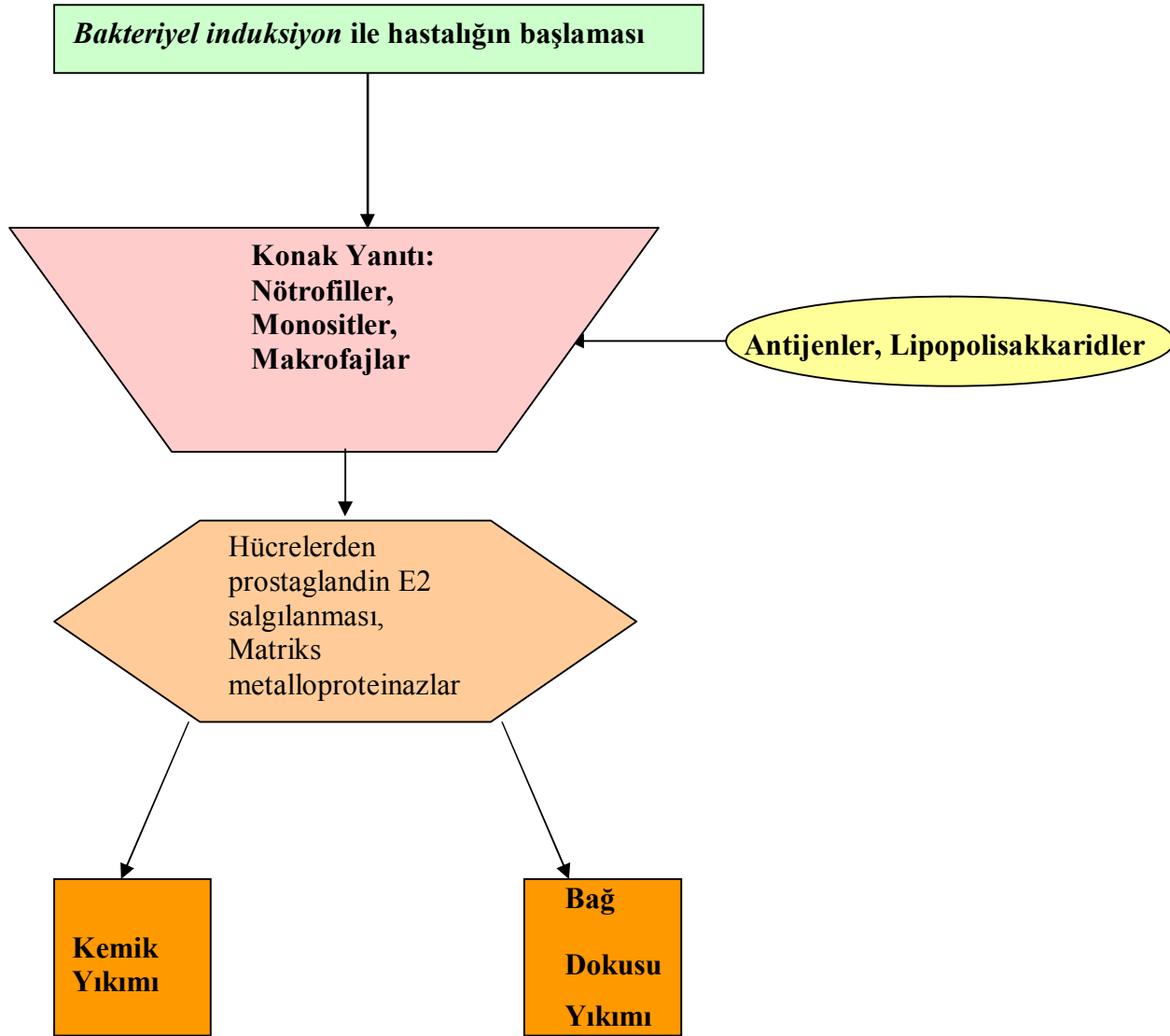
Agresif Periodontitisli Bireylerde Subgingival Mikrobiyal Flora

1999'da yapılan Uluslararası Periodontal Hastalıkların Sınıflaması Toplantısı'nda erken dönem periodontitisler agresif periodontitisler olarak, erişkin periodontitis ise kronik periodontitis (KP) olarak değiştirilmiştir [8]. Bu değişiklikler asıl olarak hastalığın başlama yaşındaki belirsizlikler, aynı zamanda yaşın eski sınıflamada asıl kriter olması dolayısıyla yapılmıştır. Yeni sınıflama yaşa bağımlı olmayan bir sınıflama olarak düşünülmüştür. Agresif periodontitis (AP) sistemik olarak sağlıklı bireylerde hızlı ataşman ve kemik yıkımıyla karakterize ve ailesel geçiş gösteren bir periodontitis tipi olarak tanımlanabilir. Yine 1999'daki sınıflamaya göre agresif periodontitisler hastalığın yaygınlığına göre daha ileri şekilde sınıflanmış ve lokalize agresif periodontitis (LAP) ile generalize agresif periodontitis (GAP) olarak iki farklı hastalık tablosu tanımlanmıştır. Daha önceki sınıflamada mikrobiyolojik kriterlerden bahsedilmezken yeni sınıflamada agresif periodontitislerin sekonder özellikleri olarak artmış *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve bazı toplumlarda da *Porphyromonas gingivalis* seviyelerine dikkat çekilmiştir. Mikrobiyolojik kriterlerden genellikle olması beklenen fakat evrensel olmayan kriterler olarak sözedilir. Çeşitli çalışmalarda *A. actinomycetemcomitans* gibi spesifik subgingival mikroorganizmaların artmış prevalans ve/veya proporsiyonlarının (total floraya oranı) lokalize agresif periodontitisli bireylerin generalize agresif periodontitis ve kronik periodontitisle ayırtedilmesinde yardımcı kriter olduğu bildirilmiştir [121;123]. Generalize agresif periodontitisli bireylerin subgingival flora kompozisyonu ile ilgili çalışmalar ise daha çelişkili veriler sunmaktadır. Genaralize agresif periodontitis ve kronik periodontitis arasında subgingival florada anlamlı farklılıklar olduğunu bildiren çalışmaların [42] yanısıra bu tip periodontitislerdeki farklı varyasyonlardan bahseden çalışmalar da [105;120] mevcuttur. Örneğin Doğan ve ark. lokalize agresif periodontitis, generalize agresif periodontitis, generalize

kronik periodontitis ve sağlıklı kontrollerden oluşan toplam 69 Türk denekle yaptıkları çalışmada kültür yöntemiyle altı periodontopatojenin prevalans ve proporsiyonunu araştırmışlardır. Agresif periodontitisli bireylerde Aa oranlarında artış olmadığı, generalize kronik periodontitisli bireylerin önemli bir yüzdesinin LAP ve GAP'lı bireylere göre daha fazla oranlarda *Campylobacter rectus* (Cr) ve *Tannerella forsythia* (Tf) tarafından kolonize edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada sunulan verilerin aksine Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada [105] agresif periodontitisli 156 ve kronik periodontitisli 165 bölgeden elde edilen subgingival plak örneklerinde yedi periodontopatojenin (*A.actinomycetemcomitans*, *T.forsythia*, *Fusobacterium.supp*, *P.micra*, *P.intermedia*, *P.gingivalis*, *Treponema supp*) prevalansı karşılaştırılmıştır. Çalışmada agresif ve kronik periodontitisli bireylerin hastalıklı bölgelerinden elde edilen subgingival floranın farklılık göstermediği bildirilmiştir. Aynı bireylerin sağlıklı bölgelerinden elde edilen örneklerde ise diğer 6 periodontal patojene göre *P.intermedia* kronik periodontitisli bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu farklılıklar dünyanın çeşitli bölgelerinde yaşayan toplumlardaki varyasyonlarla ilgili olabileceği gibi hastalıkların gruplandırılmasındaki zorluklarla da bağlantılı olabilir. Ximenez ve ark. tarafından yapılan çalışmada generalize agresif periodontitis teşhisi konmuş Meksikalı bireylerden elde edilen subgingival plak örneklerinin mikrobiyal kompozisyonu araştırılmış ve kronik periodontitisli bireylerle karşılaştırılmıştır. Çalışmada checkerboard DNA-DNA hibridizasyonu tekniği kullanılarak 40 bakteri türünün varlığına bakılmıştır. Tüm patojenler arasında yalnızca *P.gingivalis*, *P.nigrescense* ve *T.forsythia* GAP, generalize KP ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde istatistiksel anlamlı düzeyde farklı (en yüksek generalize KP grubunda) bulunmuştur. Generalize KP'li bireylerde *P.nigrescense*, *T.forsythia* ve *T.denticola* proporsiyonları daha yüksekken, kronik periodontitisli bireylerde *P.gingivalis* ve *P.intermedia* proporsiyonları daha yüksek bulunmuştur. *A.actinomycetemcomitans* ise her üç grupta da benzer düzeylerde düşük bulunmuştur. Araştırma bulgularına göre agresif ve kronik periodontitisli grupların ayırılmasını sağlayacak mikrobiyolojik farklılığa rastlanmamıştır. Varlığı araştırılan 40 bakteri türü arasında grupların subgingival mikrobiyal profil özelliklerini yansıtacak farklılıklar bulunmamıştır [228].

Tablo 2-2 Periodontal sağlık, gingivitis ve periodontitisle ilişkilendirilen subgingival türler [40]

Sağlık	Gingivitis	Periodontitis
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	
<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Streptococcus inintermedius</i>	serotip b.
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Capnocytophaga ochrea</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	PRO spiroketler
<i>Streptococcus inintermedius</i>	<i>Prevotella loeschei</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>	
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	subs. <i>vincentii</i>
<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Capnocytophaga ochrea</i>	subs. <i>nucleatum</i>	subs. <i>nucleatum</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Selenomonas flueggeii</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	Enteric türler
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Fusobacterium alocis</i>
subs. <i>polymorphum</i>	<i>actinomycetemcomitans</i>	<i>Lactobacillus uli</i>
	serotip a.	<i>Veillonella parvula</i>



Şekil 2: Periodontal Hastalık Patogenezi (Greenstein G, Lamster I, Changing periodontal paradigms: therapeutic implications. I.J Periodontics Restorative Dent 2000;14:337-57)[74].

Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)

Periodontal hastalıkların patogenezi yukarıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 2). Patogeneizde rol alan önemli enzimlerden olan ve tez çalışmamızda da miktarı araştırılan matriks metalloproteinazlar (bizim çalışmamızda MMP-1) sistemik dolaşımdan gelen ve yerleşik hücreler tarafından üretilirler. Bu enzimler çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli role sahiptirler [16;59;60]. Dişeti, periodontal ligaman ve alveol kemiği farklı tiplerde kollajen ihtiva etmektedir

(Tablo:2-3). MMP'ler periodonsiyumun kollajen içeriğini yıkan enzimlerdir. Kollajen yıkımının patolojik olarak artışının klinik sonuçları ataşman kaybı ve periodontal cep oluşumudur. Periodontal hastalıkla mücadelede doku yıkıcı enzimler ile bunların inhibitörleri arasındaki dengenin yeniden oluşturulması ihtiyacının ortaya konması ile konak yanıtının terminal katabolik bileşeniyle ilgili olan matriks metalloproteinazların modülasyonuna yönelik yeni stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır [65;67;69;104;151].

Konak kaynaklı, bağ dokusu yıkımına neden olan matriks metalloproteinazların (matriks metalloproteinaz-18) prototipi ilk kez 1962'de Gross ve Lapiere tarafından tanımlanmıştır [76].

Matriks metalloproteinazlar çeşitli konak hücreleri (polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, fibroblastlar, kemik, epitelyal ve endotelyal hücreler) tarafından salgılanan [129] ve salınan nötral pH'da işlev gören ve ekstraselüler matriks içeriğini substrat olarak algılayan çinko ve kalsiyuma-bağlı endopeptidazların önemli bir ailesidir. Bu proteinazlar embriyonik gelişim, post-partum uterusun oluşumu, doku remodelingi, tükrük bezlerinin morfogenezisi ve diş sürmesi gibi çeşitli fizyolojik olaylarla periodontitis, artrit, kanser, ateroskleroz, diabet, pulmoner amfizem ve osteoporoz gibi çeşitli patolojik olaylarda rol alırlar.

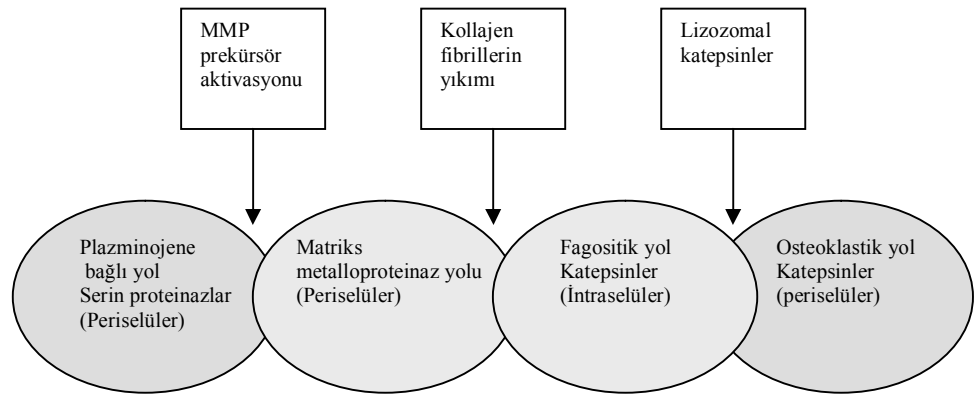
2.8.1. Matriks metalloproteinaz ailesinin temel özellikleri

- Katalitik mekanizma Zn üzerindeki aktif merkezle ilgilidir.
- Proteinazlar zimojen (zymogen) formda salgılanırlar.
- Zimojenler proteinazlar veya organomercurialler tarafından etkinleştirilirler.
- Aktivasyon sonrasında yaklaşık 10.000 dalton'luk peptid kaybı gerçekleşir.
- cDNA sekanslarının tamamı kollajenaz sekansları ile homolog teşkil eder (homoloji gösterir).

- Enzimler ekstraselüler matriksin bir veya daha fazla bileşenini yıkar.
- Aktiviteleri doku inhibitörleri (TIMP'ler) tarafından inhibe edilir. [225]

Ekstraselüler Matriksin Metabolik Yıkımı

Ekstraselüler matriks yıkımı birbirinden oldukça farklı çalışan dört ayrı yolla gerçekleşir (Şekil.3.). Matriks bileşenleri matriks metalloproteinazlara ve plazminojene bağlı çeşitli reaksiyonlarla meydana gelir, matriksin daha geniş fragmanları ise lizozomal proteinazların sağladığı fagositik yolla yıkıma uğrar. Mineralize matriks osteoklastların hakim olduğu karmaşık bir ekstra/periselüler yolla (osteoklastik yol) yıkıma uğrar. MMP'lere bağlı yolun diğer yollarla ilişkisi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Belirli gelişimsel ve patolojik olaylarda MMP'ler indirekt role sahiptirler. Bu durum periodontal hastalıklar içinde geçerlidir. MMP'lerin doğal substratlarının belirlenmesi ise bu enzimlerin geniş ve içiçe geçmiş substrat spesifiteleri nedeniyle oldukça zordur. Ancak hücreler, dokular ve interstisyel sıvılarda MMP transkriptleri veya proteinlerinin varlığı bu enzimlerin in vivo ekstraselüler matriksin metabolik remodelinginde rol aldığını göstermektedir [16].



Şekil 3:Ekstraselüler matriks yıkım yolları [16]

Kollajen yıkımı inflamasyon, doku yıkımı, remodeling, yara iyileşmesi veya doku tamiri esnasında gerçekleşir. Bu işlem iki yolla gerçekleşebilir. 1-intraselüler yol, 2-ekstraselüler yol [16;18;53]. Patolojik olmayan durumlarda dişeti ve periodontal ligaman gibi yumuşak ve dinamik yapıya sahip bağ dokularında oldukça yüksek düzeylerde fagositoz ve kollajen fibril yıkımı gerçekleşir [12;53;118;198]. Patolojik olaylarda ise sentez ve yapım arasındaki denge bozulur. Gingivitisin erken dönemlerinde dahi dişetinde bulunan kollajen fibrillerin çoğu bölgeye infiltre olmak isteyen inflamatuvar hücrelere yer sağlamak amacıyla yıkıma uğrar. Bu süreç dişetin pembe ve sıkı görünümünün kaybolup parlak ve bütünlüğü kaybolmuş bir görünüm kazanmasına yol açar. Bu durum kronikleştikçe periodontitise dönüşüm gerçekleşip periodontal ligaman çevre destek dokularla birlikte kaybedilebilir. Bu patolojik durumda kollajen genelde metallo-proteinazlarla ilişkili olan ekstraselüler yolla yıkıma uğrar [69]. İnterstisyel kollajenaz (MMP-1) bu enzimler arasında en iyi bilinenlerindendir. MMP-1 karakteristik *N*-terminal ve *C*-terminal fragmanları üreterek tip I ve III kollajeni yıkıma uğratır. Ayrıca Birkedal ve Hansen (1993) periodontal ekstraselüler matriks makro moleküllerinin başlangıç yıkımından MMP-2 (jelatinaz), MMP-9 (tip IV kollajenaz), MMP-10 ve MMP-11 (stromelizin)'in sorumlu olduğunu bildirmiştir [16]. Matriks metalloproteinazların genel bir tanımını yapacak olursak remodeling ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin (komponentlerinin) yıkımından sorumlu Ca ve Zn' ya bağlı proteolitik enzimlerin (proteazlar) geniş bir alt grubudur. Bu moleküller interstisyel ve bazal membran kollajenleri ile fibronektin, elastin, laminin ve proteoglikan çekirdek proteini yıkıma uğratırlar. Bu potansiyel enzimler proformlar halinde salgılanır, aktivasyonları ise ekstraselüler gerçekleşir. Bu proteinazlar periodontal hastalık, artrit, kanser, pulmoner amfizem ve osteoporoz gibi çeşitli patolojik olayların dışında embriyolojik gelişim, doku remodelingi, yara iyileşmesi, tükürük bezleri morfogenezini ve diş sürmesi gibi pek çok fizyolojik olayda da rol alırlar [16;18;22;53].

Matriks metalloproteinaz inhibitörlerinden matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP'ler) ve α 2-makroglobulin gibi endojen inhibitörler matriks metalloproteinazları inhibe etmek üzere yüksek afiniteyle ve dönüşümsüz olarak kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Doku inhibitörleri matriks

metalloproteinazların aktif bölgelerine bağlanırlar. Genellikle doku ve vücut sıvıları (serum ve amniotik sıvı gibi) ile tükürük içinde dağılmış vaziyette bulunurlar [219]. Fibroblastlar, keratinositler, monositler/makrofajlar, endotel hücreleri ve osteoblastlar gibi pek çok periodontal hücre tipi tarafından eksprese edilirler. TIMP'ler matriks metalloproteinazları periselüler olarak kontrol ederlerken, α 2-makroglobulin vücut sıvılarındaki matriks metalloproteinazlar için regülatör görevi görür.

2.8.2. Matriks metalloproteinazların periodontal hastalıktaki rolleri

Periodontal ataşman kaybı periodontal dokulardaki kollajen fibrillerin aşırı miktardaki yıkımıyla ilişkilidir. Bu enzimlerin patolojik yıkımdaki rolleri pek çok çalışmada gösterilmiştir. İlk çalışmalar doku kültürleri ve bunların kültür sıvıları ile dişeti biyopsileri homojenatlarında yapılmıştır [12;14;17;22;96]. Kollajenaz aktivitesi aynı zamanda dişeti oluk sıvısında gösterilmiş ve aktivitenin inflamasyonla birlikte arttığı bildirilmiştir [72].

2.8.2.1. Periodontal hastalık-matriks metalloproteinaz ilişkisini destekleyen çalışmalar

2.8.2.2. Dokuda yapılan çalışmalar

Uitto ve ark. [206] 1998'de yaptıkları çalışmada tedavi edilmiş periodontitisli bireylerden elde ettikleri dişeti örneklerinde proteinazların latent formlarını göstermişler ve enzim aktivitelerinin iltihaplı örneklerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Sorsa ve ark. [189] iltihaplı dişetinde interstisyel kollajenazları incelemişler; dişeti oluk sıvısı (DOS) ve tükürükte bulunan enzimlerin fibroblast-tip interstisyel kollajenazdan çok nötrofil tip olduğunu bildirmişlerdir.

Robertson ve ark.[147] sağlıklı ve hafif derece iltihaplı dişeti biyopsi örneklerinin kültür sıvılarında kollajenaz aktivitesi üzerinde serumla ilişkili inhibisyonu göstermişlerdir.

2.8.2.3. Dişeti oluk sıvısında yapılan çalışmalar

Larivee ve ark. [103] lokalize juvenil periodontitisli hastalardan ve sağlıklı kontrollerden elde ettikleri oluk sıvısı örneklerinde latent ve aktif kollajenazlar ile

inhibitör seviyelerine tedavi öncesi ve sonrasında bakmışlar, tedavi öncesinde artan, tedavi sonrasında ise azalan kollajenaz seviyelerini göstermişlerdir.

Kryshtalskyj ve ark. [98] çalışmalarında beagle köpeklerinde sağlıklı, gingivitisli ve periodontitisli bölgelerden alınan oluk sıvısı örneklerini çalışmışlar, iltihaplı bölgelerde yüksek kollajenaz ve düşük inhibitör aktivitelelerine rastlamışlardır. Periodontitisli bölgelerde yüksek aktif enzim seviyeleri bulunurken, sağlıklı ve gingivitisli bölgelerde ağırlıklı olarak latent formlar bildirilmiştir.

Villela ve ark. araştırmalarında sağlıklı ve gingivitisli gruplar ile erişkin periodontitis ve lokalize juvenil periodontitisli bireyler üzerinde çalışmışlardır. Gingivitisli bireylerle karşılaştırıldığında erişkin periodontitisli ve lokalize juvenil periodontitisli gruplarda daha yüksek kollajenaz aktivitesi bildirilmiştir. Gingivitisli bireylerde kollajenaz aktivitesini ise sağlıklı kontrollere göre daha yüksek bulmuşlardır. Bu verilere göre sağlıklı bireylerde yalnızca çok düşük oranlarda kollajenaz salınımının gerçekleştiği ve kollajenaz aktivitesinin hastalık şiddetiyle doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir. Kollajenaz aktivitesi ile dişeti oluk sıvısı hacmi (veya DOS akış oranı) arasında korelasyon bulunamamıştır. Araştırma sonuçlarına göre periodontitisli bireylerde cep derinliği ve kollajenaz aktivitesi korelasyon gösterirken, gingivitisli bireylerde dişeti iltihabı ile kollajenaz aktivitesi korelasyon gösterir [215;216].

Kryshtalsky ve Sodek [97] beagle köpeklerinde yaptıkları çalışmada sağlıklı, gingivitisli ve periodontitisli bölgelerden dişeti oluk sıvısı örnekleri elde edip bazı kollajenazlar ve inhibitörlerine bakmışlardır. En fazla latent formda kollajenaza gingivitisli örneklerde rastlanırken, en fazla inhibitör miktarı ise kontrol örneklerinde gözlenmiştir.

Suomalainen ve ark. [191] tarafından yapılan çalışmada tedavi edilmemiş lokalize juvenil periodontitisli bireylerde yalnızca vertebra kollajenazına rastlanmıştır. Bu kollajenazın tip I ve tip III kollajenazı tip II kollajenaza göre daha hızlı $\frac{1}{4}$ ve $\frac{3}{4}$ uzunlukta fragmanlarına ayırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılara göre bu durum fibroblastlar, epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen kollajenler için bir gösterge olarak kabul edilmiştir.

Lee ve ark. [107] hızlı ilerleyen periodontitis, gingivitis ve stabil durumdaki hasta gruplarında kollajenaz aktivitesine bakmışlar, araştırma sonucuna göre hızlı ilerleyen periodontitisli bireylerde oldukça yüksek kollajenaz aktivitesi bildirmişlerdir. Latent kollajenaz miktarını gingivitisli bireylerde hızlı ilerleyen periodontitise göre daha fazla bulmuşlardır. Bu çalışma agresif periodontitislerde periodontal bağ dokusu yıkımında aktif nötrofil kollajenazların direkt rolünü vurgulamaktadır.

2.8.2.4. *In situ* hibridizasyon ve immunohistokimyasal çalışmalar

Wooley ve Davies [226] yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada hastalıklı doku örneklerini tedavi edilmiş bölgelerdeki doku örnekleriyle karşılaştırmışlar ve özellikle lökositlerin çevresinde belirgin kollajenaz aktivitesi bulmuşlardır.

Bir diğer immunohistokimyasal çalışmada Westerlund ve ark. dişeti, dişeti oluk sıvısı ve tükürükte yaptıkları incelemeler sonrası MMP-9 ve PMN-jelatinazın özellikle yıkılmakta olan polimorfonükleer lökositler tarafından üretildiğini ortaya koymuşlardır [220].

Pinchback ve ark. ilerlemiş yıkıcı periodontitise sahip bireylerden elde ettikleri doku örneklerini immunohistokimyasal olarak incelemişler ve MMP-1 ve TIMP-1'in özellikle epitele yakın yüzeylerde bulunan damarlarla ilişkili oldukları sonucuna varmışlardır. MMP-1'e incelenen doku kesitlerinde rastlanırken TIMP-1 ve TIMP-2'ye rastlanmamıştır [136].

Nomura ve ark. *in situ* çalışmalarında periodontitisten etkilenmiş doku örnekleri ile sağlıklı dişeti doku örneklerini karşılaştırmışlar, periodontitisten etkilenmiş örneklerde daha yüksek MMP-1(fibroblast tip-kollajenaz) ve TIMP-1 messenger RNA seviyeleri tespit etmişlerdir. TIMP-2 mRNA seviyelerinin ise sağlıklı örnekler ile periodontitisten etkilenmiş örneklerde farklılık göstermediği bildirilmiştir [126].

Tonetti ve ark. [202] tarafından yapılan bir diğer *in situ* çalışmada sağlıklı bölgelerden alınmış biyopsi örneklerinde MMP-3 messenger RNA'sına rastlanmazken, periodontitisli bölgelerin % 38'inde aynı kollajenazın mRNA'sını

tespit etmişlerdir. MMP-8 mRNA'sına ise sağlıklı bölgelerin %17'sinde, periodontitisli bölgelerin %46'sında rastlanmıştır.

Aiba ve ark. [3] *in situ* çalışmalarında normal ve iltihaplı dişeti örneklerini incelemişler ve iltihaplı dişeti örneklerinde MMP-1 mRNA'sında artış saptamışlardır. MMP-8 ve TIMP-1 gen ekspresyonunda ise değişiklik gözlememişlerdir. İltihaplı dişetinde en yüksek messenger RNA seviyesine TIMP-1'de rastlanırken, en düşük seviyeler MMP-8'de belirlenmiştir. Erişkin periodontitiste yüksek MMP-1 mRNA seviyeleri Nomura'nın çalışmasıyla [126] benzerlik gösterirken, juvenil periodontitiste MMP-1 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur .

Kubota ve ark. [100] sağlıklı ve hastalıklı örnekleri incelemişler; MMP-1, MMP-3 ve TIMP-1 messenger RNA'sını hastalıklı grupta anlamlı yüksek bulmuşlardır. TIMP-2 seviyelerinde ise anlamlı fark görülmemiştir. MMP-3 mRNA'sı MMP-1 mRNA'sından, MMP-1 mRNA'sı da MMP-8 mRNA'sından yüksek bulunmuştur. Bu bulgu dişeti oluk sıvısında MMP-8'in daha yüksek bulunduğu diğer çalışmalarla [66] uyumsuzdur.

Kubota ve ark. tarafından yapılan diğer bir *in situ* çalışmada [99] TIMP-1 ve TIMP-2 eksprese eden hücreler hafif düzeyde gingivitisle karşılaştırılınca periodontitisli grupta daha yüksek bulunmuştur. Hücre infiltrasyonunun yoğun olduğu dişeti bağ dokusunda her iki doku inhibitörüne ait mRNA eksprese eden hücrelere rastlanırken, TIMP-2 mRNA' sına yalnızca cep epiteline komşu bağ dokusunda rastlanmıştır.

Uitto ve ark.'nın [206] MMP-13 ekspresyonuyla ilgili *in situ* çalışmada MMP-13'ün farklılaşmamış epitel hücrelerince eksprese edildiği ve bu enzimin kronik iltihapta görülen epitelin bağ dokusuna göçüyle ilişkili olan kollajen yıkımıyla ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tervahartiala ve ark. tarafından yapılan çalışmada erişkin periodontitis ve lokalize juvenil periodontitisli gruplardan dişeti örnekleri ile dişeti oluk sıvısı örnekleri elde edilmiş ve kollajenolitik MMP'lerde MMP-2, MMP-8, MMP-13 ve MMP-14 *in situ* hibridizasyon yöntemiyle, MMP-8, MMP-13 ve MMP-7 immunohistokimyasal yöntemle, MMP-2, MMP-7, MMP-13 ve MMP-14 Western İmmunoblot yöntemiyle incelenmiştir. MMP-13 mRNA'sına erişkin periodontitis

ve lokalize juvenil periodontitisli bireylerin oluk epiteli ile subepitelyal fibroblastlar ve monosit/makrofaj benzeri hücrelerinde rastlanmıştır. MMP-8 mRNA'sına hasta gruplarının her ikisinde de oluk epitelinde rastlanmıştır. MMP-14 ise yalnızca erişkin periodontitisli bireylerin dişeti bağ dokularında bulunan fibroblast ve monosit/makrofaj benzeri hücrelerinde gözlenmiştir. MMP-2 transkriptleri ise erişkin periodontitisli grup oluk epiteli hücrelerinde görülmüştür. İmmunohistokimyasal boyamalarda MMP-13-pozitif hücreler erişkin periodontitis ve lokalize juvenil periodontitisli gruplarda sağlıklı kontrollere göre daha yoğun boyanmıştır. Yine hasta gruplarında MMP-8 nötrofillerin hücre içi granüllerinde güçlü immunoreaktivite göstermiştir. MMP-8-pozitif nötrofiller erişkin periodontitisli grupta diffuz dağılım gösterirken, lokalize juvenil periodontitisli grupta ise fokal perivasküler dağılım göstermiştir. Çalışmada erişkin periodontitis ve lokalize juvenil periodontitiste periodontal inflamasyonun dişeti oluk epitelinden MMP-2, MMP-8 ve MMP-13 salınımına yol açtığı, MMP-14 için böyle bir etkiye sebep olmadığı gösterilmiştir [200].

2.8.2.5. ELISA çalışmaları

Dişeti oluk sıvısında fibroblast kaynaklı enzimlerin ve doku inhibitörünün değerlendirildiği ilk çalışma Haerian ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aynı bireyin gingivitisli, periodontitisli ve sağlıklı bölgelerinden alınan dişeti oluk sıvısı örnekleri değerlendirilmiş. MMP-3 proenzim ve aktif enzim seviyeleri ile TIMP-1 seviyelerinin hastalıklı bölgelerde (gingivitis ve periodontitis) sağlıklı bölgelere göre anlamlı daha yüksek enzim seviyeleri tespit edilmiştir. TIMP-1 ve MMP-3 seviyeleri gingivitisli ve periodontitisli bölgelerin ayırt edilmesine olanak sağlamayacak şekilde benzer bulunmuştur. TIMP-1'in hastalıklı bölgelerde sağlıklı bölgelere oranla yüksek seviyeleri bakteriyel uyaranla MMP ekspresyonunun gerçekleşmesi, konak kaynaklı hücrelerin doku yıkımına sebep olması ve devam eden yıkımın farkedilmesiyle birlikte doku kaynaklı inhibitörlerin yine konak hücreleri tarafından üretilmesi olarak açıklanmıştır [77].

Haerian ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada ileri periodontal yıkımın görüldüğü bölgelerden tedavi öncesi ve sonrasında oluk sıvısı örnekleri alınmış, MMP-1, MMP-3 ve TIMP-1 seviyelerine bakılmıştır. Sağlıklı, gingivitisli

ve periodontitisli bölgelerden elde edilen örnekler havuza alınıp değerlendirildiğinde dişeti oluk sıvısı MMP-3 ve TIMP-1 seviyeleri ile klinik parametreler arasında korelasyon kurulmuştur. Ancak farklı bölgelerden elde edilen örnekler ayrı ayrı değerlendirildiğinde klinik ve biyokimyasal parametreler arasında korelasyon kurulamamıştır. Araştırmacılar tedavi öncesi MMP-1, MMP-3 ve TIMP-1 seviyelerinin tedavi sonuçlarının tahmin edilebilirliği üzerine etkilerinin kısıtlı olduğu sonucuna varmıştır [78].

Ingman ve ark.'nın yaptıkları çalışmada erişkin periodontitis, lokalize juvenil periodontitis ve kontrol bireylerinden dişeti oluk sıvısı ve uyarılmış tükrük örnekleri alınmıştır. Erişkin periodontitis ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dişeti oluk sıvısı MMP-1 seviyeleri lokalize juvenil periodontitisli bireylerde anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Yine lokalize juvenil periodontitis grubunda erişkin periodontitis ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı yüksek TIMP-1 seviyelerine rastlanmıştır. Lokalize juvenil periodontitis ve kontrolle karşılaştırıldığında tükrük MMP-8 seviyeleri erişkin periodontitisli grupta daha yüksek bulunmuştur. Aynı grupta dişeti oluk sıvısı MMP-9 seviyeleri de lokalize juvenil periodontitis ve kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. MMP-3'e tüm gruplarda çok düşük oranlarda rastlanmıştır. MMP-8'in erişkin periodontitisli bireylerde tükrük, dişeti oluk sıvısı ve dişeti dokularındaki asıl kollajenaz, MMP-1'in ise lokalize juvenil periodontitisli bireylerin dişeti oluk sıvılarında bulunan asıl kollajenaz olduğu sonucuna varılmıştır [86].

Emingil ve ark. [51] kısa süre önce yayımlanmış çalışmalarında generalize agresif periodontitis, kronik periodontitis, gingivitis ve periodontal sağlıklı 4 grupta MMP-7, TIMP-1 seviyelerine ELISA ile, EMMPRIN (ekstraselüler matriks metalloproteinaz inducer) seviyelerine ise spesifik antikorlar kullanılarak Western İmmunoblot tekniği ile bakmışlar. Araştırma sonuçlarına göre dişeti oluk sıvısı total MMP-7 miktarları çalışma grupları arasında benzer bulunmuş. GAP, KP ve gingivitisli grup dişeti oluk sıvısı total EMMPRIN miktarları periodontal sağlıklı bireylere göre daha yüksek bulunmuş. Hasta grupları içinde en yüksek total EMMPRIN miktarı GAP'lı bireylerde görülmüş. KP grubuna oranla GAP grubunda TIMP-1 ve EMMPRIN seviyeleri daha yüksek olmakla birlikte bu fark

anlamli bulunmamış. Sağlıklı gruba oranla diğer gruplarda istatistiksel anlamli düzeyde yüksek total TIMP-1 miktarına rastlanmıştır. Gingivitisli gruba kıyasla GAP ve KP'li gruplarda total TIMP-1 seviyeleri anlamli düzeyde yüksek bulunmuş. Sağlıklı bireylerde MMP-7 varlığı bu enzimin bağlantı epitelinin antibakteriyel savunmasıyla ilgili olarak epitel hücreleri tarafından üretildiğini gösterir. Hasta grupları içinde benzer MMP-7 seviyelerinin enzimin diğer MMP'lerde olduğu gibi patogeneizde önemli bir role sahip olmadığını göstermektedir. Bağlantı epitelinin cep epiteline dönüştüğü durumda epitel hücreleri artık MMP-7 üretememekte ve savunma fonksiyonlarını yitirmektedir. GAP ve KP'li gruplarda gözlenen daha yüksek TIMP-1 seviyeleri araştırmacılara göre konağın kendisini MMP'lerin daha ileri doku yıkıcı etkilerinden korumak amacıyla doku inhibitörlerini üretmesi şeklinde yorumlanmıştır.

Soell ve ark. tarafından yapılan çalışmada sağlıklı ve periodontitisli örneklerde MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 metalloproteinazları seviye, aktivite ve aktif formlarının yüzdesi, TIMP-1 ve TIMP-2 seviye, cathepsin-C ise aktivite açısından aynı dişeti örneklerinde ve karşılık gelen oluk sıvılarında karşılaştırılmışlar, hem oluk sıvısı hem de dişeti örneklerinde MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 seviyelerinde artış, buna karşılık TIMP-1 ve TIMP-2 seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. Araştırmada doku yıkımının MMP'lerin latent formlarının ani aktivasyon kazanmasından çok, doku inhibitörleri ile MMP'ler arasındaki dengenin bozulmasıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [186].

Alpagot ve ark. çalışmalarında belirli periodontitisli bölgelerde ataşman kaybının değerlendirilmesinde dişeti oluk sıvısı MMP-3 ve TIMP-1 seviyelerinin prognostik yönünü araştırmışlardır. Bu amaçla aynı bireyin sağlıklı ve periodontitisli ikişer bölgesinden başlangıç, 3. ay ve 6. ayda dişeti oluk sıvısı örnekleri almışlardır. Periodontitisli bölgelerde MMP-3 ve TIMP-1 seviyeleri sağlıklı bölgelere göre daha fazla bulunmuştur. MMP-3 ve TIMP-1 seviyeleri periodontitisli bölgelerde anlamli düzeyde farklı bulunurken, sağlıklı bölgelerde fark görülmemiştir. Ataşman kaybının devam ettiği aktif bölgelerde MMP-3 ve TIMP-1 seviyelerinin pasif bölgelere göre anlamli düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. Araştırmacılar MMP-3 ve TIMP-1 seviyeleri ile birlikte sigara

kullanımın ve yaşı periodontitisli bölgelerin prognozunu değerlendirilmesinde önemli parametreler olduğu sonucuna varmışlardır [4].

Matriks Metalloproteinaz Aktivitesi ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklarda matriks metalloproteinazlar sitokin hareketinin ve osteoklast aktivasyonunun modifikasyonunda olduğu kadar koruyucu serpinler, bazal membran ve ekstraselüler matriks yıkımında anahtar role sahiptirler [184]. Az sayıda periodontal patojenin (Pg ve Aa gibi) bakteriyel kollajenaz üretme yeteneğine sahip olduklarının [188] bilinmesiyle birlikte bu kollajenazların doku yıkımında majör role sahip olmadıkları düşünülmektedir.

Ekstraselüler matriks yalnızca kollajen fibrillerden değil, kollajenazın kollajen substrata erişimde ilk olarak kaldırılması gereken yapılar olan proteoglikanlar ve fibronektinden oluşur. MMP-3 (stromelizin) proteoglikanların ve fibronektinin yıkımında etkilidir. Hem yerleşik dişeti hücreleri hem de periodontal ligaman hücreleri normal doku turnoverında gerekli olan kollajenazları üretirler. Nötrofil ve makrofajlar gibi iltihapsal hücreler matriks metalloproteinazlar üretirler. Bu hücrelerden nötrofiller periodontitis gibi iltihapsal hastalıklarda jelatinaz ve kollajenaz enzimlerinin en önemli kaynağıdır. Ayrıca epitel hücreleri kollajenaz üretimiyle mevcut enzim seviyelerini artırarak bağlantı epitelinin apikale göçünü ve daha sonra gelişen bağ dokusu yıkımını kolaylaştırırlar. Uitto ve ark. 1998'de yayınlanan çalışmalarında proenflamatuar sitokin olan TNF- α 'nın cep epiteli hücrelerinden MMP-13 üretimini uyardığını bildirmişlerdir [206]. Matriks metalloproteinazların periodontal yıkımdaki rolleri pek çok araştırmacı tarafından saptanmıştır. Bu çalışmalarda kültür ortamında dişeti örneklerinde artmış kollajenaz seviyeleri, periodontal ceplerden alınan oluk sıvısı örneklerinde ve komşu iltihaplı dokularda latent enzim formlarının değil ama aktif formların artmış değerleri [72;107] ve periodontal lezyonlardan elde edilen dişeti fibroblastları ve periodontal ligaman hücreleri ile keratinosit, endotel hücreleri, osteoblastlar, hatta osteoklastlarda matriks metalloproteinaz messenger mRNA'sının varlığı gösterilmiştir. İltihapsal hücrelerden özellikle nötrofiller matriks metalloproteinazlara bağlı periodontal doku yıkımında özellikle önemli yere sahiptirler [107]. Tüm bu çalışmalara ek olarak doksisisiklin gibi eksojen matriks metalloproteinaz inhibitörlerinin insanlarda ve deney hayvanlarında

periodontal yıkımı geciktirmeleri proteinazların bu patolojik olaydaki rollerini destekler [21;64;139] Ramamurthy ve ark. tarafından yapılan çalışmada ilk defa tetrasiklin türevleri harici ilaçlar (CH1766:merkaptosil grubu CH 6631:non-peptidik hidroksamik asid) MMP inhibitörü olarak değerlendirilmiştir [139]. Golub ve ark. (1995) çalışmalarında erişkin periodontitisli bireylerin inflamasyonlu dişeti örneklerinden elde edilen kollajenaz ve jelatinazların çoğunun yerleşik hücreler (epitel, fibroblast) veya makrofajlar tarafından değil bölgeye göç eden PMN-lökositler tarafından üretildiğini bildirmişlerdir. Araştırma farmakolojik seviyelerdeki doksisisiklinin direkt olarak patolojik olarak artmış seviyedeki konak kaynaklı MMP'leri inhibe ederken bakteriyel kaynaklı kollajenazlar üzerinde böyle bir etkileri olmadığı sonucuna varmıştır [71]. Erişkin periodontitisli bireylerde yapılan çalışmalarda [117;130] dişeti oluk sıvısında bulunan aşırı miktarda fazla aktif kollajenin kaynağının nötrofil tip matriks metalloproteinaz (MMP-8) ve jelatinaz (MMP-9) olduğu sonucuna varılmıştır. Yine aynı hasta grubunda dişeti oluk sıvısında fibroblast tip kollajenaz (MMP-1) proteini ve doku örneklerinde yine aynı kollajenazın messenger RNA'sına rastlanmıştır. Sorsa ve ark. tarafından 1999'da yayımlanan çalışmaya göre fibroblastlar gibi mezenkimal hücrelerin lipopolisakkarid ve IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerle karşılaşmaları halinde MMP-8 eksprese etme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir [34]. De Carlo' nun araştırmasına göre *P. gingivalis*'ten elde edilen bakteriyel tiol proteinazların fibroblastlarda ve epitelyal hücrelerde yıkıcı matriks metalloproteinazların ve kollajen yıkan fenotiplerinin üretimine neden olur [41]. Haerian tarafından 1995'te yayımlanan çalışmada [77] hastaların sağlıklı, gingivitisli ve periodontitisli bölgelerinden alınan oluk sıvısı örnekleri değerlendirilmiş ve fibroblast tip kollajenazın mevcut örneklerin yalnızca %20'sinde ayırt edilebilir düzeylerde olduğu ve hastalığın şiddetiyle korelasyon göstermediği bulunmuştur. Western blot analiz yönteminin kullanıldığı bir başka çalışmada MMP-8, MMP-13 ve MMP-1'in dişeti oluk sıvısındaki total kollajenaz miktarına göre oranları sırayla %94-96, %3-4, %0-1 olarak belirlenmiştir [148].

MMP İnhibitörleri

Matriks metalloproteinaz inhibitörlerinin patogenezdaki önemi bağ dokusu yıkımının aktif matriks metalloproteinazlar ile bunların endojen inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması sonucu gerçekleşmesiyle alakalıdır.

Bağ dokusunun proteolitik yıkımının durdurulması veya geciktirilmesinde yetersiz miktardaki doğal veya doku inhibitörlerinin kompanse edilmesi terapötik bir öneme sahiptir. Bu inhibitörlerin eksojen olarak yerine koyulmasında çeşitli stratejiler geliştirilebilir. Örneğin;

- enzimlerin sentez veya salınımının inhibe edilmesi
- latent enzimlerin aktivasyonunun engellenmesi
- olgun matriks metalloproteinazların aktivasyonunun inhibe edilmesi
- endojen doku inhibitörlerinin uyarılması
- konak endojen inhibitörlerinin proteolitik aktivasyondan korunması [151].

Matriks metalloproteinazların endojen inhibitörleri matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP'ler) ve α 2-makroglobulindir. α 2-makroglobulin MMP'lere kovalent olmayan bağlarla bağlanır. Doku inhibitörleri MMP aktivitesini periselüler olarak kontrol altında tutarken, α 2-makroglobulin vücut sıvılarındaki MMP'ler üzerinde regülatör görevi yapar. İnflamasyon esnasında damar dışına çıkarak ekstraselüler matriks içinde de fonksiyon görebilir.

Matriks metalloproteinazların eksojen yollarla inhibe edilmesinde in vitro çeşitli ajanlar denenmiştir. Bunlar: Zn^{2+} ve Cu^{2+} şelasyon ajanları (EDTA ve 1, 10 fenantrolin), sülfür bazlı inhibitörler, fosforöz içeren peptidler, fosfonamid ve tripeptid fosfinat analogları, hidroksamid asid ürünleri, bifosfonadlar. Tüm bu ajanlar içinde güvenli ve etkin olabilecek tek ilaç olarak tetrasiklin analogları kabul edilmiştir [28;36;151]. İlk defa Golub tarafından 1987'de ilaç molekülünün A halkasının 4. karbonundan dimetil amino grubunun çıkarılmasıyla antibakteriyel özelliğinden arındırılarak elde edilen kimyasal olarak modifiye tetrasiklinler tanımlanmıştır. Tetrasiklinler iki yolla matriks metalloproteinaz inhibe ederler:

1- ekstraselüler matriks içinde aktif hale geçmiş olan matriks metalloproteinazları inhibe ederler. Bu yol tetrasiklinlerin Zn^{2+} ve Ca^{2+} bağlama özellikleriyle ilgilidir [70].

2- ekstraselüler matriks içinde pro-matriks metalloproteinazların aktif matriks metalloproteinazlara dönüşümünün engellenmesi [22;176].

Tetrasiklinlerin ekstraselüler matriks yıkımını indirekt yollarla engellediği bilinmektedir. Bir serum proteini olan $\alpha 1$ -antitripsin ($\alpha 1$ -proteinaz inhibitörü) konağın bir diğer doku yıkım proteinazlarından olan serin proteinazlara (özellikle PMN elastaz) karşı konağın önemli savunma sistemlerindendir. Matriks metalloproteinazların $\alpha 1$ -antitripsini yıktığı ve inaktive ettiği bilinmektedir. Dolayısıyla MMP'lerin tetrasiklinler tarafından inhibisyonu elastaza duyarlı substratları (elastik fibriller, fibronektin, proteoglikanlar ve MMP doku inhibitörleri) proteolitik ataktan korurlar [66]. Tetrasiklinlerin ekstraselüler matriks yıkımını inhibe ettiği bir diğer potansiyel mekanizma ise pro-TNF- α 'nın aktivasyonunun engellenmesi yoluyla kuvvetli sitokinlerin ve TNF- α 'nın oluşumlarının azaltılmasıdır .

2.10.1. Matriks metalloproteinazlar ve doku inhibitörleri

Bağ dokusunun remodelingi normal büyüme ve gelişim esnasında meydana gelir, ancak uzun yıllardan beri pek çok hastalık kollajen ekstraselüler matriksin yıkımıyla ilişkilendirilmektedir. Rezorpsiyon yerleşik bağ dokusu hücreleri ve inflamasyon durumlarında bölgeye göç eden hücreler tarafından meydana getirilir. Ekstraselüler matriksin moleküler organizasyonu hücre hareketlerini etkiler ve diferansiasyonun ve gelişimin pek çok aşamasında rol alır. Doku remodelingi büyük oranda enzimler, aktivatörler, inhibitörlerle, sitokin ve büyüme faktörleri gibi regülasyon moleküllerinin üretimiyle ilgili olan hücreyle-matriks ve hücreyle-hücre etkileşimleriyle regüle edilmektedir. Periodontal hastalık gibi çeşitli patolojik durumlarda hızlanan bağ dokusu yıkımı normal regülasyon mekanizmalarının işlememesiyle ilişkilendirilebilir.

Pek çok matriks yapı ve fonksiyonunun asıl belirleyeni protein içeriğidir. Doğal olarak da doku yıkım sürecinin anahtar enzimleri endopeptidazlar yani proteinazlardır. Matriks molekülleri 4 ana gruptan proteinazlar tarafından yıkıma uğratılabilirler (metallo, serin, sistein, aspartat aktif site residues). Bu enzimlerin

in vivo ortamda rolleri dokunun çevresel durumu, özellikle de inflamatuvar hücre varlığında hücre tipine göre değişir. İntraselüler yola göre ekstraselüler yolla gerçekleşen matriks turnover miktarı her duruma göre ayrı bir karakteristiğe sahiptir. Kemik yıkımı gibi özel durumlar haricinde ekstraselüler yıkımın genelde nötral pH'da gerçekleştiği varsayılır. Sonuç olarak metallo ve serin ailelerine ait proteinazlar fonksiyonda en fazla görev alan ve yıkımın başlangıç fazından en fazla sorumlu olan enzimlerdir.

Metalloproteinaz ailesinin üyeleri bağ dokusu hücrelerinin yanı sıra monosit ve makrofaj gibi hemopoietik hücreler, keratinositler, endotelial hücreler ve pek çok tümör hücresi tarafından sentezlenebilirler. Sinerjistik olarak doku matriksinin tüm makromoleküllerini sindirebilirler.

Metalloproteinaz ailesi şu alt gruplara ayrılır:

1-İnterstisyel kollajenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13

2-Jelatinazlar (Tip IV kollajenazlar): MMP-2, MMP-9

3-Stromelizinler: MMP-3, MMP-10, MMP-11

4-Membrana-bağlı grup: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17

Matrilizin (MMP-7) ve metalloelastaz (MMP-12) tam olarak bu gruplara uymazlar.

Latent Metalloproteinazların Etkin Proteinazlara Dönüşümü

Metalloproteinazların önemli özelliklerinden bir tanesi de latent proformlar halinde salgılanmaları ve sistein içeren propeptide sahip olmalarıdır. Bu sistein latent formlar içindeki aktif bölgede bulunan Zn^{++} (çinko)'ya bağlıdır. Plazminojen aktivatörü (uPA)'nın hareketi ile bir serin protein olan plazmin plazminojenden elde edilir. Çeşitli hücre modellerinde ve pek çok in vivo durumda kollajenaz ve stromelizin-1 aktivasyonunda uPA'nın etkili olduğu gösterilmiştir. Bu aktivasyon süreci plazminojen aktivatörünün reseptörüne bağlı olduğu hücre yüzeyinde veya yakınlarında gerçekleşir. Plazminin kendisinin matriks yıkımına yol açtığına dair yeterli kanıt yoktur.

Stromelizinler farklı substrat spesifitesine sahip pek çok protein tarafından aktive edilebilir. In vitro sistemlerde stromelizin-1 diğer durumlarda düşük aktiviteye

sahip kollajenazların etkin şekilde aktivasyonu için gereklidir. Stromelizin ayrıca jelatinaz-B (MMP-9)'nin için de etkili bir aktivatör olabilir. Periodontal patojenler tarafından salgılanan eksojen proteazların da prokollajenaz için aktivatör olabileceği son dönemde yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca bazı spesifik durumlarda diğer proteinazların da çoğunun aktivatör görevi yapabileceği gösterilmiştir.

Plazmin gibi proteinazlar gelatinaz-A için etkili aktivatörler değildir. Gelatinaz – A'nın aktivasyon mekanizmasıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Aktivasyon projelatinaz A'nın fibroblast membranlarıyla inkübasyonu ile gerçekleşir [92] ve C-terminal domain'in hücre yüzeyine bağlanmasını gerektirir [218]. Sato ve ark. [157] ile Cao ve ark. [27] yaptıkları çalışmalarda membran komponentinin yeni bir membrana bağlı metalloproteinaz tipi (MT-1 proteinaz, MMP-14) olduğunu açıklamışlardır. MT-1 proteinin ayrıca prokollajenazı aktive ettiği de bilinmektedir [93].

Metalloproteinazlar yaygın proteinaz inhibitörü α_2 -makroglobulin tarafından inhibe edilseler de dokulardaki asıl metalloproteinaz inhibitörleri metalloproteinaz doku inhibitörleridir. Doku inhibitörleri metalloproteinazlar ile yüksek afiniteye sahip, dönüşümsüz, kovalent olmayan bağlar oluştururlar. Diğer proteinaz sınıflarının inhibitörlerinden farklı olarak etkinliklerini belirleyen spesifik bir bölgeleri yoktur.

TIMP-1 makrofajlardan olduğu kadar pek çok bağ dokusu hücresi tarafından da sentezlenen ve salgılanan 30kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. TIMP-1 pek çok vücut sıvısında belirlenebilir. İnsan melanoma hücreleri tarafından salgılanan ve 21kDa ağırlığa sahip glikozlanmamış protein olan TIMP-2 ise TIMP-1 ile benzerlik gösterir, fakat farklı sekansa sahiptir. Bu nedenle de kontrol mekanizmaları farklıdır. TIMP-1 ile yalnızca %40 benzerlik göstermekle birlikte önemli yapısal özelliklerden biri olan altı disülfid bağı TIMP-2'de de mevcuttur. TIMP-2 gelatinaz-A'nın proformuna bağlanırken, projelatinaz B'ye bağlanamaz, projelatinaz-B ise TIMP-1'e bağlanabilir. Aynı ailenin bir diğer üyesi ise TIMP-3' tür ve ilk olarak tavuk hücrelerinden izole edilmiştir.

Metalloproteinazlar ve doku inhibitörlerinin sentezi hormonlar, sitokinler ve ekstraselüler matriks tarafından kontrol edilir.

MMP'lerin ve doku inhibitörlerinin bağ dokusu hücreleri tarafından sentezi ve salınımı sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar arasındaki karmaşık etkileşimler tarafından regüle edilir. Pek çok faktör monosit ve makrofajların ürünleridir ve iltihapsal durumlarda üretimleri metalloproteinaz sentezi ve doku yıkımının anahtar bir basamağıdır [146]. Metalloproteinazların regülasyonunda IL-1 özel bir öneme sahiptir. Ayrıca yapılan çalışmalarda TNF, prostaglandinler ve IL-10'un rolleri de gösterilmiştir [115]. İnsan fibroblast hücreleriyle yapılan çalışmalar IL- α 'nın IL- β 'den patogeneizde daha önemli olabileceğini bildirir [124;128]. Yeni membrana-bağı metalloproteinazlar da yine büyüme faktörleri tarafından regüle edilebilirler.

Transforming growth factor- β (TGF- β) sitokine bağlı metalloproteinaz ve doku inhibitörlerinin sentezini modül edebilme özelliği nedeniyle daha fazla önem kazanmaktadır. Doku inhibitörlerinin rolünün aktivasyon seviyesi ve substrat yıkımında metalloproteinaz aktivitesinin sıkı şekilde kontrolü olduğu düşünülmektedir [85]. Diğer proteinaz inhibitör sistemleri gibi metalloproteinazlar da yalnızca inhibitör konsantrasyonlarının enzimlere oranla daha düşük olduğu belirli yerlerde aktif olabilirler. Yapılan çalışmalar insan periodontal ligaman hücrelerinde proteinaz ve proteinaz inhibitörlerinin ekstraselüler matriks moleküllerinden fibronektin ve fibronektin fragmanları tarafından modüle edilebileceğini gösterir. Kapilla ve ark. fibronektin molekülünün bu yolla ligaman hücre fonksiyonlarını modüle edip, periodontal hastalığa katkıda bulunabileceğini bildirmiştir [92].

Dişeti dokusunda latent ve aktif halde bulunan kollajenazlar ile inflamasyon derecesi arasında ilişki bulunmuştur [130]. Kontrollü çalışmalarda kollajenaz aktivitesinin yalnızca dişeti dokusunda değil, aynı zamanda periodontitisli bireylerde dişeti oluk sıvısında da artış gösterdiği bulunmuştur [103;206]. Bu kollajenazın kısmen doku, daha çok da nötrofil kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Doku inhibitörlerinin yalnızca sağlıklı bireylerde veya klinik olarak sağlıklı bölgelerde tespit edilebileceği gösterilmiştir [103]. Lee ve ark. MMP-8 seviyesi ile hastalık aktivitesi arasındaki korelasyonu gösterirken [105], Hayakawa [84] hastalıklı bireylerde tükürük örneklerinde TIMP-1 düzeylerinin artmış olduğunu göstermiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre periodontal hastalık aktivitesi

metalloproteinazlar ile bunların doku inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması ile meydana gelir. Van der Zee'nin çalışmasında belirli durumlarda aktive olan prokollajenler için yumuşak bağ dokusunun bir depo görevi yaptığı belirtilmiştir [207]. Metalloproteinaz aktivitesinin çeşitli ilaçlarla kontrol altında tutulabileceği pek çok araştırmada gösterilmiştir [64;65;67;69;72]. Metalloproteinazların neden olduğu matriks yıkımının önlenmesinde şu stratejiler düşünülmüştür [150]:

1. metalloproteinaz aktivitesine yol açan ajanların bloke edilmesi
2. metalloproteinaz mesajlarının translasyonunun önlenmesi
3. proenzimlerin aktivasyonunun önlenmesi
4. aktif metalloproteinazların inhibisyonu
5. doğal inhibitörlerin regülasyonu (TIMP'ler)
6. ilk 5 stratejinin kombinasyonu

Günümüzde bu yollar içinde üzerinde en fazla araştırma yapılanı aktif metalloproteinazların inhibisyonudur. Başlangıçta tetrasiklinlerin MMP-8'i inhibe edici etkiye sahip olduğu düşünülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda doksisisiklinin Ca^{++} iyonunu bağlayıp latent metalloproteinazları proteolize daha duyarlı hale getirip enzimatik aktivite kaybına yol açtığı gösterilmiştir. Tetrasiklinlerin bir başka etki mekanizmasının sitokine bağlı metalloproteinaz üretimini etkilemeleri olduğu düşünülmektedir [5].

Tablo 2-3 Periodontal dokularda kollajen tiplerinin dağılımı [145]

Doku	Kollajen
Dişeti	I,III,IV,V,VI
Periodontal ligaman	I,III,IV,V,VI,XII
Alveol kemiği	I,III,V

Tablo 2-4 İnsan matriks metalloproteinazları sınıflama ve özellikleri

Gruplar	MMP numaralandırma ve adlandırma	Moleküler ağırlık		Matriks substrat grupları
		kDa proform	kDa aktif	
Kollajenazlar	MMP-1 fibroblast; CL1			Fibriler kollajenler
	MMP-8 nötrofil; CL2	55	45	Jelatinler
		75	58	
	MMP-13 CL3	65		Proteoglikan çekirdeği protein
Jelatinazlar	MMP-2 GLA	72	66	Tip IV kolajende spesifik lokus
Tip IV kollajenazlar				Jelatinler
	MMP-9 GLB	92	86	Tip V VII,X,XI kollajenler
				Elastin
Stromelizinler	MMP-3	57	45	Proteoglikan çekirdek proteini
		57	44	Ti IX kollajenin helikal-olmayan bölgeleri
		51		Tip X,XI kollajen

Periodontal Hastalık Tedavisinde Sistemik Antibiyotikler

Günümüzde periodontal tedavinin amacı hastalıkla ilişkili periodontal patojenlerin baskılanması veya tam olarak eradikasyonudur [174;179]. Mevcut tedavi seçenekleri ise bu patojenlerin eliminasyonunda farklı yeterliliğe sahiptir. Periodontal başlangıç tedavisi ile subgingival florada bulunan *Campylobacter rectus* tam olarak ortamdan uzaklaştırılabilirken [142], aynı tedavi seçeneğinde, *Bacteroides forsythus*, stafilokokci ve enterik çomaklar tam olarak uzaklaştırılamamakta [48;135;140;163] ayrıca *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [143;192;224] ve *Peptostreptococcus micros* [141] anlamlı düzeylerde azaltılamamaktadır. El aletleri ile yapılan mekanik temizliğin mevcut periodontal patojenleri tam olarak elimine edememesi veya yeteri kadar azaltamamasının sebepleri arasında;

-*A.actinomycetemcomitans*'ın subepitelyal dişeti dokuları içerisine invaze olabilme yeteneği, [29;134].

-*A.actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus micros* gibi bakterilerin oluk epiteline penetre olabilme özellikleri [44;55].

-*Porphyromonas gingivalis*'in kollajen dokuya bağlanma yeteneği [124].

-Sement ve kök dentini tubuluslarında meydana gelen yapısal değişimler [2;62].

-Bakterilerin sert subgingival birikintiler, el aletleri ile erişilmesi güç furkasyon bölgeleri ve diğer anatomik oluşumların içine yerleşmiş olmaları sayılabilir [122;161].

Sistemik antibiyotikler serum yoluyla periodontal dokular ve cep içerisine girerek, el aletlerinin veya topikal antibiyotiklerin ulaşamadığı organizmaları etkiler. Sistemik antibiyotik tedavisi ayrıca dil sırtı ve diğer oral yüzeylerdeki patojenleri de etkileyerek rekolonizasyonu geciktirir [123]. Sistemik antibiyotikler yine *A. actinomycetemcomitans* ve diğer patojenlerle ilişkili periodontal enfeksiyonların eliminasyonunda gerekli olabilir. Periodontopatojen mikrofloranın farklı antibiyotik duyarlılığına sahip pek çok mikroorganizma türünü içermesi ve ancak belirli birkaç durumda klinik göstergelerin patojen mikroflora hakkında fikir

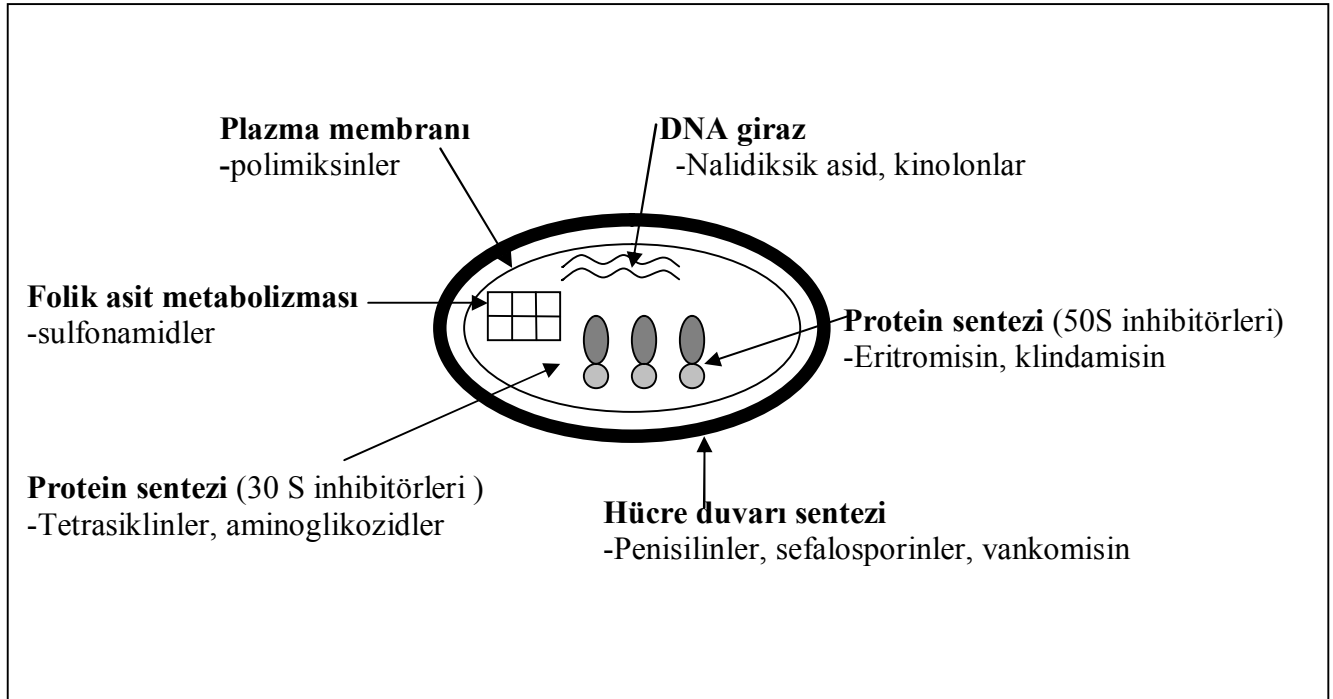
vermesi nedeniyle yanlış antibiyotik tercihi yapılabilir. Bu durum insanlarda faydalı mikrobiyal ekolojinin zarar görmesine ve dirençli türlerin ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu nedenle en uygun antibiyotik seçiminde ideal olan mikrobiyolojik analiz ve antibiyotik duyarlık testlerinin yapılmasıdır [11;47;195]. Mikrobiyolojik analiz özellikle geleneksel periodontal tedaviye cevap vermeyen ve çeşitli mikroorganizma komplekslerinin birarada bulunduğu periodontal hastalık tiplerinde önerilmektedir. Ayrıca uygun antibiyotik seçiminde bireyin genel sağlık durumu ve antibiyotiklerin muhtemel yan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Günümüze dek periodontal tedavide pek çok antibiyotik sistemik olarak uygulanmış ve bunların klinik, mikrobiyolojik ve radyografik parametreler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu antibiyotikler içinde penisilinler, tetrasiklinler, metronidazol ve klindamisin en sık kullanılanlardandır. Periodontitis lezyonları genellikle karışık patojen bakteri kompozisyonu içermektedir. Bu nedenle de periodontal tedavide kombine antibiyotik uygulamaları (metronidazol+amoksisilin, metronidazol+ciprofloksasin) giderek artan bir öneme sahiptir [169;170].

Antibiyotiklerin kullanımı, dozaj, uygulama yolu ve sıklığının belirlenmesinde ilacın farmakolojik özellikleri önemlidir. İlacın önemli farmakolojik özellikleri arasında absorpsiyon derecesi, metabolizma oranı ve enfeksiyon bölgesinde etkin antimikrobiyal seviyeyi koruma süresi sayılabilir. Etkin antimikrobiyal seviyenin korunabilmesi için penisilinler ve klindamisin günde üç defa, metronidazol, ciprofloksasin ve eritromisin günde iki defa, doksisisiklin ve azitromisinin ise günde bir defa alınması yeterlidir. Tenenbaum ve ark. yaptıkları çalışmada Amoksisilin - klavulanik asidin ilacın birkaç doz kullanımı sonrası dişeti oluk sıvısında periodontal patojenlerden *Prevotella intermedia*'nın MİK düzeyinin üzerine çıkabildiğini göstermişlerdir [199]. Metronidazol kolaylıkla dişeti dokusu ve dişeti oluk sıvısında etkin antibakteriyel konsantrasyonlara ulaşabilmektedir [24;109;208]. Azitromisin hem sağlıklı hem de hastalıktan patolojik olarak etkilenmiş dokulara iyi düzeyde penetre olma özelliği gösterir [19]. Daha önceki görüşün aksine Sakkelari ve ark. yaptıkları çalışmada sistemik uygulanan tetrasiklinin dişeti oluk sıvısı konsantrasyonunun plazma konsantrasyonundan az

olduğunu ve bireyler arasında oldukça farklı değerlere (0-8µg/ml) rastlandığını bildirmiştir [153]. Çalışmaya dahil edilen örneklerin yaklaşık %50'sinde 1µg/ml'lik konsantrasyon değerleri elde edilememesi sistemik tetrasiklin uygulama sonrası elde edilen farklı klinik yanıtlara bir açıklama olarak değerlendirilmiştir. Sistemik antibiyotik uygulamalarının radyografik olarak izlenen alveol kemiği düzeyini de artırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda araştırmacılar 7-10 günlük metronidazol veya 12 günlük tetrasiklin kullanımının % 25-30' dan daha az alveol kemiğine sahip bölgelerin oranını azaltıp, daha fazla kemik volümü bulunan bölge sayısını artırdığını bildirmişlerdir [158;203].

Antimikrobiyaller:



Şekil 4: Majör antibiyotiklerin etki mekanizması [213]

2.12.1. Antibiyotik türleri

Bazı antimikrobiyal ajanlar konak hücrelerinde olmayan bazı yollarla mikroorganizmaların metabolizmalarını bozarlar. Antimetabolitler olarak bilinen bu ajanlar bazı mikrobiyal enzimler için inhibitör görevi görür veya mikroorganizma için toksik olan bazı bileşiklerin oluşmasına yol açarlar.

Bakteri hücre duvarının önemli bir yapısal komponenti peptidoglikanlardır. Peptidoglikanlar peptid-yan zincirleri ile birbirine bağlıdır. Bu amin zinciri β -laktam antibiyotikleri (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve penemler) için hedef teşkil ederler. Gram-pozitif bakteriler üzerine etkili olan diğer hücre duvarı inhibitörleri ise (vankomisin) peptidoglikan sentezini önlerler. Bir başka antibiyotik grubu ise (naladiksik asit, oflaksosin, ciprofloksasin) bakteri DNA'sı için yüksek oranda öldürücü olan DNA giraz enzimi yoluyla etkisini gösterir. Bir grup antibiyotik ise bakteri protein sentezini inhibe eder (aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol). Farklı antibiyotik grupları bakteriler üzerine farklı yollarla etki ederler (Şekil 4). Sonuç olarak bazı antibiyotikler bakteri türlerinin küçük bir kısmı üzerine etkilidir ve dar-spektrumlu antibiyotikler olarak adlandırılır, diğerleri ise daha çok sayıda bakteri türü üzerine etkilidir ve geniş-spektrumlu antibiyotikler olarak adlandırılırlar.

İdeal bir antimikrobiyal ajanda bulunması gereken özellikler şunlardır:

Mikroorganizma üzerine selektif toksisite göstermelidir, ökaryotik hücrelere toksik olmamalıdır.

Bakteriostatik olmaktan çok bakterisid olmalıdır.

Vücut sıvılarında yüksek oranda dilüe edildiği zaman dahi aktivitesini koruyabilmelidir.

Yeteri kadar uzun süre aktif kalabilmelidir.

Konak savunma sistemine yardımcı olmalı ve tamamlayıcı görevi görmelidir.

Allerjiye sebep olmamalıdır.

Kommensal mikroflorayı ciddi oranda bozacak etkiye sahip olmamalıdır.

Diğer ilaçlarla minimum düzeylerde etkileşime girmeli, yan etki göstermemelidir [213]

2.12.1.1. Aktivite

İdeal bir ajan patojen mikroorganizmaları hasara uğrattırken, kommensal flora üzerine minimal etkiye sahip olmalı. Tercihen antibiyotik hızlı bakterisid etkiye sahip olmalıdır. İlacın aktivitesi dirençli mikroorganizmaların varlığı ile azalabilir.

2.12.2. Toksisite

Bütün antibiyotikler için konak dokuları üzerine düşük toksisiteye sahip olması önemli bir kriterdir. Minör düzeydeki yan etkiler daha yaygınken, daha şiddetli yan etkiler kalıcı hasara yol açabilir (örn.: gentamisine bağlı duyma kaybı). Metronidazol gibi bazı antibiyotikler ise indirekt toksisiteye sahiptirler ve teratojenik etkileri bulunur (fetüse zararlı). Tetrasiklinler ise hamile kadınlarda kullanımı sonrası kemik gelişimi ve diş dokuları üzerine istenmeyen etkiler gösterir [213].

2.12.3. Farmakoloji

Antimikrobiyal ajanın absorpsiyonu vücut sıvılarında ve dokularda dağılımı, metabolizması ve itrahi ajanın etken mikroorganizmaya hızla ulaşım, yeteri kadar uzun süre belirli bir konsantrasyonda kalabilmesine izin verecek şekilde olmalıdır. Antibiyotığın kandaki seviyesi in vitro minimum inhibitör konsantrasyonunun 2-8 katı fazla olmalıdır.

2.12.3.1. Antimikrobiyal tedavide farmakokinetik değişkenler:

İlacın infeksiyon bölgesine difüzyonu: çevre dokuların lipid çözünürlüğüne, asidik ortamda erime oranı ve pH'sına göre değişir.

Plazma proteinlerine bağlanma: yalnızca serbest antimikrobiyal ajanlar dokulara difüze olabilirler. Vücut proteinlerine bağlanma oranı doksisiklin, klindamisin ve bazı penisilinler için %80-96'dan ciprofloksasin, amoksisilin ve metronidazol için %25 ve aşağısına kadar değişkenlik gösterir.

İnokulum etki: yoğun mikrobiyal popülasyon nedeniyle antibiyotiğin optimal etkisinin azalmasıdır. Mikrobiyal yoğunluğun azaltılması (dış yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemleri ile) inokulum etkiyi azaltır.

2.12.4. İlaç dozu

Bir antimikrobiyal ajanın optimal dozu konağın doğal mikrobiyal florasına en az hasarın verilerek maksimum klinik yararın elde edildiği miktardır. Pek çok antimikrobiyal ajanın başarısında önemli bir nokta ilacın serum konsantrasyonu ve enfeksiyonun bulunduğu dokudaki seviyesidir. Kısa süreli tedaviler ilacın toksik ve allerjik yan etkiler gösterme olasılığını azaltacaktır [213].

2.12.4.1. Orofasiyal enfeksiyonlarda ilaç dozu esasları:

Metronidazol ve florokinolonlar gibi konsantrasyona-dayalı antibiyotiklerde β -laktam antibiyotiklerinden farklı olarak kısa süre içinde yüksek doz uygulanmalıdır.

Özellikle tetrasiklinler için yükleme dozu uygulanmalıdır.

Doku bariyerlerinin aşılabilmesi için MİK'in 2-8 katı kadar fazla kan seviyesi elde edilmelidir.

Etkin kan seviyelerinin muhafaza edilebilmesi için, penisilin ve sefalosporin gibi zamana-bağılı antibiyotikler sık aralıklarla kullanılmalıdır.

2.12.4.2. Antibiyotik kombinasyonları

Bazı enfeksiyonlarda tekli antibiyotik tedavisi hastalığın kontrol altına alınmasında yeterli olmayabilir. Bu durumda farklı antibiyotiklerin kombine edilmesi gerekebilir.

İki antimikrobiyal ajan bakteri metabolizmasına farklı noktalarda etki ederek patojen üzerinde sinerjistik etki gösterebilir. Örneğin metronidazolün, amoksisilin ile veya ciprofloksasin ile kombinasyonunda *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'a karşı sinerjizma elde edilir. İki antibiyotik arasındaki sinerjistik etkileşim nedeniyle iki antimikrobiyal ajanın MİK konsantrasyonları anlamlı düzeyde azalır. Metronidazol ile amoksisilin'in farmakolojik özellikleri, DOS, serum konsantrasyonları Tablo 2-5'te ifade edilmiştir.

Antibiyotiklerin etkileşimi:

Bakteriostatik + bakteriostatik ajan: genellikle etkinlik artar

Bakterisid + bakteriostatik: sıklıkla antagonistik etki

Bakterisid + bakterisid etki: sinerjistik etki

Tablo 2-5 Metronidazol–Amoksisilin farmakokinetik özellikleri, DOS, SERUM konsantrasyonları [155]

	METRONİDAZOL	AMOKSİSİLİN
Serum proteinlerine bağlanma oranı (%)	<20	20
Serum pik seviyesi (µg/ml)	12	6,15
Pik konsantrasyonu erişim süresi (saat)	1	1.5
Yarılanma ömrü (saat)	8	1-1.2
Standart dozlarda (250mg, 3x1) serum seviyesi (µg/ml)	14.3	5.5-7.5
Standart dozlarda (250mg, 3x1) DOS seviyesi(U/mL)	13.7	3-4

Periodontal tedavinin sistemik antibiyotik uygulamaları ile desteklenmesini gerektirebilecek durumlar:

-İyi yapılmış geleneksel periodontal tedaviye rağmen ataşman kaybının devam ettiği durumlar

-Geleneksel periodontal tedavi ve periodontal cerrahiye cevap vermeyen durumlar

-Agresif periodontitisler (lokalize agresif periodontitis, generalize agresif periodontitis)

-Periodontal hastalık için hazırlayıcı rol oynayan sistemik hastalıklar

-Akut periodontal enfeksiyonlar (periodontal abse, ANUG, NUP) [61]

2.12.5. Kombine antimikrobiyal tedavi

Oral enfeksiyonlardaki subgingival mikroflora farklı antimikrobiyal duyarlılığa sahip pek çok türden oluştuğu için tedavinin etkinliğinin artırılmasında iki veya daha fazla antibiyotiğin birlikte kullanılması yararlı olabilir [210].

Amoksisilin ve klavulanik asid: klavulanik asid amoksisilini bakteriyel penisilinazların enzimatik yıkıcı etkisinden korur. Bu şekilde korunmuş amoksisilinden etkilenen bakterilerin gram pozitif ve gram negatif bakteriler olduğu düşünülmektedir. Bu kombinasyonun inatçı periodontitislerin tedavisinde klinik başarıya sahip olduğu gösterilmiştir [32;113;114;217].

Metronidazol: Çalışmalar metronidazolün amoksisilin veya amoksisilin-klavulanik asid ile kombinasyonunun agresif periodontitis ve inatçı periodontitisli bireylerin tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir [211;212]. *A. actinomycetemcomitans*'a karşı tek başlarına etkisizken, metronidazol ve hidroksimetaboliti amoksisilin ile kombine edildiğinde sinerjistik etki gösterir [133]. Metronidazol gram negatif bakterilerin çoğu üzerine etkiliyken, amoksisilin fakültatif ve aerob bakteriler üzerine etkilidir. Bu durum bu iki antibiyotiğin kombinasyonunu periodontal enfeksiyonlar gibi karışık enfeksiyonlara karşı kıymetli kılmaktadır [210].

2.12.6. Agresif Periodontitisli Bireylerde Farklı Sistemik Antibiyotik Uygulamaları

Sigusch ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı antibiyotik preparatlarının desteği ile birlikte uygulanan iki aşamalı periodontal başlangıç tedavisinin klinik, mikrobiyolojik parametreler ile birlikte dişeti oluk sıvısı polimorfonükleer nötrofillerin fagositik kapasitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Doksisisiklin, metronidazol ve klindamisin ile antibiyotik uygulanmayan toplam 4 grubun 6 ve 24 aylık takipleri yapılmıştır. Bu gruplar içerisinde metronidazol ve klindamisin uygulanan grupta anlamlı düzeyde fazla klinik ataşman kazancı meydana gelmiştir. Metronidazol ve klindamisin kullanılan gruplarda *Porphyromonas gingivalis* ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* neredeyse tamamen elimine edilmiştir. Doksisisiklin kullanılan grupta Aa 24. ayda tedavi öncesi değerlere dönerken Pg düzeyleri de yine tedavi öncesi değerlere yaklaşmıştır. Araştırmacılar metronidazol ve klindamisin periodontopatojen bakterilerin subgingival bölgelerde eradikasyonu ve konak yanıtının artırılmasında, ayrıca anlamlı düzeyde ataşman kazancı elde edilmesinde doksisisiklin ve antibiyotiksiz tedaviye göre daha etkili olduğunu belirtmişlerdir [164].

Xajigeorgiou ve ark. tarafından yapılan çalışmada generalize agresif periodontitisli bireylerde farklı antibiyotik uygulamalarının (metronidazol+amoksisilin, metronidazol, doksisisiklin) klinik ve mikrobiyolojik parametreler üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiş. Birinci gruba periodontal başlangıç tedavisi bittikten hemen sonra metronidazol (500 mg 3x1, 7 gün) + amoksisilin (500 mg 3x1, 7 gün), ikinci gruba doksisisiklin (100 mg, ilk gün 200 mg yükleme dozu, 2 hafta), üçüncü gruba yalnızca metronidazol (500 mg 3x1, 7 gün) uygulanmış. Çalışmaya antibiyotik uygulanmayan bir de kontrol grubu dahil edilmiş. Tüm gruplarda sondalanabilir cep derinliğinde anlamlı düzeyde fazla ve gruplar arasında benzer miktarda sığlaşma elde edilmiş. Metronidazol+amoksisilin ve metronidazol gruplarında >6 mm cep derinliğine sahip bölge yüzdesinde kontrole göre anlamlı fazla azalma izlenmiş. Çalışmada tedavi öncesi mikrobiyolojik incelemede Aa serotip b'ye tüm deneklerin %81'inde rastlanmıştır. Yalnızca başlangıç tedavisi uygulanan grupta varlığı araştırılan patojenler arasında tedavinin yalnızca Pg üzerindeki etkileri 6. ayda da devam

etmiş. Aa kolonilerinde ise tedavi öncesi değerlere dönme eğilimi gözlenmiş. Aynı grupta Tf ve Td düzeylerinde tedavi ile birlikte azalmaya rastlanmamış. Antibiyotik grupları arasında yalnızca metronidazol+amoksisilin grubunda tedavi sonrası 6. haftada tüm patojenlerde anlamlı azalma gözlenmiş. Yalnızca başlangıç tedavisi uygulanan grupta Aa düzeylerinde azalmaya rastlanmamasına karşın kombine antibiyotik grubunda meydana gelen azalma 6 ay devam etmiş. Doksisiklin uygulanan grupta Pg, Tf ve Td düzeylerinde tedavi sonrası 6. haftada anlamlı azalma meydana gelirken aynı sonuçlara Aa ile ilgili olarak rastlanmamış. Metronidazol uygulanan grupta Pg, Tf ve Td prevalans ve düzeylerinde meydana gelen anlamlı azalmanın 6 ay devam ettiği belirlenirken, aynı ilacın Aa düzeylerinde ise yalnızca başlangıç tedavisi uygulanan grupla benzer sonuçlar verdiği saptanmıştır. Çalışmanın 6. ay verilerine göre antibiyotik alımından sonraki incelemede belirlenen bakteri prevalans ve düzeylerindeki azalmanın yalnızca metronidazol + amoksisilin ve metronidazol gruplarında benzer düzeyleri koruduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar metronidazol+amoksisilin kombinasyonunun Aa, Pg, Tf ve Td' yi anlamlı düzeyde azalttığını, aynı etkinin metronidazolün tek başına kullanımı ile elde edilemediğini bildirmişlerdir. Çalışmada bakteriyostatik etkili antimikrobiyallerin biofilm infeksiyonlarının tedavisinde generalize agresif periodontitisli hasta grubunda uygun seçenek olmadığı bildirilmiştir [227].

2.12.7. Metronidazol+Amoksisilin Kombinasyonu ile İlgili Çalışmalar

Pek çok araştırma periodontal tedaviye destek olarak metronidazol + amoksisilin kullanımının oldukça iyi sonuçlar vadettiğine dair veri sunmaktadır. Bu kombinasyonun özellikle lokalize agresif periodontitis ve mikrofloralarında Aa'nın dominant olduğu bireylerde oldukça başarılı olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [57;133;201;212;223;224].

Van Winkelhoff ve ark. 11 lokalize juvenil periodontitis ve 11 hızlı ilerleyen periodontitisli bireyi dahil ettikleri çalışmalarında standart kültür yöntemi ile *A. actinomycetemcomitans* ile birlikte *Bacteroides gingivalis* ve *Bacteroides intermedius* sayılarını kombine antibiyotik tedavisi ile desteklenen periodontal başlangıç tedavisi öncesinde ve sonrası 2-4. aylar ile 9-11. aylarda değerlendirmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre tedavi öncesi toplanan subgingival

örneklerin tamamında mevcut olan Aa'ya, 2-4. aylarda ve 9-11. aylarda rastlanmamıştır. *Bacteroides gingivalis* yine tedavi sonrası izole edilememiştir. *Bacteroides intermedius* ise altı bireyde tedavi sonrası düşük seviyelerde izole edilebilmiştir. Araştırmacılar Aa ile enfekte periodontitisli bireylerin tedavisinde metronidazol + amoksisilin kombinasyonunun etkin olduğunu bildirmişlerdir. [211].

Van Winkelhoff ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı periodontitis tiplerinde periodontal başlangıç tedavisiyle birlikte metronidazol + amoksisilin kombinasyonunun *A.actinomycescomitans* üzerine etkinliği araştırılmış. Çalışmaya lokalize juvenil periodontitis, erişkin periodontitis ve inatçı periodontitisli toplam 118 birey dahil edilmiş. Yapılan mikrobiyolojik incelemede Aa'nın yanı sıra siyah pigmentli gram negatif anaerobların sayıları tedavi öncesinde ve tedavi sonrası 3. ve 9. aylarda değerlendirilmiş. Başlangıç tedavisi tamamlandıktan sonra bireylere metronidazol (250 mg, 3x1) + amoksisilin (375 mg, 3x1) 7 gün süreyle kullanılmış. Araştırmacılar şiddetli periodontitisli bireylerde subgingival *A.actinomycescomitans*'ın baskılanmasında kombinasyonun mekanik tedavi ile birlikte uygulamasının başarılı sonuçlarına dikkat çekmişlerdir [212].

Pavicic ve ark. in vitro çalışmalarında metronidazol, metronidazol hidroksimetaboliti ve amoksisilin'in birbirleri ile etkileşimlerini ve bu üç bileşiğin *A.actinomycescomitans* üzerine aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada her iki bileşiğin de (metronidazol ve karaciğerde üretilen metaboliti) amoksisilin ile sinerjizma gösterdiği gözlenmiştir. Araştırmacılar metronidazol ve amoksisilin birlikte kullanımında, ayrı ayrı gösterdikleri etkinin yanı sıra, hidroksimetabolitin de kombinasyonla sinerjistik özelliğinin özellikle karışık anaerobik enfeksiyonlarda katkıda bulunduğunu göstermektedir. Yine araştırmacılara göre Aa'nın belirli suşlarının metronidazole duyarlı olmamaları, buna karşın bazı kişilerde metronidazolün periodontal ceplerden Aa'yı etkin şekilde elimine edebilmesi metronidazol ve hidroksimetabolitin sinerjistik etkileşimleri ile açıklanabilir [133].

Flemmig ve ark. daha önce tedavi olmamış 48 erişkin periodontitisli bireyi yalnızca mekanik tedavi ve mekanik tedavi sonrası kombine antibiyotik

uygulanacak iki gruba ayırdıkları çalışmalarında tedavi öncesi, tedavi sonrası 10. gün, tedavi sonrası 3, 6, 9, 12. aylarda subgingival bölgelerle birlikte dil dorsumu, tonsiller, yanak mukozalarının dahil olduğu müköz membranlardan plak örnekleri toplamışlardır. Örnekler PCR (polimerase chain reaction) yöntemiyle incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre sistemik metronidazol + amoksisilin uygulaması Aa'yı oral kaviteden uzun dönem uzaklaştırabilirken, aynı başarılı sonuçlara Pg ile ilgili olarak rastlanmamıştır [57].

Aynı çalışmanın klinik tedavi sonuçlarının yine aynı takip dönemlerinde değerlendirildiği bölümünde ise başlangıç subgingival mikrobiyal analizlerinde Pg'den bağımsız olarak Aa' ya sahip olan bireylerde antibiyotik uygulanmayan bireylerle karşılaştırıldığında 2 mm ve üstü klinik ataşman kazancı olduğu ayrıca ataşman kaybı olasılığının da ataşman kaybı meydana gelen bölgelerde 0.8 mm oranında azaldığı bildirilmiştir. Başlangıç subgingival analizlerinde yalnızca Pg saptanan bireylerde ise ataşman kaybı riskinin arttığı görülmüştür [58].

Pavicic ve ark. çalışmalarında daha önceki periodontal tedavilere yeterli yanıt vermeyen A.a ile ilişkili periodontitisli bireylere periodontal başlangıç tedavisini takiben metronidazol (250 mg, 3x1, 7 gün) + amoksisilin (375 mg, 3x1, 7 gün) kullandırmışlar ve *A.actinomycescomitans*'ın uzun dönem rekolonizasyonunu araştırmışlardır. Araştırmaya göre bu kombinasyon *A.actinomycescomitans*'ı yalnızca periodontal bölgelerde değil dil, tonsiller bölge, yanak mukozası ve tükürükte de kültüre edilebilir düzeylerin altına indirebilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre uzun dönem takip sonrası Aa'ya bağlı rekolonizasyona oldukça nadir rastlanmıştır. Aa'nın eliminasyonu ile klinik parametrelerdeki iyileşme arasında da pozitif korelasyon görülmüştür [133].

Rooney ve ark. ilerlemiş kronik periodontitisli bireylerde sistemik metronidazol + amoksisilin kullanımının klinik ve mikrobiyolojik parametreler üzerine etkilerini inceledikleri çalışmaya 66 bireyi dahil etmişlerdir. Çalışmada biri metronidazol + amoksisilin (amoksisilin 250 mg kapsül, 3x1, 7 gün, metronidazol 200 mg tablet, 3x1, 7 gün), biri metronidazol + plasebo (metronidazol 200 mg tablet) uygulanan iki grup ile amoksisilin + plasebo(250 mg amoksisilin kapsül, 3x1, 7 gün) ve plasebo + plasebo kullandırılan toplam dört grubun klinik ve mikrobiyolojik parametreleri 0., 3. ve 6. aylarda değerlendirilmiş.

Aa, Pg, Pi oranlarına kültür yöntemiyle bakılmış, ayrıca total bakteri sayıları da kaydedilmiş. Çalışmada başlangıç Pg düzeyleri %27, Aa düzeyleri ise %11 olup istatistiksel analize izin vermeyecek kadar az bulunmuş. *P.intermedia* tür ayrımının yapılmadığı çalışmada *P.intermedia* grubu bakteri sayıları 3. ay analizlerde metronidazol + amoksisilin ve metronidazol gruplarında anlamlı daha az bulunmuş. Tüm tedavi grupları arasında metronidazol + amoksisilin grubunda bütün iyileşme parametreleri daha anlamlı olarak gözlenmiş. Araştırmacılar metronidazol + amoksisilin kombinasyonunu literatürle orantılı olarak klinik ve mikrobiyolojik anlamlı yararını bildirmişlerdir [149].

Serino ve ark. (2001) çalışmalarında klinik takiple inatçı periodontitis tanısı koyulmuş 17 birey üzerinde periodontal başlangıç tedavisini destekleme amaçlı sistemik antibiyotik tedavisinin etkinliğini klinik, radyografik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirmişler. Total bakteri miktarlarının yanısıra Aa, Pg ve Pi oranlarına kültür yöntemiyle bakmışlar. Denekler 2 hafta süren başlangıç tedavisi esnasında metronidazol (400 mg, 3x1) + amoksisilin (750 mg, 2x1) kullanmış. 3. yıl verilerine göre total bakteri miktarlarının başlangıç değerlerine döndüğü, Aa ve Pg miktarlarının arttığı, Pi miktarlarının ise değişmediği gözlenmiş. 3. ve 5. yıl takipler arasında meydana gelen ataşman kaybının 1. ve 3. yıldaki ile benzer özellik gösterdiği saptanmış. Araştırmacılar özellikle başlangıç tedavisi ile mekanik olarak yeteri kadar iyi temizlenemeyen kök yüzeyleri nedeniyle meydana gelen reinfeksiyonun önlenmesinde cerrahi müdahalenin gerekliliğini bildirmişlerdir [161].

Winkel ve ark. tarafından yapılan çalışmada başlangıç tedavisinin tamamlanmasından 6 hafta sonra gerekli bölgelerde tekrar başlangıç tedavisi uygulanmış olan ve beraberinde sistemik antibiyotik (metronidazol 375 mg, 3x1 + amoksisilin 250 mg, 3x1) veya plasebo kullanılan iki grup başlangıç ve ilaç kullanımını takiben 3. ay verilerine göre klinik ve mikrobiyolojik açıdan karşılaştırılmış. Total bakteri sayılarının yanı sıra *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Peptostreptococcus micros* ile *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oranları değerlendirilmiş. Araştırma sonuçlarına göre antibiyotik uygulanan grup tedavinin klinik sonuçları açısından daha başarılı bulunmuş. Ayrıca çalışmada amoksisilin ve metronidazol kombine kullanımının

Aa'yı kültüre edilebilir seviyelerin altına indirebildiği, varlığı araştırılan diğer patojenlerin ise oranlarını azalttığı saptanmıştır. Başlangıçta *P.gingivalis* ile enfekte bireylerde plasebo ile karşılaştırıldığında cep derinliğinde anlamlı daha fazla sığlaşmaya rastlanmıştır. *P.gingivalis* negatif bireylerde ise test ve plasebo arasında aynı parametre açısından fark görülmemiş. Araştırmacılar başlangıç tedavisine destek olarak kullanılan kombine metronidazol ve amoksisilin uygulamasının yalnızca başlangıç tedavisine göre daha iyi klinik ve mikrobiyolojik sonuçlar sunduğunu bildirmişlerdir [223].

Berglundh ve ark. tarafından metronidazol (250 mg, 3x1) + amoksisilin (250mg 3x1,) ile desteklenmiş periodontal başlangıç tedavisinin klinik ve mikrobiyolojik olarak, ayrıca iltihapsal lezyonlarda meydana getirdiği değişikliklerin saptanması amacıyla yaptıkları çalışmada plasebo ve ilaç kullanılan iki grup karşılaştırılmış. Total bakteri sayılarının yanısıra Aa, Pg ve Pi sayılarına bakılmış. Ayrıca rastgele seçilen bir interproksimal papil bölgesinden dişeti örnekleri alınmıştır. Araştırmacılar başlangıç tedavisine destek olarak metronidazol + amoksisilin kullanımının mevcut periodontal durumun iyileştirilmesinde, Aa, Pg, Pi gibi putatif periodontal patojenlerin eliminasyonu veya baskılanmasında, aynı zamanda iltihapsal lezyonun boyutlarının azalmasında kontrol grubuna göre anlamlı daha iyi sonuçlar sunduğunu bildirmişlerdir [15].

Haffajee ve ark. inatçı periodontitisli 14 bireyi dahil ettikleri çalışmada lokal (tetrasiklin fibril, 1 hafta) ve sistemik (amoksisilin 500 mg 3x1, 14 gün + metronidazol 250 mg 3x1, 14 gün) antibiyotik uygulamalarının bu bireylerde zaten azalmış olan subgingival kolonizasyonunu daha da geriye çekilip çekilemeyeceğinin, aynı zamanda oluşacak mikrobiyal değişimin periodontal destek dokuların stabilizasyonuna olan katkılarını değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada toplam 40 subgingival bakteri türünün varlığını checkerboard DNA-DNA hibridizasyon tekniğiyle araştırmışlar. Araştırmacılar kombinasyon tedavisinden klinik olarak en fazla yarar gören grubun *P.gingivalis* prevalansında azalma sağlanabilen grup olduğunu, bu grubu diğer siyah pigmentli bakteriler ve *T.forsythensis*'in azalma sağlanabildiği bireylerin takip ettiğini gözlemiştir. Araştırma sonunda inatçı periodontitisli bireylerin doğru antibiyotik

kombinasyonu ile tedavi edilmeleri sonucunda periodontal açıdan stabilite sağlanabileceği bildirilmiştir [83].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Gereçler

Aşağıda belirtilen cihazlar kullanılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforez Düzeneği, Minicell Primo Ec200, Thermoec

Örneklerin PCR’da incelenmesi aşamasında jelin yürütülmesinde kullanılmıştır

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, Ec250, E-C Apparatus Co

Elektroforez işlemi esnasında elektrik akımı sağlanmasında kullanılmıştır.

Anaerop Kavanoz, Oxoid

Petrilerin anaerop ortamda inkübasyonunda kullanılmıştır

Buzdolabı, Arçelik No Frost

Kültür ile tanı yönteminde kullanılan bası malzemelerin ve hazırlanmış besiyerlerinin muhafazasında kullanılmıştır.

Buz Yapıcı, Cornelius

DNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılmıştır.

Derin Dondurucu -70°C, Heraeus

Örneklerin PCR’da çalışılıncaya dek saklanmasında kullanılmıştır.

Distilel Su Cihazı, Ns 112, Nüve

Besiyerleri ve PCR karışımının hazırlanması aşamasında distile su elde edilmesinde kullanılmıştır.

Etüv, Memmert

İnokülasyonu yapılmış petrilerin Anaerop ve CO₂’li ortamda 37°Cde bekletilmesinde kullanılmıştır.

Güç Kaynağı, Edi

Hassas Terazı, Ax200, Shimadzu

Hassas terazı besiyerlerinin hazırlanması aşamasında kullanılmıştır.

Isısal Döngü Cihazı, Mastercycler, Eppendorf

PCR karışımının bakteri ekstraksiyonu eklenerek çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Kuru Blok Isıtıcı, Techne Db.2d

Laminar Flow, Heareus

Manyetik Karıştırıcı, Mk 418, Nüve

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması esnasında kullanılmıştır.

Otoklav Ot 4060, Nüve

Besiyerlerinin hazırlanma aşamasında gerekli olan materyallerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.

Otomatik Mikropipetler, Microlit

Ph Metre, Eutech

Polaroid Translüminatör, 6h20, Polaroid

Soğutmalı Santrifüj, Biofuge Pico, Heareus

DNA ekstraksiyonu aşamasında supernatant elde edilmesinde kullanılmıştır.

Su Banyosu, Bm 402, Nüve

DNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılmıştır.

2.1.2.20.Uv Kaynağı, Vilber Laurmat

UV ışığı elde edilmesinde kullanılmıştır.

Uv Lambası, 13203, Microbiologie

1-Elektroforez jelinin elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

2-Petrilerde üremiş olan bakteri kolonilerin fluoresans verme özellikleri açısından incelenmesinde kullanılmıştır.

Vorteks, Mix 20, Falc

VMG III taşıma sıvısı içine alınan subgingival plak örneklerinin vortekslenmesinde kullanılmıştır.

Mikroskop, Olympus Om System

Spiroketlerin sayılması için kullanılmıştır.

100'lük Mercek, Ea 100

Spiroketlerin sayılmasında mikroskopta bu büyütmede çalışılmıştır.

Fotoğraf Makinesi, Olympus (Mikroskop İle Bağlantılı)

Mikroskoptaki görüntülerin fotoğraflanmasında kullanılmıştır.

Gimza Boyaları (Gerekli Diğer Solüsyonlar)

Spiroket sayımında kullanılan lamaların boyanmasında kullanılmıştır.

Lamlar

Spiroket sayımı lamalar üzerinde, boyanmış bakterilerin mikroskopta sayılması ile gerçekleştirilmiştir.

Immersion Yağı, Olympus Optical Co, Ltd

Mikroskopik incelemede lamaların değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Çözeltiler

Agar, Merck (1.01613)

Taşıma için kullanılan transport sıvı ile PY buyyon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Agaroz, Sigma (A-9539)

Anaerogen, Oxoid (Ano25a)

Anaerop kavanozlarda anaerop ortam oluşturulmasında kullanılmıştır.

Anaerop İndikatörü, Oxoid (Br55)

Anaerop kavanozlarda anaerop ortam oluşumunun kontrolünde kullanılmıştır.

An Ident Diskleri, Oxoid (Adm62605)

Bakteri antibiyotik duyarlılık ve direncinin tespitinde kullanılmıştır.

Hazır Tanı Kitleri

Api20a, biomérieux.

Bakterilerin indol oluşumu ve asidifikasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Ksilen ve Ehrlich reagentleri ile birlikte kullanılmıştır.

İndol oluşumuna göre bakteriler *P.intermedia* ailesi olarak adlandırılmış ve tür ayrımı için PCR protokolüne sokulmuştur.

Apizym, Biomérieux

Bakterilerin enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Kit Zym A ve Zym B reagentleri içermektedir.

Referans kartlar ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

Asetik Asit Glacial, Merck (Um2789)

TAE tamponu 10x elde edilmesinde tris baz ve EDTA ile birlikte kullanılmıştır.

Bromfenol Mavisi, Merck (L307222)

Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltilerden yükleme tamponunun hazırlanmasında gliserol ile birlikte kullanılmıştır.

Kalsiyum Klorür, Riedel-De Haen (S260299)

Tuz stok solüsyonu II'nin hazırlanmasında diğer içerikle birlikte kullanılmıştır.

Dekstrozsuz Triptik Soyagar, Acumedia

Dntp Set, Fermentas

PCR aşamasında PCR karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Eskülin, Difco (015812)

Eskülinli buyyon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Etanol, Riedel-De Haen (32221)

Etidyum Bromid (2,7 Diamino-10,Ethyl-9phenyl-Phenanthridinium Bromide), Sigma (E-8751)

Agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Etilendiamintetraasetikasit (Edta), Sigma (4884)

DNA ekstraksiyonunda lizis tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

Fenilmerkürük Asetat, Sigma (P-5554)

Taşıma için kullanılan transport sıvı (VMGIII) hazırlanmasında kullanılan tuz stok solüsyonunun elde edilmesinde kullanılmıştır.

Ferrik Sitrat, Sigma (F6129)

Eskülinli buyyon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Glukoz, Sigma (G7528)

Glukozlu buyyon hazırlanmasında PY buyyon ile birlikte kullanılmıştır.

Hemin, Fluka (51280)

CDC anaerop kanlı agar besiyerinin hazırlanmasında sodyum hidroksid ilave edilerek ve distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

Hidroklorik Asit, Sigma (H 7020)

PCR 10X tampon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hidroklorik Asit, Riedel De Haen (30721)

Kovac's ayırıcı yapımında kullanılmıştır.

İzoamil Alkol, Sigma (I3643)

Kovac's ayırıcı yapımında kullanılmıştır.

Jelatin, Lachema (30963)

PCR 'da kullanılan PCR tampon 10x çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Potasyum Klorür, Lachema (30384)

PCR tampon çözeltisinin hazırlanmasında ulanılmıştır.

Laktoz, Sigma (L3625)

Laktozlu buyyon hazırlanmasında PY buyyon ile birlikte kullanılmıştır.

Maya Özeti, Merck (1.03753)

CDC anaerop kanlı agar besiyeri ve PY buyyon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Magnezyum Sülfat, Merck (A5882)

Tuz stok solüsyonu hazırlanmasında kullanılmıştır.

Mikrobank™, Pro-Lab Diagnostics 8pl.160)

Tanısı konulmuş bakteri suşlarının saklanması için kullanılmıştır.

Sodyum Klorür, Merck (1.06400)

Tuzlu su hazırlanmasında distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

P-Dimetilaminobenzaldehit, Sigma (D2004)

Kovac's ayırıcı yapımında kullanılmıştır.

Sellobioz, Sigma (C7252)

Sellobiozlu buyyon hazırlanmasında PY buyyon ile birlikte kullanılmıştır.

Sistein Hidroklorid, Merck (1.02839)

Taşıma için kullanılan transport besiyeri (VMGIII) hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sodyum Gliserofosfat, Merck (1.041264)

Taşıma için kullanılan transport besiyeri (VMGIII) için tuz stok solüsyonu II'nin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Taq Dna Polimeraz, Sigma (T8524)

PCR aşamasında PCR karışımında kullanılmıştır.

Tiyoglikallik Asit, Fluka (886509)

Taşıma için kullanılan transport besiyeri (VMGIII) hazırlanmasında kullanılmıştır.

Triptik Soy Agar, Merck (1.05458)

CDC anaerob kanlı agar besiyerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Triptoz, Merck (1.10237)

Taşıma için kullanılan transport besiyeri (VMGIII) hazırlanmasında kullanılmıştır.

Trisma Base, Sigma (T-8524)

PCR tampon 10x çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Triton-X100, Sigma (T8787)

DNA ekstraksiyonunda kullanılan çözeltilerden Lizis tamponunun hazırlanmasında kullanılmıştır.

Vankomisin, Fluka (94747)

Bakteri kolonilerinin *Porphyromonas* ve *Prevotella* cinsi olarak ayırımında kullanılmıştır.

Vitamin K₁, Liba Lab

CDC anaerop kanlı agar besiyerinin hazırlanmasında distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

Φxhaem, Fermentas (Sm0251)

Agaroz jelinin yürütülmesi esnasında kullanılmıştır.

Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Gereçler Kitler**Mmp-1 Sandwich Elisa Test Kiti, Chemicon**

Dişeti oluk sıvısı örneklerinde MMP-1 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır

TIMP-1 Sandwich Elisa Test Kiti, Biosource

Dişeti oluk sıvısı örneklerinde TIMP-1 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Distile Su Cihazı**Sarf Malzemeleri****Periopaper (Gingival Fluid Collection Strips, Proflow, Amityville)**

Dişeti oluk sıvısı örneklerinin elde edilmesinde kullanılmıştır.

Mikropipetler Ve Uçları**Yıkama Şişesi****Tüpler**

Eppendorf Tüpleri (1,5 Ml)

Dişeti oluk sıvısı örneklerinin emdirildiği kağıt striplerin saklanması kullanılmıştır.

Dereceli Silindir (500 Ml)**Polipropilen Test Tüpleri****Spektrofotometre Cihazı**

Kuyucukların içindeki tepkimenin durdurulması sonucu 96 kuyucukta oluşan absorbansın 450/540 veya 450/595 nm dual dalgaboylarını kullanarak ölçülmesinde yararlanılmıştır.

Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Kimyasal Madde Ve Çözeltiler**MMP-1 Konjugası (Horse Raddish Peroxidase-Hrp)**

Peroksidaz ile konjüge edilmiş olan 0.6 ml anti-MMP-1 monoklonal antikor 12 ml test tampon çözeltisi ile dilüe edilmiştir.

Pro-MMP-1 Protein Standardı

Liofifize edilmiş 3.6 ng insan proMMP-1 proteini içerir.

TIMP-1 konjugası (horse raddish peroxidase-hrp)

Peroksidaz ile konjüge edilmiş olan 0.6 ml anti-TIMP-1 monoklonal antikor 12 ml test tampon çözeltisi ile dilüe edilmiştir.

Test Tampon Çözeltisi (Bsa İçerikli Sodyum Fosfat)

BSA içeren liofilize edilmiş 2 şişe sodyum fosfat tampon çözeltisinden oluşur. 20 ml distile su ile sulandırılmıştır

Yıkama Tampon Çözeltisi (sodyum fosfat tampon çözeltisi, ph:7)

pH:7.0. sodyum fosfat solüsyonundan 20 ml kullanılmıştır.

Kromojenik Substrat (tetra-metilbenzidin-TMB)

Işığa duyarlı bir reagent olması dolayısıyla güneş ışığı ve UV'den korunarak çalışılmıştır. 12 ml tetra-metilbenzidin (TMB) içerir.

Durdurma Solüsyonu (2.5N sülfürik asid)

2.5 N sülfürik asid içerir.

HASTA SEÇİMİ

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniklerine 2003-2006 yılları arasında başvuran, yapılan klinik ve radyografik muayeneler sonucunda generalize agresif periodontitis teşhisi konmuş olan, yaşları 15 ile 41 arasında değişen, 13'ü erkek, 15'i kadın olmak üzere toplam 28 birey deney ve kontrol gruplarını oluşturmak üzere seçilmiştir.

Deney ve kontrol gruplarında yeralacak bütün bireylere American Academy of Periodontology'nin 1999'da yayınlamış olduğu yeni periodontal hastalık sınıflamasına ve ilgili kriterler göre generalize agresif periodontitis tanısı konmuştur [8]. Çalışmaya dahil edilecek bireylerde periodontal hastalığı modifiye edebilecek sistemik hastalığa sahip olmama, hamilelik veya oral kontraseptif kullanmama, son altı ay içinde antibiyotik kullanmama, kullanılacak ilaçlara karşı allerjik reaksiyon hikayesi bulunmama, günde en fazla 10 adet sigara içme koşulları aranmıştır. Ayrıca hastalığın şiddetinin lokal faktörlerle uyumlu olmaması, birinci büyük azı ve kesiciler dışında en az 3 dişte daha ileri düzeyde ataşman ve kemik kaybı, en az sekiz dişte ≥ 4 mm ataşman kaybı olması kriterlerine dikkat edildi. Araştırmaya dahil edilen her bir bireyin klinik indeks ölçümleri ve periotron değerleri doktora araştırma formuna kaydedildi. Uygulanan araştırma planı Şekil 5'te gösterilmektedir.

Deney ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin cinsiyete göre dağılımları Tablo 3-1'deki gibidir.

Tablo 3-1: Deney ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin cinsiyete göre dağılımları

	Erkek	Kadın
Deney grubu	5	8
Kontrol grubu	7	8

Klinik Ölçümler

Çalışmada yer alacak tüm hastalara çalışmanın gereç ve yöntemi ile ilgili ayrıntılı bilgi verildikten sonra onamları alınmıştır. Ayrıntılı sistemik ve oral anamnezleri alındıktan sonra periodontal durumun tespiti amacıyla şu klinik indeksler ve ölçümler yapılmıştır:

1. Plak İndeksi (PI)
2. Gingival İndeks (Gİ)
3. Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD)
4. Klinik Ataşman Seviyesi (KAS)

Ölçümler, bütün dişlerde 6 bölgede (mezio-vestibül, mid-vestibül, disto-vestibül, meziolingual, lingual, disto-lingual) yapılmıştır. Periodontal tedavi öncesi durumun tespiti amacıyla yapılan ölçümler tedavi sonrası 3.ay ve 6.aylarda da tekrarlanarak grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Plak ve gingival indeks ölçümleri *Williams tip periodontal sonda ile, periodontal sondalama derinliği ve klinik ataşman düzeyi ölçümleri *North Carolina tip periodontal sonda ile yapılmıştır.

3.6.1. Plak indeksi (Silness-Löe, 1964) [165]

Tüm dişler pamuk tamponlarla izole edilip hava spreyi ile kurutulduktan sonra dişler üzerinde bulunan mikrobiyal dental plak gözle ve diş hekimliği sondası ile değerlendirilmiştir.

İndekste skorlandırma şu şekildedir:

Skor 0: gözle muayenede ve sonda ile kazındığında dişeti kenarında plak yok

Skor 1: sonda ile kazındığında plak varlığı

Skor 2: gözle de görülebilir birikim

Skor 3: mevcut birikim interdental bölgeyi tamamen doldurmuş.

3.6.2. Gingival indeks (Löe-Silness, 1963) [111]

Kesici ve kanin dişler ile küçük azılarda dişlerin vestibül ve oral yüzeylerinde mezial veya distal köşe çizgileri ile palatinal/lingual orta noktalar, büyük azı dişlerde ise tüberkül tepeleri rehber alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Dişetinin iltihapsal düzeyini belirleme amacıyla yapılmıştır.

İndekste skorlandırma şu şekildedir:

Skor 0: sağlıklı dişeti

Skor 1: hafif iltihap, renkte hafif değişiklik, ödem ve parlaklık, sondalama esnasında kanama yok

Skor 2: orta derecede iltihap: kızarıklık, ödem, kanama, sondalama esnasında kanama.

Skor 3: şiddetli iltihap; belirgin kırmızılık ve ödem, ülser, spontan kanamaya eğilim.

3.6.3. Sondalanabilir cep derinliği

Sondalanabilir cep derinliği orta düzeyde bir sondalama kuvveti uygulandığında dişeti kenarı ile periodontal sondanın ucu arasındaki mesafe olarak ölçülmüştür.

Kesici ve kanin dişler ile küçük azılarda dişlerin vestibül ve oral yüzeylerinde mezial veya distal köşe çizgileri ile palatinal/lingual orta noktalar, büyük azı dişlerde ise tüberkül tepeleri rehber alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Serbest dişeti kenarı ile cep tabanı arasındaki mesafe ölçülerek kaydedilmiştir.

3.6.4. Klinik ataşman seviyesi

Klinik ataşman seviyesi orta düzeyde bir sondalama kuvveti uygulandığında periodontal sondanın ucu ile mine-sement sınırı arasındaki mesafe olarak ölçülmüştür.

Kesici ve kanin dişler ile küçük azılarda dişlerin vestibül ve oral yüzeylerinde mezial veya distal köşe çizgileri ile orta noktalar, büyük azı dişlerde ise tüberkül tepeleri rehber alınarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Mine-sement sınırı ile cep tabanı arasındaki mesafe ölçülerek kaydedilmiştir.

Tedavi Planı

Uygulanacak periodontal tedavi öncesinde tüm hastalara mikrobiyal dental plak ve periodontitis ilişkisi anlatılmış, ağız bakımı ve uygulamaları hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Bu kapsamda diş fırçalama yöntemi olarak Modifiye Bass anlatılmış, arayüz bakımında ise dışarısı fırçaları ile dişipi kullanımı konusunda eğitim verilmiştir. Supragingival diş yüzeyi temizliğinde ultrasonik aletler* ve el aletleri** kombine kullanılmıştır. Supragingival temizlik sonrası cila patı ve naylon fırça kullanılarak polisaj işlemi yapılmıştır. Subgingival temizlikte yine el aletleri** ve ultrasonik aletler kombine kullanılmıştır. El aleti olarak azaltılmış Gracey seti kullanılmıştır (5-6, 7-8, 11-12, 13-14). Diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemleri her bir seansı ortalama 90 dakika süren iki seansta bitirilmiş, periodontal başlangıç tedavisine başlanan ilk gün deney grubunda antibiyotik uygulamasına (metronidazol 500 mg + amoksisilin 500 mg, 3x1, 7 gün süreyle) başlanmıştır. Araştırmamızın ayrıntılı planı Şekil 4'te ifade edilmiştir. Araştırma kapsamında bulunan tüm hastalar 6 aylık takip döneminin sona ermesinin ardından flap cerrahisi ve rejeneratif yöntemler açısından değerlendirilmek üzere kliniğimizin rutin hasta protokolüne dahil edilmiştir.

*Dentsply/Cavitron™, SPS, 30 K, TFI 1000, Dentsply, U.S.A.

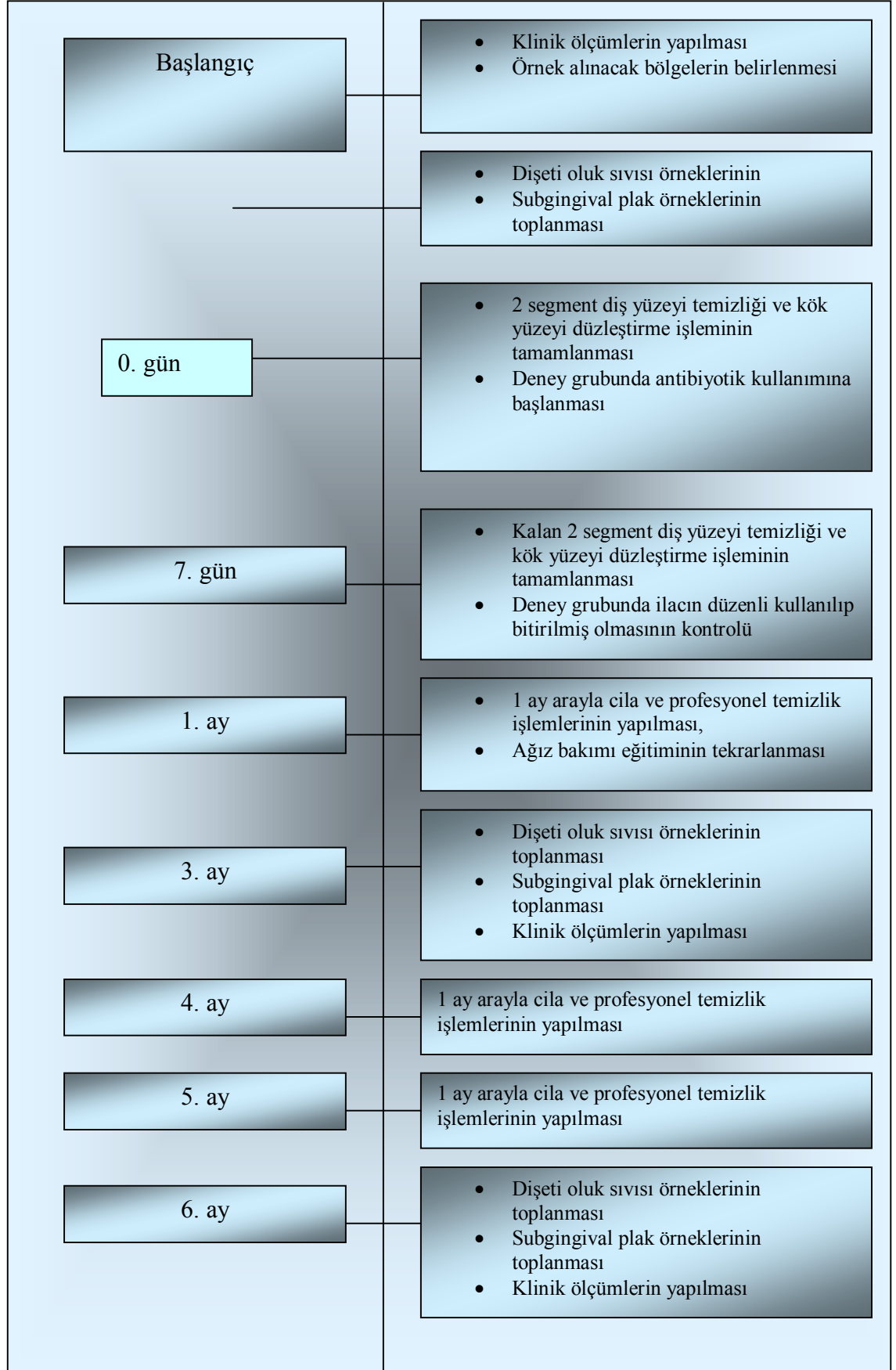
**Gracey, SAS 56,SAS 7-8, SAS,11-12,SAS13-14

Subgingival Plak Örneklerinin Toplanması

Subgingival plak örneklerinin elde edileceği bölgeler daha önceden yapılmış olan klinik ölçümlere dayalı olarak belirlenmiştir. Buna göre $SCD \geq 5$ mm , $PI \geq 2$ mm, $GI \geq 2$ olan üç bölge mikrobiyolojik örnekleme için seçilmiştir. Örnekleme için tek köklü diş bölgeleri, aynı cep derinliğine sahip bölgeler içinde ise tükürük izolasyonu daha kolay olan mezial bölgeler tercih edilmiştir. Tüm örnekler vestibül yüzeylerden elde edilmiştir. Örnek alım bölgeleri pamuk tamponlarla izole edildikten sonra supragingival plaklar steril gaz tamponlar yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Her bölgede bir adet adet 40 no steril paper point cep tabanına yerleştirildikten sonra 20 sn süreyle beklenmiştir. Elde edilen plak örnekleri, havuz yöntemiyle içinde 1 ml taşıyıcı sıvı[§] [119] bulunan aynı eppendorf tüpüne yerleştirilerek iki saat içinde laboratuara ulaştırılmıştır. Örnek alımı başlangıç, tedavi sonrası 3. ay ve 6. aylarda gerçekleştirilmiştir.

[§]VMGIII transport sıvı

Sekil 5.Araştırma Planı



- Kültür yöntemiyle tanısı konulan *Prevotella intermedia* grubu bakterilerin saf kültürlerinden daha sonra PCR yöntemiyle tür ayrımı yapılmış; *P. intermedia*, *P. nigrescense* ve *P. pallens* varlığına bakılmıştır. Kültür yöntemiyle ayrıca *P. gingivalis* tanısı da konulmuştur. Petrilerde bakteri sayımları yapılarak total bakteri , fakültatif anaerop ve siyah pigmentli bakteri sayılarına ulaşılmış; bu veriler daha sonra kantitatif mikrobiyolojik değerlendirmelerde kullanılmıştır..
- Daha sonra direk olarak subgingival plak örneklerinden PCR yöntemiyle varlığı araştırılan periodontal patojenler: *Prevotella intermedia* (Pi), *Prevotella nigrescense* (Pn), *Prevotella pallens* (Pp), *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) [127].

Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

3.9.1. Taşıma için kullanılan transport sıvısı

VMGA(Viability medium, Göteborg, anaerobically prepared and sterilized)III:

Yapılışı: Distile su içinde agar kaynatılarak eritildi. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra bacto jelatin, triptoz, tiyoton, sistein hidroklorid ve tiyoglikallik asid yavaş yavaş eritilerek karışıma eklendi. Üzerine önceden hazırlanmış olan tuz stok solüsyonu ilave edildi. 1NaOH ile pH7.5'e ayarlandı. 15 dakika 121°C'de otoklavda sterilize edildi. Kullanılncaya dek oda sıcaklığında saklandı [119].

Tuz stok solüsyonu II:

Yapılışı: 800 ml distile suda fenil merkürük asetat hafifçe ısıtılarak eritilmiştir. CaCl₂6H₂O, KCL, NaCl, MgSO₄7H₂O ve sodyum

gliserofosfat ilave edilerek karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanım anına dek solüsyon oda sıcaklığında saklanmıştır.

Kontrol: VMGIII taşıyıcı sıvısında subgingival plak örneğinin bakteri içeriği ve sayısında değişim olmaksızın 24 saat bekletilebileceği yapılan kontrollerle saptanmıştır. Kontroller 0., 2. saat, 24. saat ve 48. saatlerdeki kültür incelemeleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. Sulandırım İçin Kullanılan Solüsyon

Tuzlu Su

Cam tüplerin içine 4.5'er mililitre pipetlerle dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

3.9.3. Kullanılan Besiyeri

3.9.3.1. CDC (Centers for Disease Control) Anaerop Kanlı Agar:

100 ml distile su içine maya özeti ve triptik soy agar konulmuş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

§Hemin Stok Solüsyonu

Hemin stok solüsyonu 90 ml'lik distile suya 10 ml 1N sodyum hidroksid ve 0.5 g hemin eklenerek elde edilmiştir.

¥Sulandırılmış Vitamin K₁:

99ml'lik distile suya 1 ml Vitamin K₁ eklenerek 100ml'lik sulandırılmış vitamin K₁ elde edilmiştir.

3.9.3.2. Tanıda kullanılan besiyerleri

PY (Peptone Yeast Extract) Buyyon:

Dekstrozsuz TSB 27.5 g

Agar 1.5 g

Maya Özeti 5 g

L-sistein 400 mg

Distile su 1000 ml, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra Vitamin K₁ (10 mg) ve hemin (5 mg) eklenmiştir.

Glukozlu buyyon

PY buyyona glukoz ilave edilerek elde edilmiştir.

Laktozlu Buyyon**Sellobiyozlu buyyon**

PY buyyona sellobiyo ilave edilerek elde edilmiştir.

Eskülinli buyyon

PY buyyona eskülin ve ferrik sitrat ilave edilerek elde edilmiştir.

Kovac's Ayıracı

Bakteri saf kültüründen elde edilmiş olan buyyon kültüründe indol pozitif veya negatifliğin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kontroller: NCTC 11834, *Prevotella nigrescens* NCTC 9336, *Prevotella loescheii* NCTC 11321 standart suşları ile yapılmıştır.

Saklama İçin Kullanılan Besiyeri

Saklama için içerisinde hazır besiyeri ve 25 poröz boncuk bulunan Mikrobank tüpleri kullanılmıştır.

3.9.4. Hazır tanı kitleri**3.9.4.1. Api 20A:**

Anaerop bakterilerin 21 ayrı biyokimyasal özelliklerinin tek bir panelde incelenebildiği kitlerdir. 20 mikrotüp içerisinde bulunan dehidrate substratlar ile bakterilerin glikoz, laktoz, mannoz, sakkaroz, maltoz, salisin, ksiloz, arabinoz, gliserol, sellobiyo, mannoz, mellesitoz, rafinoz, sorbitol, ramnoz ve trehalozdan asit oluşturmaları indol, üreaz oluşturmaları ile katalaz oluşturmalarına ve jelatin ile eskülini hidrolize etme özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Kit Ksilen ve Ehrlich reagentlerine sahiptir.

3.9.4.2. Api ZYM

Bakterilerin enzim aktivitelerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Kit içindeki panelde enzimatik reaksiyonu sağlayabilen substrat ve tamponları

içeren 19 adet kuyucuk ve kontrol olarak 1 adet olmak üzere toplam 20 adet kuyucuk bulunmaktadır.

Kitin sahip olduğu substratlar alkale fosfataz, steraz, esteraz lipaz, valin arilamidaz, lösin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, a-kemotripsin, asitfosfastaz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, β -glukuronidaz, α -glukosidaz, β -glukosidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz, α -mannosidaz, a-fukosidaz enzimlerini içerir. Kit Zym A ve Zym B olarak adlandırılmış olan 2 adet reagent içermektedir.

3.9.5. PCR İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar

DNA ekstraksiyonu İçin Kullanılan Çözelti

Lizis Tamponu

Tris HCL (pH 8)	100 mM	} pH: 8 olacak şekilde hazırlanmıştır.
EDTA	10mM	
TritonX-100	%100	

3.9.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

PCR Tampon 10X

Tris-HCL (ğH 8.3)	100mM
Jelatin	50.01
MgCL ₂	15mM
KCL	500mM

Deoksi Nükleozid Trifosfatlar (dATP, dCTP, dGTP, dTTP,)

dATP	(100nM), 10 μ l	} Her birinden eklenerek 60 μ l su ilave edilmiş ve 10 defa seyreltilerek hazırlanmıştır. Kullanıncaya dek -20°C’de saklanmıştır.
dCTP	(100nM), 10 μ l	
dTTP	(100nM), 10 μ l	
dGTP	(100nM), 10 μ l	

Taq DNA Polimeraz

5U/ µl taq DNA polimeraz'dan 0.20 µl kullanılmıştır.

Primerler

Çözelti halinde bulunan primerlerden 50 pikomol olacak şekilde tekrar sulandırımı yapılmıştır. Ayrı ayrı eppendorf tüplerine konulduktan sonra, kullanıncaya dek -20°C'de saklanmıştır.

Kullanılan Primerler

P.intermedia ve *P. nigrescense* için türe özel 16SrRNA primerleri:

<u>No</u>	<u>Sekans</u>	<u>(5'-3')</u>	<u>Amplikon Uzunluğu</u>
Pi ₁	TTTGTG	GGGGAGTAAAGCGGG	575bp
Pi ₂	TCAACATCTGTGTATCCTGCGT		
Pn ₁	ATGAAACAATTTTCGGGTAAG		804bp
Pn ₂	CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA		
Pg ₁	5'-ATAATG ACA ACA GCA GGA A-3'		
Pg ₂	TCTTGCCAACCACCAGTTCCATTG C-3		
Td	5'-TAGT-CATGCGAATAAGCCCC-3'		
Aa ₁	TCG CGA ATC AGC TCG CCG-3		285 bp
Aa ₂	GCT TTG CCA GCT CCT CAC C-3		

Kullanılan türe özel primerler, Ashimoto ve ark. ve Külekçi ve ark. tarafından özgülüğü ve duyarlılığı incelenmiş primerlerdir [9;101].

3.9.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler

Tris Asetik Asit Glasiyal EDTA (TAE) Tamponu 10x

(Jel ve Tanklar İçin Tampon Çözelti)

Solüsyon 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak kullanılmıştır.

Etidyum Bromid

Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun süre bekletilerek çözünmüştür. 10mg/ml olarak hazırlanmış ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

Yükleme Tamponu

Bromfenol mavisi ve gliserol uygun miktarlarda TAE tamponu içinde karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.9.6. Kültür Yöntemi :

Subgingival plak örnekleri 1ml taşıyıcı sıvı (VMGIII) [119] içeren eppendorf tüpleri içinde örnek alımını takiben 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.9.6.1. İnokülasyon:

Subgingival plak örnekleri 60 saniye vortekslendikten sonra 4.5 ml tuzlu suya 0.5 ml plak içeren VMGIII aktarılarak steril tuzlu suda 10 katlı sulandırımı elde edilmiştir. Direkt ve 10 katlı sulandırmılardan CDC anaerop kanlı agara 0.1’er ml inoküle edilmiştir. Geriye kalan örnek spiroket sayımı için kullanılmak üzere lam üzerine aktararak saklanmıştır.

3.9.6.2. İnkübasyon:

CDC Anaerop kanlı agar petrilerin ikişer tanesi %80N₂, %10H₂, %10CO₂’li anaerop sistemde (Anaerogen) 37°C’de 7 gün, birer tanesi ise mum söndürme kavanozunda oluşturulan %5-7 CO₂’li ortamda 37° C’de 2 gün inkübe edilmiştir.

Tanı:

3.10.1. Bakteri Sayılarının Hesaplanması:

Kantitatif kültür değerlendirmeleri için besiyerlerinde üreyen koloniler sayılmış ve ml’deki koloni oluşturma ünitesi (cfu)olarak hesaplanmıştır.

$$\text{ml'deki koloni miktarı} = \frac{\text{koloni sayısı}}{\text{İnokulum miktarı x sulandırım oranı}}$$

(cfu/ml)

Anaerop ortamda üreyen koloniler total kültür edilebilir bakteri koloni miktarının hesaplanmasında, CO₂'li ortamda üreyen bakteriler ise fakültatif anaerop bakteri koloni miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Sayımları yapılan petrilere daha sonra bakteri kolonilerinin identifikasyonu amacıyla saf kültürlerinin elde edilmesinde yararlanılmıştır.

Total kültür edilebilir bakteri koloni miktarlarından fakültatif anaerop bakteri koloni miktarlarının çıkartılması ile zorunlu anaerop fakültatif bakteri koloni miktarları hesaplanmıştır.

3.10.2. *Porphyromonas* ve Pigmentli *Prevotella*'ların Tanısı:

3.10.2.1. Ön (Cins düzeyinde) Tanı:

Koloni şekli:

CDC Anaerop agarda, anaerop ortamda üreyen siyah ya da kahverengi koloniler *Prevotella* ya da *Porphyromonas* cinsi olarak ayırdedilmiş ve saf kültürlerin alımına geçilmiştir.

Saf kültürlerin alımı:

CDC anaerop kanlı agara tek koloniden bir tarafı yoğun olmak üzere ekim yapılmıştır.

Özel potensli disklerin (An-Ident Dics) yerleştirilmesi:

Saf kültür için yoğun ekim yapılan bölge üzerine antibiyotik tanı disklerinden vankomisin (5µg), kanamisin (100µg), kolistin (10µg) diskleri yerleştirilerek anaerop ortamda 48 saat inkübe edilmiştir. Diskler etrafında oluşan bakterisiz bölge çapının miktarına göre antibiyotik veya dirençliliğine karar verilmiştir.

Bölge çapı: ≥ 10 mm duyarlılık göstergesi

< 10 mm dirençlilik göstergesi

Duyarlık ve direncin belirlenmesinde vankomisin baz alınmıştır. Vankomisine dirençli olan suşlar *Prevotella* cinsi olarak, duyarlı olan suşlar

Porphyromonas cinsi olarak değerlendirilmiş ve ileri tanı yöntemlerine geçilmiştir.

3.10.2.2. İleri (Tür Düzeyinde) Tanı:

Fluoresans verme:

Saf kültürleri elde edilmiş olan kolonilere uzun dalga boylu (365nm) ultraviyole ışığı altında bakılmıştır. Kiremit kırmızısı renkte fluoresans veren koloniler pigmentli *Prevotella*'lar ve *P. gingivalis* dışındaki diğer *Porphyromonas*'lar olarak ayırdedilmiştir [90;173].

3.10.2.3. İndol oluşumu (Tryptofonaz)

Buyyon testi:

2 ml PY buyyon üzerine bakterinin saf kültüründen hazırlanan buyyon kültüründen 0.5 ml ekim yapılarak anaerob ortamda 48 saat bekletilmiştir. Üzerine 2 damla Kovacs' ayırıcı damlatılmıştır.

Buyyonun üst kısmında kırmızı renkte halka oluşumu bakterinin triptofonaz enzimine sahip olduğunu ve triptofonu hidrolize ettiğini gösterir. Çalışmamızda kırmızı halka oluşumu indol pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 1). Sarı halka oluşumu ise bakterinin triptofonaz enziminden yoksun olduğunu gösterir. Çalışmamızda sarı halka oluşumu indol negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.10.2.4. Api 20A ile inceleme:

3 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu indol kuyucuğuna mikropipetler ile bırakılmış ve kuyucuğun ağzı parafin ile kapatılmıştır. Test paneli anaerob ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra etüvden çıkarılmış ve üzerine 1 damla ksilen damlatılmıştır. Birkaç dakikalık bekleme süresinin ardından Ehrlich reagenti damlatılarak 5 dakika daha beklenmiş ve kuyucuğun ağzındaki renk değişimi gözlenmiştir. Kırmızı renkte damlacık oluşumu indol pozitif, sarı rekte damlacık oluşumu ise indol negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.10.2.5. Karbonhidrat Fermentasyonu:

Buyyon Testi:

2 ml laktoz, glukoz ve sellobiyozlu buyyon üzerine bakterinin saf kültürden hazırlanan buyyon kültüründen 0.5 ml ekim yapılarak anaerop ortamda 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyerlerindeki üreme sonrasında oluşan asit üretimi ph indikatörü ile incelenmiştir.

pH 5.5'in altındaki değerler asit üretimi pozitif, üzerindeki değerler ise asit üretimi negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.10.2.6. Api 20A ile inceleme:

Test panelinde bulunan kuyucuklara 3 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu mikropipetleri ile bırakılmış ve anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklarda oluşan sarı renk asidifikasyon pozitif, eflatun renk ise asidifikasyon negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.10.2.7. Eskülin hidrolizi:

Buyyon testi:

2 ml eskülinli buyyon üzerine bakterinin saf kültüründen elde edilen buyyon kültüründen 0.5 ml ekim yapılarak anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Besiyerini içeren cam tüp 365 nm dalga boyuna sahip ultraviyole ışığı altında incelenmiştir. Besiyerinin ultraviyole ışığı altında floresans vermemesi eskülin molekülünün bakteri enzimi tarafından hidrolize edildiğinde ortaya çıkan eskületin ferrik amonyum sitrat ile reaksiyona girdiğini gösterir. Bu reaksiyonda eskülin hidrolizi ile ortaya çıkan floresans vermeme eskülin pozitif, eskülin hidrolizinin gerçekleşmemesi ile ortaya çıkan mavi-beyaz floresans verme ise eskülin negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.10.2.8. Api20A ile inceleme:

3McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu mikropipetler ile eskülin kuyucuğuna bırakılmış ve anaerop ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası uv ile floresans oluşumuna bakılmıştır.

Kuyucuğun floresans vermemesi eskülin hidrolizinin pozitif, floresans vermesi ise eskülin hidrolizinin negatif olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

3.10.3. Enzim Aktivitivelere:

Api ZYM ile inceleme:

Test panelinde bulunan 20 adet kuyucuğa 65'er µl bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Kit içinde bulunan kuyucuklar dehidrate substratlara sahiptir. İnokülasyon sonrası panel 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında ZYM A ve ZYM B reagentlerin eklenmiş ve oluşan renk tonları ve yoğunlukların referans kart ile karşılaştırması ile değerlendirme yapılmıştır (Resim 2). Değerlendirme sonrasında iki ve üzeri değerler pozitif olarak kabul edilmiştir.

İndol oluşumu pozitif olan *P.intermedia*, *P.nigrescense* ve *P. pallens* *P. intermedia* ailesi adı altında gruplandırılmış ve PCR'da *P intermedia* ve *P. nigrescense* ve *P. pallens* tür ayrımı yapılmıştır. İndol negatif olarak reaksiyon veren suşlardan laktozla da etkileşimi negatif olanlar *P. corporis*, laktozla etkileşimi pozitif olanlar ise *P. melaninogenica* grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu gruptan eskülin hidrolizi negatif olan suşlardan α- galaktosidoz pozitif olanlar *P. melaninogenica*, negatif olanlar ise *P. tanneriae* olarak , eskülin hidrolizi pozitif olan suşlardan sellobiyoz pozitif olanlar *P. loescheii*, negatif olanlar ise *P. denticola* olarak değerlendirilmiştir.

Kültür yöntemiyle tanısı konulan suşlar PCR'da tür ayrımında kullanılmak üzere hazır besiyerine alınarak (Microbank™) -70° de saklanmıştır.

PCR ile Tanı Yöntemi

3.11.1. DNA Ekstraksiyonu

Biyokimyasal yollarla *P. intermedia* ailesi olarak identifikasyonu yapılan suşlar, muhafaza edildikleri saklama besiyerlerinden 1 ml buyyon içine aktararak süspansiyonları hazırlanmış ve DNA ekstraksiyonları kaynatma yöntemine göre yapılmıştır [9].

90µl bakyeri süspansiyonu eppendorf tüplerine koyularak, üzerine 10 µl l izis tamponu ilave edilmiş ve 5 sn süreyle vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler 5 dak. boyunca su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler kuru buz içine alınarak 10 dakika bekletilmiş ve 10 000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant bir başka eppendorf tüpüne alınarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.11.2. PCR Protokolü

3.11.2.1. PCR Karışımı

Temiz odada hazırlanan karışım, ekstraksiyon odasında üzerine 10 µl bakteri ekstraksiyonu konularak ısısal döngü cihazında çoğaltılmış ve %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Her amplifikasyonda pozitif kontrol olarak *P. intermedia* ATCC 25611 veya *P. nigrescense* NCTC 9336 *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. denticola* ATCC 35405 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 referans suşlarının template DNA'sı ve negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır [101].

PCR Programı

94°C'de 2 dakika, 60°C'de 2 dakika, 72°C'de 2 dakika 40 defalık döngülerle devam ettirilmiş, 72°C'de 2 dakika ve +4°C'de PCR programı sonlandırılmıştır.

3.11.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektriksel güç kullanılarak DNA'nın katoddan anoda doğru göç etmesi prensibine dayalı olan bir yöntemdir. Agaroz jel elektroforezi DNA'nın moleküler ağırlığının ve/veya saflığının belirlenmesinde kullanılır.

3.11.2.3. Elektroforez Jelin Hazırlanması

%2'lik agaroz jel 1xTAE tamponunda eritilmiştir. Yaklaşık 65°C'ye kadar soğutulduktan sonra karışıma DNA boyası olarak 10mg/ml etidyum bromid eklenmiştir. Jel kabına taraklar yerleştirildikten sonra elektroforez tankına aktarılması ile tank içine 2xTAE konularak örneklerin yürütülmesine geçilmiştir.

3.11.2.4. Elektroforez Jelin Yürütülmesi

Örneklerin tüm PCR aşamalarından geçirilmelerinden sonra, eppendorf tüplerindeki 10 µl'lik PCR ürünleri, 20 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jelle yüklenmiştir. Sonrasında güç kaynağından sağlanan elektrik akımı (100V, 60mA) ile 20 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra jel UV altında incelenerek fotoğraf çekimi yapılmıştır.

Moleküler boyut standardı olarak Φx174 DNA-HAE III digest kullanılmıştır. Beklenen büyüklükteki tek band pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Dişeti oluk sıvısı (DOS) örneklerinin toplanması

Mikrobiyal örnekleme öncesinde aynı bölgeler dişeti oluk sıvısı alımında da kullanılmıştır. Örnekleme öncesinde interproksimal bölgedeki supragingival plak steril bir küret yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı yüzeyler hava spreyi ile nazikçe kurutulduktan sonra pamuk tamponlar ile izole edildi. Örnekler filtre kağıtları (paper strips)[‡] ile alındı. Filtre kağıtları hafif bir direnç hissedilinceye kadar cep içine itildi ve 30 sn süreyle beklendi. Örnekleme esnasında doku hasarına yol açmamaya özen gösterildi. Kan bulaşmış olan kağıtlar atıldı. Filtre kağıtları tarafından emilen dişeti oluk sıvısının hacmi daha önceden kalibre edilmiş olan periotron 6000[§] cihazı ile elde edilen eğride yerine konularak hesaplandı. Daha sonra steril eppendorf tüplerine konulan filtre kağıtları analiz gününe dek -40°C'de saklandı. Elektronik dişeti oluk sıvısı okuma cihazından elde edilen değerler standart kalibrasyon eğrisine göre hacim değerine çevirildi.

Periotron 6000[‡] Cihazının Kalibrasyonu (*Harco Electronics, Winnipeg, Canada)

Her bir filtre kağıdı üzerinde toplanan dişeti oluk sıvısının gerçek hacminin belirlenebilmesi için Periotron cihazında elde edilen birimler kullanılarak kalibrasyon grafiği (parabol) elde edildi. 0,01 µl ile 1 µl arasında, önceden bilinen hacimlerde serum fizyolojik emdirilmiş kağıtlar periotron cihazında okutularak birimler elde edildi. Bu işlem her 0,01 µl'lik sıvı için üç defa tekrarlanarak ortalamalar alındı. Elde edilen grafik ile her bir periotron biriminin karşılık geldiği hacim değeri belirlendi (Şekil 6, Şekil 7) [102].

[‡] Proflow, Amityville, NY

Dişeti oluk sıvısını filtre kağıtlarından geri kazanılması

Filtre kağıtları ELISA ile çalışılacak gün buzdolabından çıkarılmıştır. Her bir ELISA için gerekli örnek miktarı 100 mikrolitre olarak belirlendi. Her iki ELISA'nın aynı gün yapılmasına karar verilmiş olduğu için toplam 200 mikrolitrelik sıvı elde edilmeye çalışıldı. Laboratuvarda oluşabilecek kayıplar gözönüne alınarak (yaklaşık %10 kadar) fosfat tamponunun bulunduğu eppendorf tüpüne 110 mikrolitrelik fosfat tamponu eklenerek ~ 10000rpm'de 10 dakika bir defa sanrifüj yapıldı. Sıvı, bir pipetle temiz bir eppendorf tüpüne alındı. Filtre kağıdının bulunduğu ilk eppendorf tüpü içine yeniden 110 mikrolitrelik tampon sıvısı eklenerek aynı işlem tekrarlandı. Elde edilen sıvı da ilk sıvının aktarıldığı tüpe eklendi. Böylece her bir DOS örneği 240 mikrolitrelik sıvıya aktarılmış oldu. Buradaki toplam miktar daha sonra DOS örneği içindeki MMP-1, TIMP-1 miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Periotronla elde edilen hacim ise konsantrasyon hesabında kullanılmıştır.

DOS örneklerinin işlenmesi

Filtre kağıtları tarafından emilen sıvı 75µl 0.2M NaCl, 1mM CaCl, 50 mM Tris-HCl solüsyonu içeren pH:7.8 ortamda 22°C'de 2 saat süreye ayrıştırıldı ve bu ekstrenin 14 µl'si 5 µl'lik Laemli-örnek tamponunda 100°C'de 3 dakika kaynatıldı. Vortekslendikten sonra 19- µl karışım her bir jel slota uygulandı.

TIMP-1 ve MMP-1'in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile Analizi:

3.16.1. MMP-1 ve TIMP-1 ELİSA'sı

MMP-1* ve TIMP-1** enzim seviyelerine üretici firma kullanma talimatlarına uygun şekilde ELİSA yöntemi ile bakılmıştır. DOS örnekleri her iki enzim içinde 1:10 ve

1:15 dilüsyonlarda çalışılmıştır. TIMP-1 ELISA**(BIOSOURCE International, Inc California, USA) kiti 1ng/ml, MMP-1 ELISA* kiti (Calbiochem, Canada) ise 0.023ng/ml hassasiyetle çalışmaktadır.

3.16.2. MMP-1/TIMP-1 ELISA Yönteminin Çalışma İlkesi

TIMP-1 ve MMP-1 ELISA iki monoklonal antikora sahip bir sandviç enzim immuno assaydır. İnsan MMP-1/TIMP-1 için spesifik olan proteinler kit içinde gelen plastik kuyucuklara sabitlenmiştir. Test örnekleri ve standartlar pipetle kuyucuklara bırakılır. Örnekler içinde mevcut MMP-1/TIMP-1 proteini bu antikorlar tarafından yakalanır. Yakalanmamış olan materyal yıkanarak uzaklaştırılır. Horse radish peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş monoklonal anti-MMP-1/antiTIMP-1 antikorları kuyucuklara eklenir. Renkli tepkimede açığa çıkan ürün spektrofotometre cihazı ile kantitatif olarak hesaplanır.

3.16.3. Dişeti Oluk Sıvısı Örneklerinin Sandwich Elisa Yöntemiyle Çalışılması

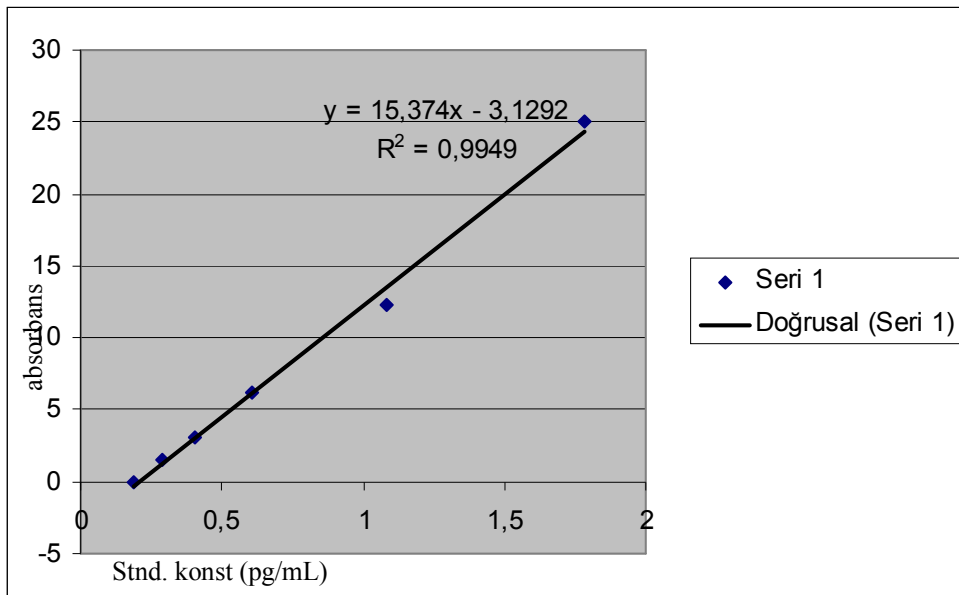
Örnekler kullanıcı talimatlarına uygun olarak şu şekilde çalışılmıştır:

- MMP-1 standardı 1 ml H₂O ile sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.
- Assay buffer içine 20 ml H₂O ilave edildi ve kullanıma hazır hale getirildi.

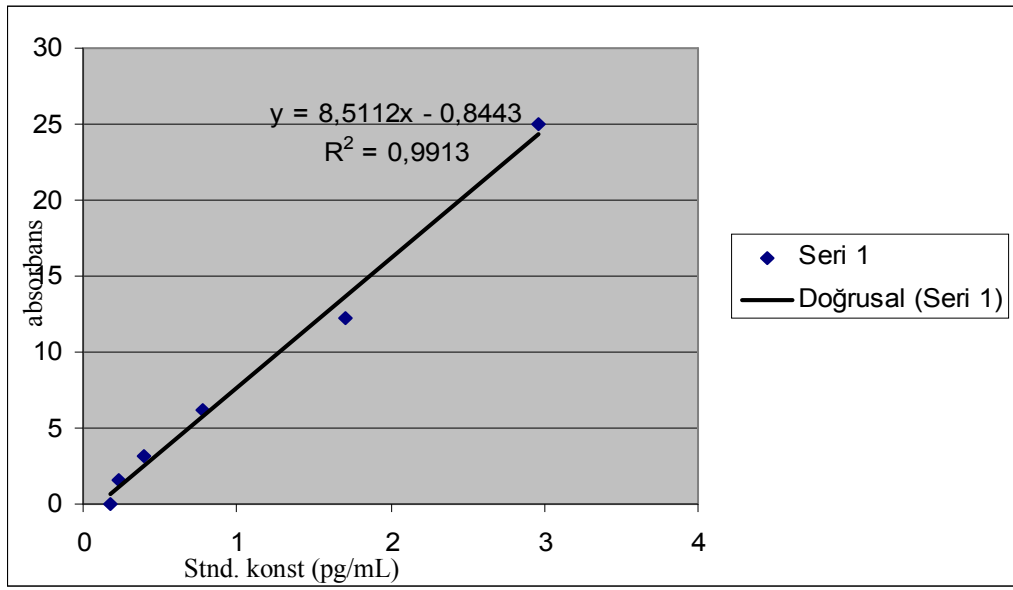
3.16.4. Standartların ve örneklerin eklenmesi

- 5 seri tüp alındı.
- Her bir tüp üzerine 1.8, 0.9, 0.45, 0.23 ve 0,11 ng/ml değerleri kaydedildi.
- Her bir tüpe 250 µl assay buffer ilave edildi.
- Sulandırılan standart tüpünden (3.6 ng/ml içeren) 250 µl alındı, 1. tüpe ilave edildi, karıştırıldı ve seri dilüsyon yapıldı.
- 100 µl standart ve örneklerden kuyulara ilave edildi.
- 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

- Yıkama solüsyonu hazırlandı (480 ml H₂O+20 ml yıkama solüsyonu).
- 5 kez kuyucuklar yıkandı.
- Konjuge hazırlandı. MMP-1 konjuge şişesi 12ml assay buffer ile sulandırıldı.
- 100 ml kuyulara ilave edildi. 1saat oda ısısında inkübe edildi.
- Tekrar 5 defa yıkandı.
- 100 ml kullanıma hazır substrat solüsyonu ilave edildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- 100 ml stop solüsyonu ile tepkime durduruldu.
- 450/540 nm’de 30 dakika içinde okundu.



Şekil 6:MMP-1 standart eğrisi-formülü



Şekil 7:TIMP-1 standart eğrisi-formülü

İstatistiksel İncelemeler

Çalışmamızda klinik veriler hasta bazında değerlendirilmiş olup her birey için tüm ağız ortalamaları istatistiksel değerlendirmede bir birim olarak kabul edilmiştir. Laboratuvar verileri ise bölge bazında değerlendirilmiştir. Mikrobiyolojik veriler; 3 bölgeden alınan örneklerin havuz yöntemiyle toplanmış olması nedeniyle elde edilen sayısal değerler bir birim olarak kabul edilmiştir. Biyokimyasal veriler; en derin tek bölgeden elde edilen sonuçlar bir birim olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Student t test, takip sürelerine göre grup içi değerlendirmelerinde tekrarlı ölçümlerde Varyans analizi ve Paired samples t test kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test; takip sürelerine göre grup içi değerlendirmelerinde Friedman test ve Wilcoxon Sing Rank test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi, Fisher's Exact Ki-Kare testi ve McNemar test kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA ARAŞTIRMA FORMU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serdar Çintan

Doktora Öğrencisi: Emine ÇifcibaşıYek

HASTA ADI-SOYADI:

GRUP NO:

ÖLÇÜM TARİHİ:

ÖLÇÜM NO:

PLAK İNDEKSİ (Silness- Løe, 1964)

	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
V															
P															
	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
L															
V															

GİNGİVAL İNDEKS (Løe-Silness, 1963)

	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
V															
P															
	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
L															
V															

SONDALANABİLİR CEP DERİNLİĞİ

	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
V															
P															
	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
L															
V															

KLİNİK ATAŞMAN DÜZEYİ

	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
V															
P															
	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
L															
V															

PERİOTRON DEĞERLERİ

	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
V															
P															
	7	6	5	4	3	2	1		1	2	3	4	5	6	7
L															
V															

4. BULGULAR

Çalışma Mayıs 2003-Aralık 2006 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde toplam 28 olgu üzerinde yapılmıştır. Olguların yaşları 15 ile 45 arasında değişmekte olup ortalama yaş $31,14 \pm 7,46$ 'dır. Olguların %75'i (21) kadın; % 25'i (7) erkektir. Çalışmamızda tüm ölçümler ve örneklemeler toplam üç defa yapılmıştır. İlk ölçümler başlangıç (baseline) değerlerini; ikinci ölçümler tedavi sonrası 3.ay (TS 3. ay) ve üçüncü ölçümler ise tedavi sonrası 6 ay (TS 6. ay) değerleri yansıtmaktadır. Test grubunu periodontal başlangıç tedavisi ile birlikte kombine antibiyotik uygulanan (metronidazol 500 mg 3x1, 1 hafta süreyle + Amoksisilin 500 mg, 3x1, 1 hafta süreyle) denekler, kontrol grubunu ise yalnızca periodontal başlangıç tedavisi uygulanan denekler oluşturmaktadır.

Klinik Bulgular

Tablo 4-1 Plak İndeksi (PI) değerlendirmeleri

		Kontrol	Test	<i>p</i>•
		Ort±SD	Ort±SD	
	Baseline	2,14±0,47	2,25±0,28	0,475
Plak İndeksi	TS 3. ay	1,05±0,41	1,29±0,32	0,110
	TS 6. ay	1,10±0,39	1,19±0,28	0,496
<i>p</i>♣		0,001**	0,001**	
†	Başlangıç– 3. ay	0,001**	0,001**	
†	Başlangıç – 6. ay	0,001**	0,001**	
†	3. ay – 6. ay	0,755	0,404	

** $p < 0.01$ varyans analizi

† : Paired samples test

• : Student t test

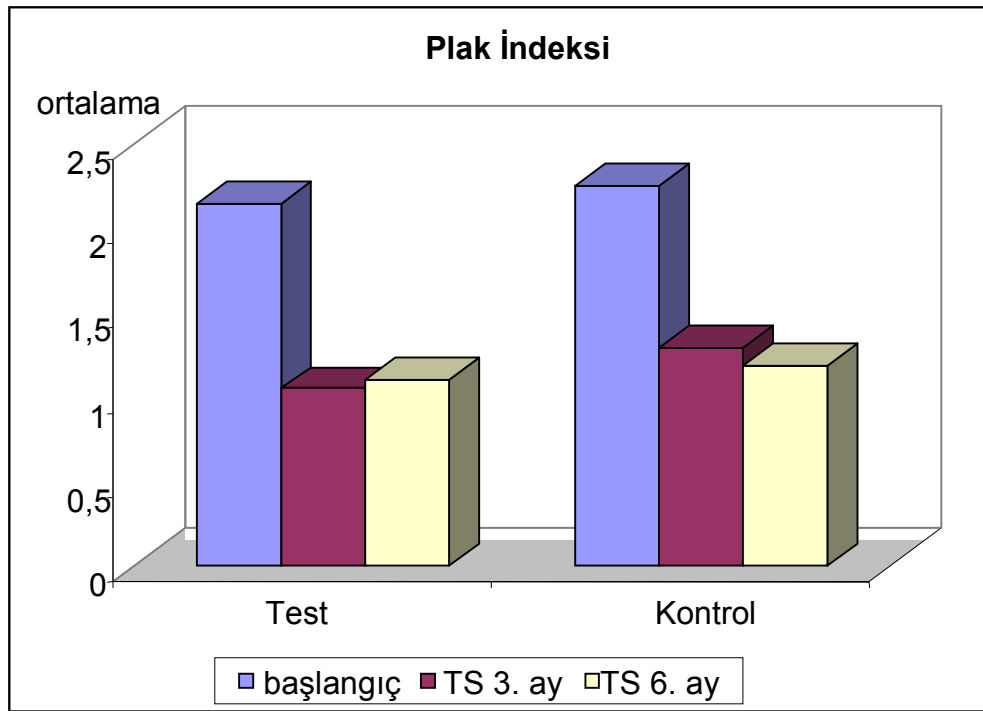
♣ : Tekrarlı ölçümlerde

Başlangıç PI değerlerinde periodontal başlangıç tedavisi ile birlikte antibiyotik kullanılan (test) ve yalnızca başlangıç tedavisi yapılan (kontrol) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Gruplar

arası değerlendirmede tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay ölçümleri de yine anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-1)

Kontrol grubunda; Başlangıç ölçümleri ile TS 3. ay ve TS 6. ay ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p<0.01$). Başlangıç değerlere göre 3.ay ve 6.aylarda plak skorlarında görülen azalma (Şekil 8) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p<0.01$); 3.ay ve 6.ay arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-1).

Test grubunda; Başlangıç ölçümleri ile, TS 3. ay ve TS 6. ay ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p<0.01$). Başlangıç değerlere göre 3.ay ve 6.aylarda plak skorlarında görülen azalma (Şekil 8) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p<0.01$); 3.ay ve 6.ay arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-1).



Şekil 8: Plak indeksi ölçümlerinin dağılımı

Tablo 4-2 : Gingival İndeks (GI) değerlendirmeleri

		Kontrol	Test	<i>p</i>[•]
		Ort±SD	Ort±SD	
Gingival İndeks	Başlangıç	1,82±0,55	1,81±0,41	0,956
	TS 3. ay	1,20±0,15	1,16±0,18	0,559
	TS 6. ay	1,20±0,39	1,24±0,18	0,710
<i>p</i>[♣]		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 3. ay		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 6. ay		0,001**	0,001**	
†3. ay – 6. ay		0,980	0,116	

** $p < 0.01$

• : Student t test

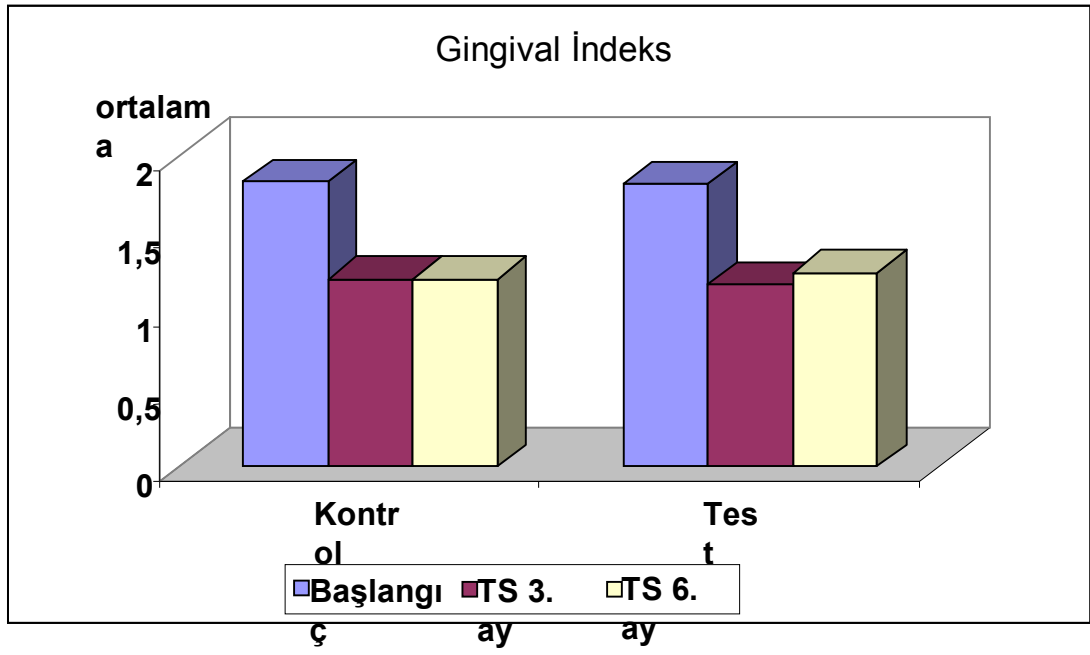
♣ : Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

GI başlangıç değerlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay ölçümleri gruplar arası değerlendirmede anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-2).

Kontrol grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay GI değerleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0.01$). Başlangıç değerlere göre; 3.ay ve 6.aylarda GI skorlarında görülen azalma (Şekil 9) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 9) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-2).

Test grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay GI değerleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0.01$). Başlangıç değerlere göre; 3.ay ve 6.aylarda GI skorlarında görülen azalma (Şekil 9) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 9) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-2).



Şekil 9: Gingival indeks ölçümlerinin dağılımı

Tablo 4-3: Sondalanabilir Cep Derinliği (SCD) Değerlendirmeleri

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort±SD	Ort±SD	
Sondalanabilir Cep Derinliği	Başlangıç	3,69±0,69	4,04±0,56	0,163
	TS 3. ay	2,53±0,54	2,74±0,51	0,300
	TS 6. ay	2,47±0,48	2,57±0,37	0,519
$p^{\clubsuit}$		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 3. ay		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 6. ay		0,001**	0,001**	
†3. ay – 6. ay		0,518	0,114	

** $p<0.01$

• : Student t test

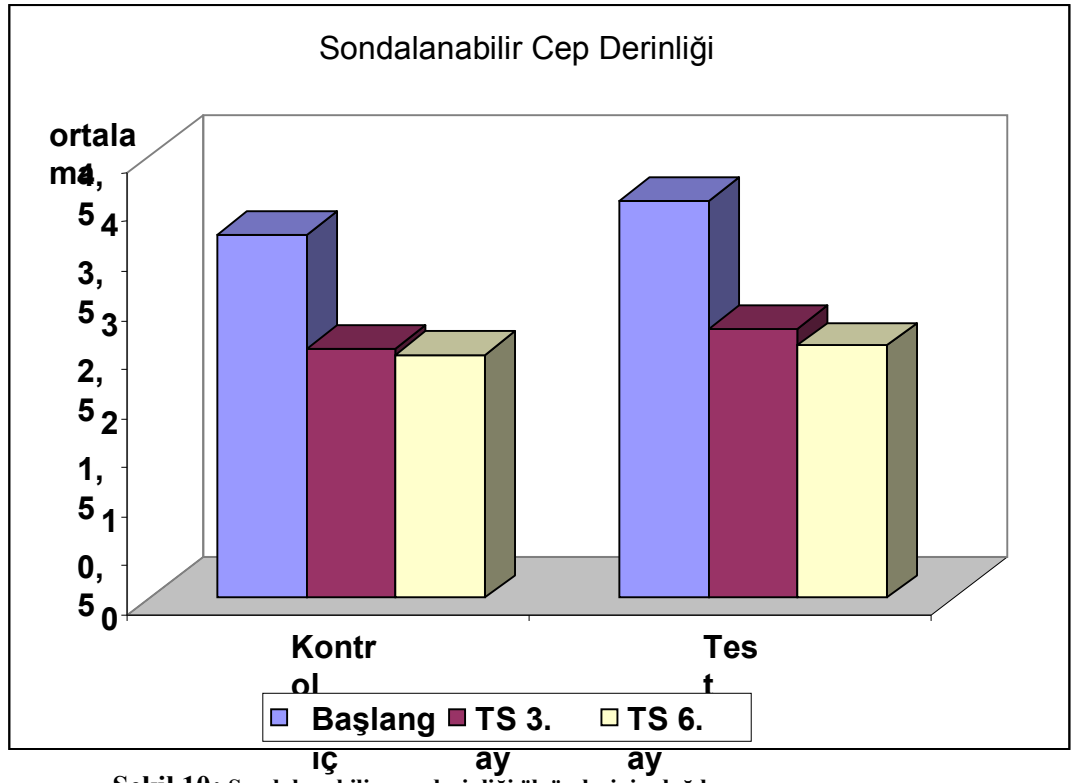
♣ : Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

SCD başlangıç ölçümlerinde test ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay ölçümleri de gruplar arası değerlendirmede yine anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

Kontrol grubunda; Başlangıç değerler ile TS 3. ay ve TS 6. ay sondalanabilir cep derinliği ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p<0.01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen sığlaşmalar (Şekil 10) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p<0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 10) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

Test grubunda; Başlangıç değerler ile TS 3. ay ve TS 6. ay sondalanabilir cep derinliği ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p<0.01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen sığlaşmalar (Şekil 10) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p<0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 10) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-3).



Tablo 4-4: Klinik Ataşman Seviyesi Değerlendirmeleri

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort±SD	Ort±SD	
Klinik Ataşman Seviyesi	Başlangıç	3,34±1,38	3,82±1,04	0,312
	TS 3. ay	2,34±1,19	2,70±1,09	0,425
	TS 6. ay	2,43±1,10	2,83±1,24	0,371
$p^{\clubsuit}$		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 3. ay		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 6. ay		0,001**	0,001**	
†3. ay – 6. ay		0,274	0,553	

** $p < 0.01$

• : Student t test

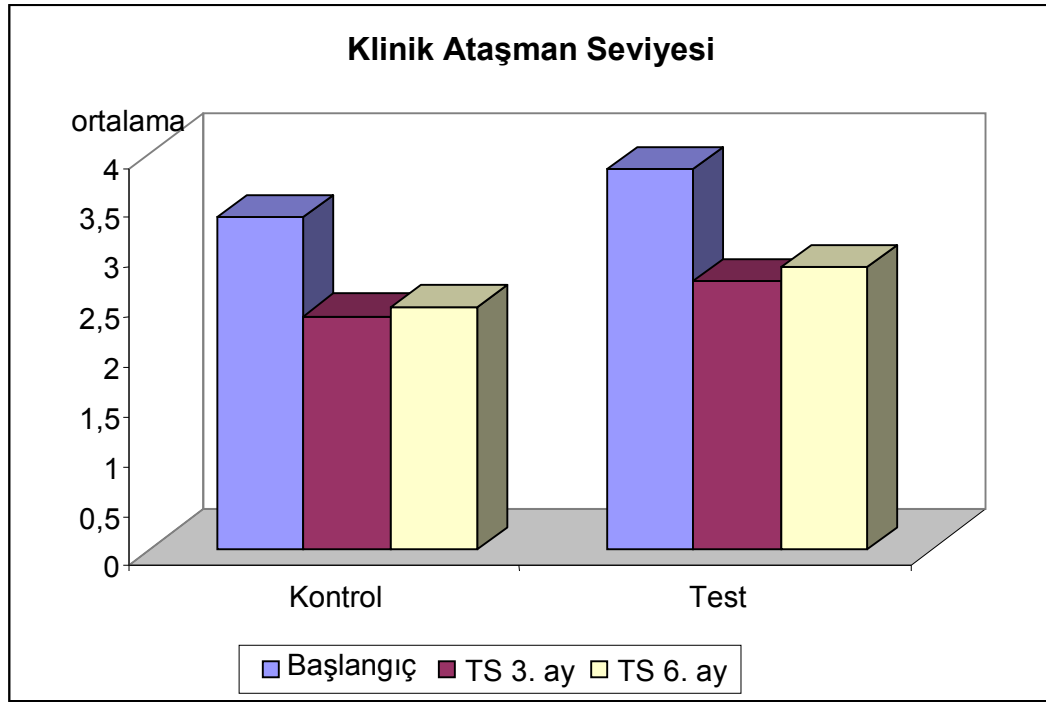
♣ : Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

KAS başlangıç ölçümlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay ölçümleri de gruplar arası değerlendirmede yine anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-4).

Kontrol grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay KAS ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0.01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen kazançlar (Şekil 11) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 11) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-4).

Test grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay KAS arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0.01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen kazançlar (Şekil 11) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 11) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-4).



Şekil 11: Klinik ataşman seviyesi ölçümlerinin dağılımı

Tablo 4-5: Klinik indeks değerlerinin farklarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol Ort±SD (medyan)	Test Ort±SD (medyan)	<i>p</i> •
Plak İndeksi Farkları	Başlangıç – TS 3.ay	1.08±0.58 (0.97)	0.96±0.33 (0.98)	0.629
	Başlangıç-TS 6. ay	1.04±0.44 (1.18)	1.05±0.44 (1.15)	0.982
	TS 3-TS 6. ay	0.05±0.57 (-0.06)	0.09±0.40 (0.24)	0.596
Gingival İndeks Farkları	Başlangıç – TS 3.ay	0.61±0.50 (0.55)	0.65±0.38 (0.82)	0.982
	Başlangıç-TS 6. ay	0,62±0,41 (0,43)	0.56±0.34 (0,57)	0.730
	TS 3-TS 6. ay	0.003±0.41 (-0.08)	-0.08±0.17 (-0.09)	0.712
Sondalanabilir Cep Derinliği Farkları	Başlangıç – TS 3.ay	1.16±0.46 (1.04)	1.30±0.39 (1.40)	0.201
	Başlangıç-TS 6. ay	1.22±0.63 (0,94)	1.46±0.58 (1,43)	0.201
	TS 3-TS 6. ay	0.06±0.36 (0.03)	0.16±0.35 (0.07)	0.363
Klinik Ataşman Seviyesi Farkları	Başlangıç – TS 3.ay	0.99±0.62 (0.77)	1.13±0.40 (0.99)	0.235
	Başlangıç-TS 6. ay	0.91±0.55 (0.68)	0.99±0.91 (1.08)	0.467
	TS 3. ay-TS 6. ay	-0.08±0.29 (-0.10)	-0.14±0.80 (0.05)	0.618

• : Mann Whitney U test

Plak indeksi ölçümlerinde; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ayda plak skorlarında meydana gelen azalma, ayrıca 3. ay ve 6. ay plak skorları arasında meydana gelen değişim gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Gingival indeks ölçümlerinde; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ayda gingival indeks skorlarında meydana gelen değişim, ayrıca TS 3.ay ve TS 6.ay gingival indeks skorları arasında meydana gelen değişim gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Sondalanabilir cep derinliği ölçümleri; Başlangıca göre TS 3.ayda sondalanabilir cep derinliğinde meydana gelen sığlaşma gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay arasında meydana gelen değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Klinik ataşman seviyesi ölçümlerinde; Başlangıca göre TS 3.ayda klinik ataşman seviyesinde meydana gelen kazanç gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay arasında meydana gelen değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Mikrobiyolojik Bulgular

4.2.1. Kantitatif kültür değerlendirmeleri

Tablo 4-6: Total bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol Ort±SE (medyan)	Test Ort±SE (medyan)	p[•]
TOTAL	Başlangıç	362,64±99,83 (175)	493,69±154,72 (250)	0,679
BAKTERİ	TS 3. ay	324,84±115,05 (77,5)	270,67±102,49 (90)	0,697
SAYISI	TS 6. ay	412,89±92,40 (300)	456,46±119,81 (250)	0,853
(x10⁶) CFU/ml				
p[♣]		0,199	0,500	
†Başlangıç – 3. ay		0,173	0,422	
†Başlangıç – 6. ay		0,807	0,753	
†3. ay – 6. ay		0,345	0,228	

SE: Standart error

• : Mann Whitney U test

♣ : Friedman test

† : Wilcoxon sing Rank test

Total bakteri sayısı başlangıç değerlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay değerlerinde test grubundaki total bakteri sayısı daha fazla azalmış olmakla birlikte bu fark gruplar arasında anlamlı değildir. ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

Kontrol grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS. 6. ay total bakteri sayısı değerlerinde istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay total bakteri sayısı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

Tablo 4-7: Fakültatif anaerop bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort±SE (medyan)	Ort±SE (medyan)	
FAKÜLTATİF ANAEROP BAKTERİ SAYISI (x10⁶CFU/ml)	Başlangıç	21,61±17,59 (3,24)	8,77±5,65 (4)	0,627
	TS 3. ay	9,24±5,45 (1,35)	3,36±0,91 (2,70)	0,943
	TS 6. ay	43,13±32,9 (4,20)	11,96±6,45 (2,30)	0,555
	$p^{\clubsuit}$	0,849	0,689	
†Başlangıç – 3. ay		0,975	0,807	
†Başlangıç– 6. ay		0,875	0,463	
†3. ay – 6. ay		0,382	0,875	

SE: Standart error

• : Mann Whitney U test

♣ : Friedman test

† : Wilcoxon sing Rank test

Fakültatif anaerop bakteri sayısı başlangıç değerlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay değerleri de test grubunda daha az sayıda gerçekleşmiş olmakla birlikte bu farklar gruplar arasında anlamlılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-7).

Kontrol grubunda; Başlangıç, TS. 3. ay ve TS. 6. ay fakültatif anaerop bakteri sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ayda meydana gelen azalmaya karşın iki ölçüm zamanı arasındaki bu fark anlamlı bulunmamıştır. Başlangıç ile 6.ay arasında fakültatif anaerop bakteri sayısında artış görülmekle birlikte bu fark anlamlı değildir ($p>0.05$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4-7).

Test grubunda; Başlangıç, TS. 3.ay ve TS. 6.ay fakültatif anaerop bakteri sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda da; başlangıca göre 3.ayda meydana gelen azalmaya karşın, iki ölçüm zamanı arasındaki bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-8: Zorunlu anaerop bakteri sayılarının örnek zamanlarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol	Test	p[•]
		Ort±SE (medyan)	Ort±SE (medyan)	
ZORUNLU	Başlangıç	358,58±91,48 (247)	490,20±146,28 (240)	0,467
ANAEROP	TS 3. ay	324,61±695,83 (71,6)	261,24±102,92 (49,7)	0,512
SAYISI	TS 6. ay	392,69±81,45 (280)	405,74±113,42 (232)	0,525
(X10⁶CFU/ml)				
p[♣]		0,395	0,558	
†Başlangıç – 3. ay		0,433	0,279	
†Başlangıç – 6. ay		0,851	0,388	
†3. ay – 6. ay		0,638	0,346	

SE: Standart error

• : Mann Whitney U test

♣ : Friedman test

† : Wilcoxon sing Rank test

Zorunlu anaerop bakteri sayısı başlangıç değerlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir (p>0.05). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay değerlerinde test grubunda kontrol grubuna göre daha fazla azalma meydana gelmiş olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 4-8).

Kontrol grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay zorunlu anaerop bakteri sayısı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (p>0.05). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda da; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır (p>0.05); 3.ay ile 6.ay arasında görülen artışa rağmen, meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05) (Tablo 4-8).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay zorunlu anaerop bakteri sayısı değerleri arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (p>0.05). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda da; başlangıca göre 3. ay değerlerindeki azalmaya karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05) (Tablo 4-8).

Tablo 4-9: Siyah pigmentli bakteri sayılarının örnek zamanına göre değerlendirilmesi

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort $\pm$ SE (medyan)	Ort $\pm$ SE (medyan)	
Siyah Pigmentli CFU/ml	Başlangıç	26,98 $\pm$ 15,18 (4)	80,77 $\pm$ 22,31 (70)	0,008**
	TS 3. ay	0,88 $\pm$ 0,46 (0,03)	1,95 $\pm$ 1,23 (0,04)	0,881
	TS 6. ay	0,38 $\pm$ 0,18 (0)	4,07 $\pm$ 1,63 (0,02)	0,154
$p^{\clubsuit}$		0,001**	0,001**	
†Başlangıç – 3. ay		0,005**	0,008**	
†Başlangıç – 6. ay		0,006**	0,008**	
†3. ay – 6. ay		0,386	0,328	

SE: Standart error

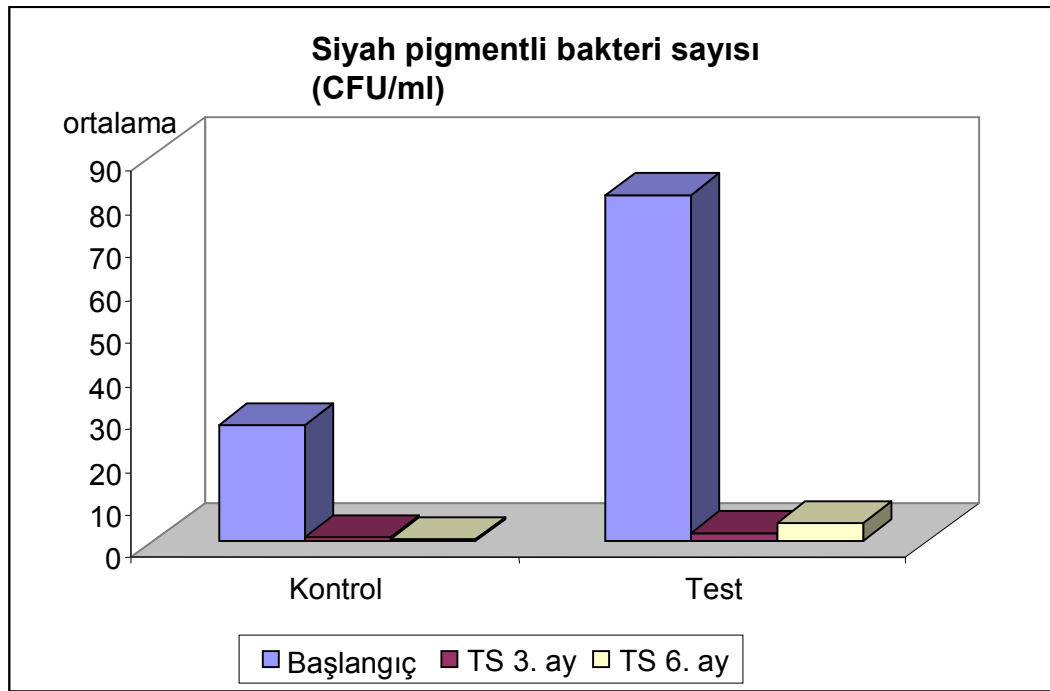
** $p < 0,05$ $\bullet$: Mann Whitney U test $\clubsuit$: Friedman test

† : Wilcoxon sing Rank test

Siyah Pigmentli bakteri sayısı başlangıç değerlendirmelerinde test grubunda görülen yükseklik istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay ölçümleri ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$) (Tablo 4-9).

Kontrol grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS. 6. ay siyah pigmentli bakteri sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0,01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen azalma (Şekil 12) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0,01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 12) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Tablo 4-9).

Test grubunda; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay siyah pigmentli bakteri sayısı ölçümleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0,01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ay ve 6.aylarda görülen azalma (Şekil 12) ileri düzeyde anlamlı bulunurken ($p < 0,01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 12) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Tablo 4-9).



Şekil 12: Siyah pigmentli bakteri sayılarının dağılım grafiği

Tablo 4-10: Kantitatif kültür bulgularının farklarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol	Test	P•
		Ort±SD (medyan)	Ort±SD (medyan)	
Zorunlu Anaerop Bakteri Sayısı CFU/ml	Başlangıç – TS 3.ay	-593.0±2508.5 (76.0)	228.9±693.3 (78.6)	0.698
	Başlangıç-TS 6. ay	-37.8±413.2 (-10.9)	118.7±670.2 (72.7)	0.504
	TS 3-TS 6. ay	555.1±2461.9 (-202.5)	-122.7±622.2 (-66.7)	0.817
Siyah Pigmentli Bakteri Sayısı CFU/ml	Başlangıç – TS 3.ay	26.03±53.33 (4.0)	79.73±66.98 (70.0)	0.007**
	Başlangıç-TS 6. ay	26.54±54.31 (4.0)	77.10±65.42 (70.0)	0.010*
	TS 3-TS 6. ay	0.47±1.53 (0.0)	-2.12±7.54 (0.0)	0.251

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

• : Mann Whitney U test

Zorunlu anaerop bakteri sayısı değerlendirmeleri; Başlangıç değerlere göre TS 3.ay değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay zorunlu anaerop bakteri sayıları arasında meydana gelen değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-10).

Siyah pigmentli bakteri sayısı değerlendirmeleri; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.01$) (Tablo 4-10).

Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$); yine test grubunda meydana gelen değişim kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır. TS 3.ay ile TS 6.ay arasında meydana gelen değişimler de gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-10).

Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4-11: Total TIMP-1(pg) düzeylerinin değerlendirmesi

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort $\pm$ SD	Ort $\pm$ SD	
Total TIMP-1 (pg)	Başlangıç	674,62 $\pm$ 183,66	748,59 $\pm$ 268,98	0,415
	TS 3. ay	881,76 $\pm$ 911,45	827,88 $\pm$ 142,75	0,569
	TS 6. ay	793,70 $\pm$ 313,05	704,61 $\pm$ 150,36	0,375
$p^{\clubsuit}$		0,239	0,748	
†Başlangıç – 3. ay		0,337	0,808	
†Başlangıç – 6. ay		0,239	0,553	
†3. ay – 6. ay		0,731	0,598	

$\bullet$: Student t test

$\clubsuit$: Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

Total TIMP-1 (pg) başlangıç değerlerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay değerleri de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-11).

Kontrol grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay total TIMP-1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Total TIMP-1 düzeyinde 3. ayda başlangıca göre meydana gelen artışa karşın, bu fark anlamlı bulunmamıştır. TIMP-1 düzeyinde 3. aya göre 6. ayda düşüş meydana gelmiştir, ancak bu fark yine anlamlı değildir. ($p>0.05$) (Tablo 4-11).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay total TIMP-1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). Total TIMP-1 düzeyinde başlangıca göre 3. ayda meydana gelen artışa karşın, meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$); 3. aya göre 6. ayda düşüş meydana gelmiştir, ancak bu değişim anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4-11).

Tablo 4-12: TIMP-1 (pg/vol) düzeylerinin değerlendirilmesi

		Kontrol	Test	$p^{\bullet}$
		Ort $\pm$ SD	Ort $\pm$ SD	
TIMP-1 (pg/vol)	Bazal	3455,26 $\pm$ 1828,89	3412,56 $\pm$ 2505,49	0,960
	TS 3. ay	5626,84 $\pm$ 9047,75	3951,96 $\pm$ 2065,88	0,537
	TS 6. ay	5029,53 $\pm$ 2776,81	4735,49 $\pm$ 2286,04	0,770
$p^{\clubsuit}$		0,024*	0,273	
†Başlangıç – 3. ay		0,350	0,565	
†Başlangıç – 6. ay		0,036*	0,273	
†3. ay – 6. ay		0,819	0,385	

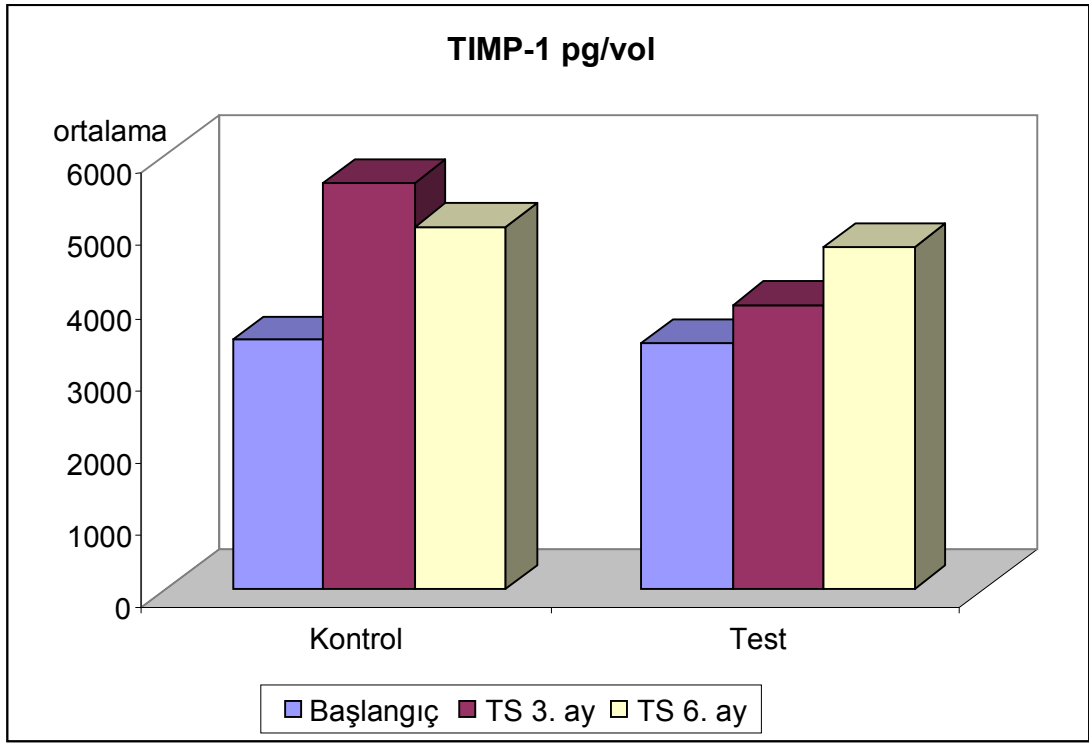
* $p < 0.05$ $\bullet$: Student t test $\clubsuit$: Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

TIMP-1 (pg/vol) başlangıç düzeylerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 3. ay ve 6. ay düzeyleri de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 6. ay TIMP-1 (pg/vol) düzeyleri test grubunda artış yönündeki eğilimine devam ederken, kontrol grubunda azalmaya başlamaktadır (Tablo 4-12).

Kontrol grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay TIMP-1 (pg/vol) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3. ayda meydana gelen artış (Şekil 13) istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p > 0.05$); başlangıç ile 6. ay düzeyleri arasında meydana gelen değişim anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$); 3. ay ile 6. ay arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-12).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay TIMP-1 (pg/vol) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda da; başlangıç düzeylere göre hem 3. ayda hem de 6. ayda meydana gelen artışa (Şekil 13) rağmen aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4-12).



Şekil 13: TIMP-1 pg/vol düzeylerinin dağılım grafiği

Tablo 4-13: Total MMP-1 (pg düzeyi) düzeylerinin değerlendirilmesi

		Kontrol	Test	p[•]
		Ort±SD	Ort±SD	
	Başlangıç	405,03±124,56	432,40±197,33	0,681
Total MMP	TS 3. ay	299,46±124,07	249,19±75,65	0,230
	TS 6. ay	289,01±142,26	261,49±78,86	0,555
p[♣]		0,012*	0,007**	
†	Başlangıç – 3. ay	0,003**	0,001**	
†	Başlangıç – 6. ay	0,042*	0,007**	
†	3. ay – 6. ay	0,810	0,661	

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

• : Student t test

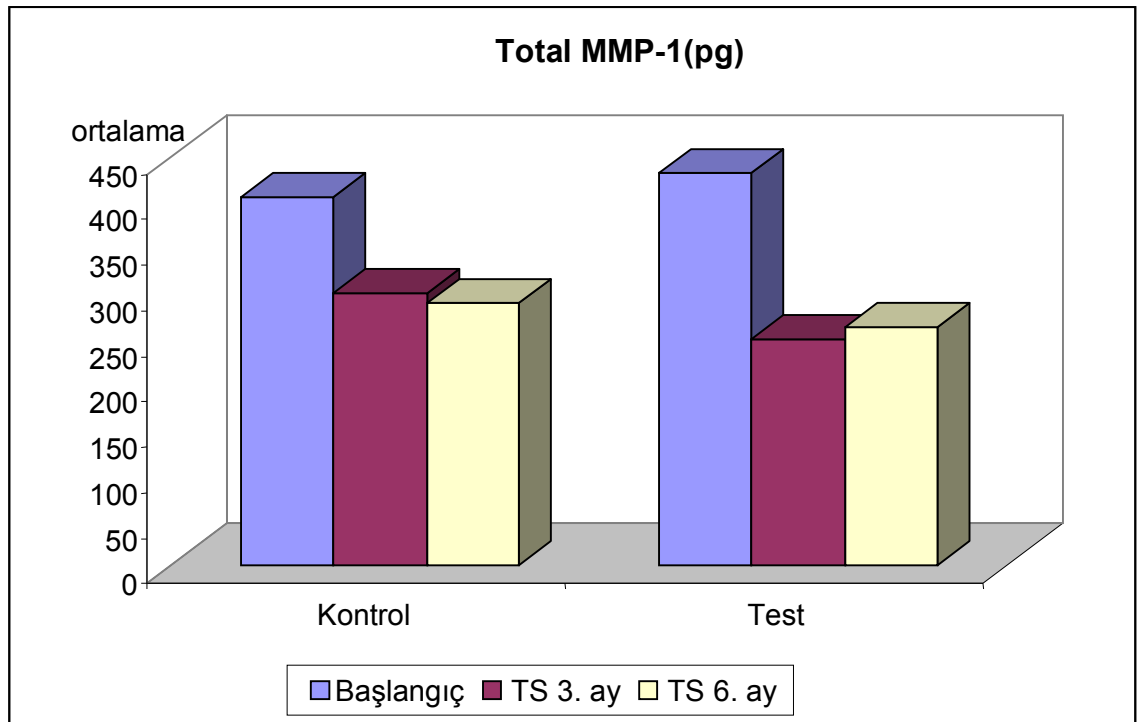
♣ : Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

Total MMP-1 (pg) başlangıç düzeylerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay değerleri de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-13).

Kontrol grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay Total MMP-1 (pg) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ayda enzim düzeyinde meydana gelen azalma ($p < 0.01$) ve başlangıca göre 6.ayda meydana gelen azalma (Şekil 14) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$); 3.ay ile 6.ay arasında meydana gelen değişim (Şekil 14) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-13).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay Total MMP-1 (pg) değerleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık vardır ($p < 0.01$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ayda ve başlangıca göre 6.ayda enzim düzeyinde meydana gelen azalma (Şekil 14) istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim (Şekil 14) istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-13).



Şekil 14: Total MMP-1(pg) düzeylerinin dağılım grafiği

Tablo 4-14: MMP-1 (pg/vol) ölçümlerinin değerlendirilmesi

		Kontrol	Test	<i>p</i> •
		Ort±SD	Ort±SD	
MMP-1 (pg/vol)	Başlangıç	2072,45±1110,43	2434,39±1947,68	0,574
	TS 3. ay	1734,97±910,03	1320,47±746,70	0,215
	TS 6. ay	1805,83±1499,93	1723,73±799,08	0,866
<i>p</i> ♣		0,623	0,04*	
†Başlangıç – 3. ay		0,338	0,047*	
†Başlangıç – 6. ay		0,616	0,239	
†3. ay – 6. ay		0,898	0,188	

* $p < 0.05$

• : Student t test

♣ : Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi

† : Paired samples test

MMP-1 (pg/vol) başlangıç düzeylerinde test ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p > 0.05$). Tedavi sonrası 3.ay ve 6.ay enzim düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 4-14).

Kontrol grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay MMP-1 (pg/vol) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda başlangıca göre 3. ayda ve başlangıca göre 6. ayda enzim düzeylerinde azalma meydana gelmesine karşın, görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$); 3.ay ile 6.ay arasındaki değişim de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-14).

Test grubu; Başlangıç, TS 3. ay ve TS 6. ay MMP-1 (pg/vol) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p < 0.05$). Yapılan grup içi karşılaştırmalarda; başlangıca göre 3.ayda meydana gelen azalma anlamlı bulunurken ($p < 0.05$); başlangıca göre 6.ayda meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$); 3.ay ile 6.ay arasında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$) (Tablo 4-14).

Tablo 4-15: Biyokimyasal ölçümlerin farklarına göre değerlendirilmeleri

		Kontrol	Test	<i>p</i> •
		Ort±SD (medyan)	Ort±SD (medyan)	
Total TIMP-1 (pg)	Başlangıç – TS 3.ay	-234,4±879.3 (-59.5)	20,71±287.46 (-34.0)	0.918
	Başlangıç-TS 6. ay	-124.7±378.6 (-86.8)	43.97±248.9 (-5.10)	0.258
	TS 3-TS 6. ay	88.1±974.2 (-74.8)	23.26±148.4 (25.5)	0.130
Total MMP-1 (pg)	Başlangıç – TS 3.ay	105.5±115.1 (119.9)	183.2±147.1 (172.2)	0.261
	Başlangıç-TS 6. ay	116.0±230.5 (166.0)	179.9±179.5 (229.1)	0.407
	TS 3-TS 6. ay	10.45±165.3 (33.8)	-12.29±94.39 (13.83)	0.464
MMP-1 (pg/vol)	Başlangıç – TS 3.ay	337.4±1317.5 (109.26)	1113.9±1727.1 (434.5)	0.329
	Başlangıç-TS 6. ay	266.6±2011.6 (363.8)	710.6±1976.7 (650.8)	0.845
	TS 3. ay-TS 6. ay	-70.8±2106.3 (262.3)	-403.2±994.4 (-445.3)	0.362

• : Mann Whitney U test

Total TIMP-1 (pg) düzeyi ölçümleri; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay molekül düzeyleri arasındaki değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-14).

Total MMP-1(pg) ölçümleri; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay arasında meydana gelen değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-14).

MMP-1 (pg/vol) ölçümleri; Başlangıca göre TS 3.ay değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Başlangıca göre TS 6.ay değişimleri ve TS 3.ay ile TS 6.ay arasında meydana gelen değişimler de gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-14).

Tablo 4-16: PCR analizleri sonrası Pi, Pn ve Pp saptanma durumuna göre gruplar arası değerlendirmeler

	Kontrol	Test	<i>p</i> •
	n (%)	n (%)	
Pi (başlangıç)	4 (% 33,3)	4 (% 36,4)	1,000
Pi (TS 3.ay)	2 (% 20,0)	4 (% 40,0)	0,652
Pi (TS 6.ay)	2 (% 16,7)	4 (% 40,0)	†0,221
Pn (başlangıç)	0 (% 0,0)	1 (% 9,1)	0,478
Pn (TS 3.ay)	0 (% 0,0)	2 (% 20,0)	0,195
Pn (TS 6.ay)	0 (% 0,0)	2 (% 20,0)	0,195
Pp (Başlangıç)	5 (% 41,7)	1 (% 9,1)	0,155
Pp (TS 3.ay)	4 (% 33,3)	2 (% 20,0)	0,646
Pp (TS 6.ay)	2 (% 20,0)	1 (% 10,0)	0,594

• : Fisher's exact test

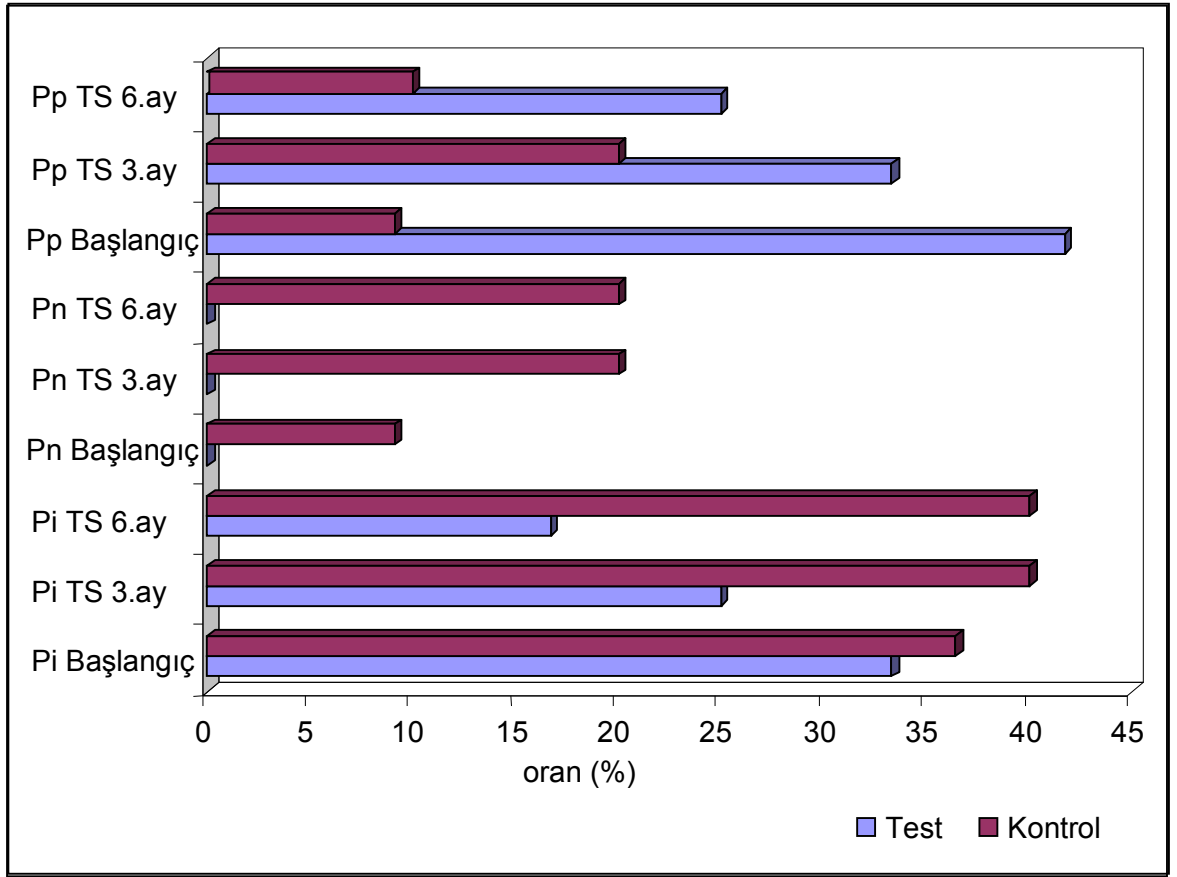
†: Ki kare test

Başlangıç analizlerde saptanan Pi (*Prevotella intermedia*) oranları (Şekil 15) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Pi saptanma oranlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4-16).

Başlangıç analizlerde saptanan Pn (*Prevotella nigrescense*) oranları (Şekil 15) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranları (Şekil 15) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6. ayda Pn görülme oranlarına göre gruplar arasında yine anlamlı fark görülmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4-16).

Başlangıç analizlerde saptanan Pp (*Prevotella pallens*) başlangıç oranları (Şekil 15) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranları (Şekil 15) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Pp saptanma oranlarına göre gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 4-16).

($p>0.05$).



Şekil 15: PCR analizleri sonrası Pi, Pn ve Pp saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı

Tablo 4-17: PCR analizleri sonrası Tf, Td ve Pg saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı

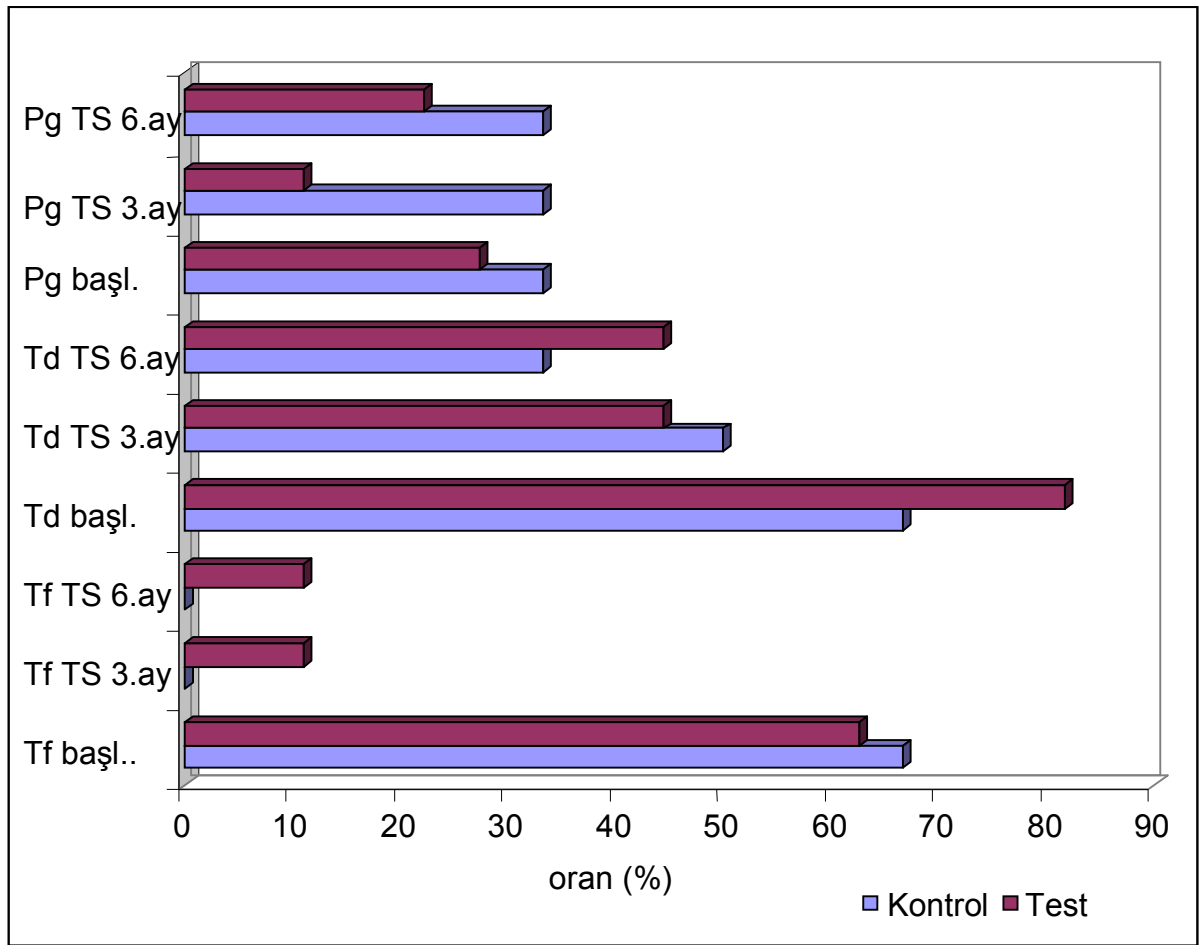
	Test	Kontrol	<i>p</i> •
	n (%)	n (%)	
Tf (başlangıç)	8 (% 66,7)	7 (% 63,6)	1,000
Tf (TS 3.ay)	0 (% 0,0)	1 (% 11,1)	0,429
Tf (TS 6.ay)	0 (% 0,0)	1 (% 11,1)	0,429
Td (başlangıç)	7(% 63,6)	7 (% 63,6)	0,640
Td (TS 3.ay)	5 (% 45,5)	4 (% 44,4)	1,000
Td (TS 6.ay)	4 (% 33,3)	4 (% 44,4)	0,673
Pg (başlangıç)	3 (% 27,3)	4 (% 33,3)	1,000
Pg (TS 3.ay)	1 (% 11,1)	4 (% 33,3)	0,338
Pg (TS 6.ay)	2 (% 22,2)	4 (% 33,3)	0,659

• : Fisher's exact test

Başlangıç (tedavi öncesi) PCR analizlerde Tf (*Tannerella forsythia*) görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); Tedavi sonrası 3.ayda Tf görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Tf'nin görülme oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-17).

Başlangıç (tedavi öncesi) PCR analizlerde Td (*Treponema denticola*) görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); Tedavi Sonrası 3.ayda Td görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Td'nin görülme oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-17).

Başlangıç (tedavi öncesi) PCR analizlerde Pg (*Porphyromonas gingivalis*) görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$); Tedavi Sonrası 3.ayda Pg görülme oranları (Şekil 16) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Pg görülme oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-17).



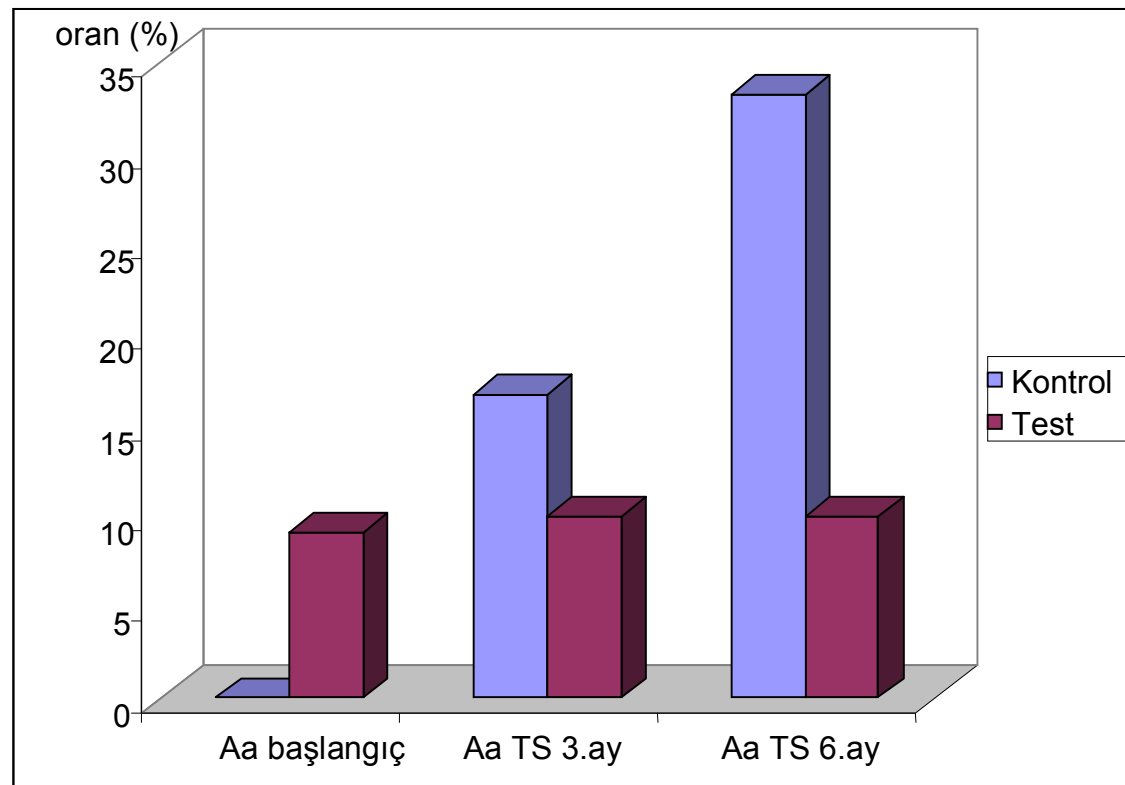
Şekil 16: PCR analizleri sonrası Tf, Td ve Pg saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı

Tablo 4-18: PCR analizleri sonrası Aa saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı

	Kontrol	Test	<i>p</i> •
	n (%)	n (%)	
Aa Başlangıç	0 (% 0,0)	1 (% 9,1)	0,478
Aa TS 3.ay	2 (% 16,7)	1 (% 10,0)	1,000
Aa TS 6.ay	4 (% 33,3)	1 (% 10,0)	0,323

• : Fisher's exact test

Başlangıç (tedavi öncesi) PCR analizlerde Aa (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) görülme oranları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 3.ayda Aa görülme oranları (Şekil 17) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). Tedavi sonrası 6.ayda yine Aa görülme oranları (Şekil 17) gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-18).

**Şekil 17:**PCR analizleri sonrası Aa saptanma oranlarının gruplara göre dağılımı

Tablo 4-19: Pi varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol			Test		
	n	%	<i>p</i> •	n	%	<i>p</i> •
Pi Başlangıç	4	36.4	0.500	4	40.0	1.000
Pi TS. 3.ay	2	18.2		4	40.0	
Pi Başlangıç	4	36.4	0.500	4	40.0	1.000
Pi TS 6.ay	2	18.2		4	40.0	
Pi TS. 3.ay	2	18.2	1.000	4	44.4	0,500
Pi TS 6.ay	2	18.2		4	44.1	

• : McNemar test

Kontrol grubu olgularda; Başlangıçta Pi görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pi görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pi görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pi görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-19).

Test grubu olgularda; Başlangıçta Pi görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pi görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pi görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pi görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pi de bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-19).

Tablo 4-20: Pn varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

Kontrol			
	n	%	p•
Pn Başlangıç	1	10.0	1.000
Pn TS. 3.ay	2	20.0	
Pn Başlangıç	1	10.0	1.000
Pn TS 6.ay	2	20.0	
Pn TS. 3.ay	1	11.1	1,000
Pn TS 6.ay	2	22.2	

• : McNemar test

Test grubu olgularda; Başlangıçta, TS 3.ayda ve TS 6.ayda Pn de bakteri görülmemiştir (Tablo 4-20).

Kontrol grubu olgularda; Başlangıçta Pn görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pn görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pn görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pn görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-20).

Tablo 4-21: Pp varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol			Test		
	n	%	p•	n	%	p•
Pp Başlangıç	5	45,5	1.000	1	10,0	1.000
Pp TS 3.ay	4	36,4		2	20,0	
Pp Başlangıç	4	36,4	0,625	1	10,0	1.000
Pp TS 6.ay	2	18,2		1	10,0	
Pp TS 3.ay	4	36,4	1.000	2	22,2	1.000
Pp TS 6.ay	2	18,2		1	10,0	

• : McNemar test

İlaç kullanılmayan olgularda; başlangıçta Pp görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pp görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pp görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pp de bakteri görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pp görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-21).

İlaç kullanan olgularda; başlangıçta Pp görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pp de bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pp görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pp de bakteri görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pp görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-21).

Tablo 4-22: Tf varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Test			Kontrol		
	n	%	<i>p</i> •	n	%	<i>p</i> •
Tf Başlangıç	8	66,7	0,016*	5	55,6	0.125
Tf TS. 3.ay	0	-		1	11.1	
Tf Başlangıç	8	66,7	0,016*	5	55,6	0.219
Tf TS 6.ay	0	-		1	11.1	
Tf TS. 3.ay	0	-	-	1	11.1	-
Tf TS 6.ay	0	-		1	12,5	
• : McNemar test		* <i>p</i> <0.05				

Test grubu olgularda; Başlangıç analizlerde kontrol grubundaki bireylerin %66,7'sında Tf varlığı saptanmıştır, ancak tedavi sonrası 3.ayda kontrol grubu bireylerin hiçbirinden aynı bakteri izole edilememiştir; bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Başlangıç Tf görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Tf görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4-22).

Kontrol grubu olgularda; Başlangıç analizlerde bireylerin %55,6'sında Tf varlığı saptanmıştır, tedavi sonrası 3. ayda ise test grubu bireylerin % 11.1'inde aynı bakteri izole edilmiştir. Meydana gelen azalmaya rağmen bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçtaki Tf görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Tf görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Tf de bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-22).

Tablo 4-23: Td varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol			Test		
	n	%	p•	n	%	p•
Td Başlangıç	7	63,6	0,687	7	77,8	0,375
Td TS. 3.ay	5	45,5		4	44,4	
Td Başlangıç	7	63,6	0,453	7	77,8	0,250
Td TS 6.ay	4	36,4		4	44,4	
Td TS. 3.ay	5	45,5	1.000	4	50,0	1.000
Td TS 6.ay	4	36,4		4	44,4	

• : McNemar test

Kontrol grubu olgularda; Başlangıçta Td görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Td görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıç Td görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Td görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-23).

Test grubu olgularda; Başlangıçta Td görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Td görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıç Td görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Td görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-23).

Tablo 4-24: Pg varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol			Test		
	n	%	p•	n	%	p•
Pg Başlangıç	4	36,4	1,000	3	27,3	1,000
Pg TS. 3.ay	4	36,4		1	11,1	
Pg Başlangıç	4	36,4	1,000	3	27,3	0,250
Pg TS 6.ay	4	36,4		2	22,2	
Pg TS. 3.ay	4	36,4	1,000	1	12,5	1,000
Pg TS 6.ay	4	36,4		2	25,0	

• : McNemar test

Kontrol grubu olgularda; Başlangıçta Pg görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pg görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pg görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pg görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-24).

Test grubu olgularda; Başlangıçta Pg görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Pg görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Pg görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Pg görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-24).

Tablo 4-25: Aa varlığının grup içi değişimlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol			Test		
	n	%	p•	n	%	p•
Aa Başlangıç	0	0	1,000	1	10,0	1,000
Aa TS. 3.ay	2	9,1		1	10,0	
Aa Başlangıç	0	0	0,250	1	10,0	1,000
Aa TS 6.ay	4	27,3		1	10,0	
Aa TS. 3.ay	2	18,2	0,500	1	11,1	1.000
Aa TS 6.ay	4	36,4		1	11,1	

• : McNemar test

Kontrol grubu olgularda; Başlangıçta Aa görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Aa görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Aa görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Aa görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-25).

Test grubu olgularda; Başlangıçta Aa görülme oranı ile tedavi sonrası 3.ayda Aa görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Başlangıçta Aa görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda Aa görülme oranları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Tedavi sonrası 3.ayda bakteri görülme oranı ile tedavi sonrası 6.ayda bakteri görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-25).

Tablo 4-26: Kırmızı kompleks (Tf, Td, Pg) varlığının gruplara göre değerlendirilmesi

		Kontrol n (%)	Test n (%)	<i>p</i> •
Tf+Td+Pg Başlangıç	0	1 (% 8,3)	0	0,758
	1	4 (Td) (%33,3)	Td:5 5 (%45,5)	
	2	Td+Pg:2 Tf+Td:3 5 (%41,7)	Tf+Td:2 Td+Pg:2 4 (% 36,4)	
	3(Tf+Td+Pg)	2 (%16,7)	2 (%18,2)	
Tf+Td+Pg TS 3.ay	0	4 (%33,3)	4 (%44,4)	0,856
	1	Td:3 Pg:3 6 (%50,0)	Td:4 4 (% 44,4)	
	2	Td+Pg:2 2 (%16,7)	Tf+Td:1 1 (%11,1)	
Tf+Td+Pg TS 6.ay	0	7 (%58,3)	Tf+Td:2 Td+Pg:2 4 (%44,4)	0,668
	1	Td:1 Pg:1 2 (%16,7)	3 (% 33,3)	
	2	Td+Pg:3 3 (%25,0)	Tf+Td:2 2 (%22,2)	

• : Ki kare test

Grupların başlangıç Tf, Td, Pg dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-26).

Tf, Td, Pg tedavi sonrası 3.ay dağılımları da gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-26).

Tf, Td, Pg tedavi sonrası 6.ay dağılımları da gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$) (Tablo 4-26).

Tablo 4-27: Saf kültürde yapılan PCR incelemeleri sonuçları

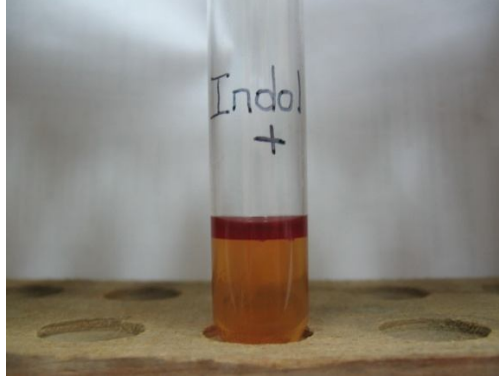
	Test			Kontrol		
	Pi	Pn	Pp	Pi	Pn	Pp
Başlangıç	5	1	1	5	2	1
3. ay	5	--	1	1	--	3
6. ay	2	2	--	1	--	2

Prevotella cinsi bakteriler tür düzeyinde incelendiğinde *P. intermedia* grubu olarak adlandırılmış ve PCR ile yapılan tür ayrımında 19 suşun *P. intermedia*, 5 suşun *P. nigrescense* ve 8 suşun *P. pallens* olduğu belirlenmiştir. Başlangıç mikrobiyolojik incelemede test ve kontrol gruplarında 5'er hastada *P. intermedia*, test grubunda 1 hastada *P. nigrescense*, kontrol grubunda 2 hastada *P. nigrescense*, test ve kontrol gruplarında 1'er hastada *P. pallens*'e rastlanmıştır. 3. ayda test grubunda *P. intermedia* sayısında azalma gözlenmemiştir. Kontrol grubunda ise *P. intermedia* pozitif hasta sayısı 1'e düşmüştür. Kontrol grubunda başlanğıçta 1 olan *P. pallens* pozitif hasta sayısı 3. ayda 3 olarak gerçekleşmiştir.

P. gingivalis ise tüm çalışma hastalarının 5'inde kültür yöntemiyle izole edilmiştir. *P. gingivalis* pozitif bireylerin hiçbirinde kontrol zamanlarında aynı bakteri izole edilmemiştir (Tablo 4-27). Direk subgingival incelemelerde; test grubunda tüm örnek zamanlarında elde edilen suşlardan 12'sinin *P. intermedia*, 3'ünün *P. nigrescense*, 4'ünün *P. pallens* olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise bu rakamlar *P. intermedia* 8, *P. nigrescense* 1 ve *P. pallens* 9 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 4-28) .

Tablo: 4-28: Direk subgingival plak örneklerinde yapılan PCR incelemeleri

	Test			Kontrol		
	Pi	Pn	Pp	Pi	Pn	Pp
Başlangıç	4	--	3	4	1	3
3. ay	4	1	1	2	--	4
6. ay	4	2	--	2	--	2



Resim 1: Buyyonda indol oluşumu deneyi.
Indol: pozitif



Resim 2: API ZYM testinin uygulanması

5.TARTIŞMA

Periodontal hastalıkların tedavisinde periodontal başlangıç tedavisinin vazgeçilmez bir yeri vardır. Özellikle iyi plak kontrolü sağlandığı durumlarda diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemleri ile başarılı sonuçlar elde edildiği ve elde edilen iyi halin uzun süreler korunabildiği bilinmektedir. Ancak başarıyla uygulanmış tedaviye rağmen özellikle derin ceplerin bulunduğu bölgelerde subgingival plağın persiste kalabilmesi, mikroorganizmaların dentin tubulusları ve el aletleri ile yeteri kadar ulaşılamayan furkasyon bölgelerine yerleşmeleri, bazı patojenlerin yumuşak dokuya invaze olabilmeleri, gibi nedenlerle her zaman istenilen yanıt alınamayabilir [2;25;29;144]. Bunun yanı sıra periodontal patojenlerin ağız içinde dil, tonsillalar gibi farklı bölgelere yerleşmeleri nedeniyle buralardan kaynak alan patojenler nedeniyle tedavi sonrası erken dönemlerde rekolonizasyon, dolayısıyla da hastalığın tekrarlama eğilimine girmesi tedaviyi etkileyen önemli bir başarısızlık faktörü olarak kabul edilmektedir [10]. Cerrahi olmayan periodontal tedavinin başarısını etkileyen tüm bu faktörler gözönüne alındığında mekanik tedavinin çeşitli antimikrobiyallerle desteklenmesi gündeme gelmiştir [171]. Periodontal tedavide sistemik antibiyotik kullanımı ile ilgili ilk çalışmalar genellikle tekli antibiyotik uygulamalarını içermekteydi (tetrasiklinler, penisilin, klindamisin, metronidazol...). Bir dönem özellikle agresif periodontitislerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan tetrasiklinlerin 2000’li yıllarda yayınlanan bir araştırmaya göre dişeti oluk sıvısında ulaştığı konsantrasyonun serum konsantrasyonunun altında kaldığı gösterilmiştir [153].

Periodontitis lezyonlarının karışık patojenik bakteri içeriği düşünüldüğünde ise kombine antibiyotik uygulamaları dikkat çekmiştir. Bu kombinasyonlardan özellikle metronidazol-amoksisilin *A. actinomycetemcomitans* üzerine olan seçici etkisinin yanısıra çeşitli anaerobik periodontal infeksiyonlardaki etkileri nedeniyle oldukça kıymetli bir seçenektir [175]. Tüm bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde araştırmamızda metronidazol-amoksisilin kombine kullanımını tercih ettik. Literatürde önerilen dozların dışında ülkemizde antibiyotiklerin reçeteye bağlı kalmaksızın bilinçsiz kullanımının ve oluşmuş

potansiyel bir antibiyotik tolerans sorununun aşılmasının hedeflenmesi ve literatürde bizim dozumuzla aynı dozda amoksisilin (500 mg, 3x1) bizim kullanımımızdan (7 gün) daha uzun süre uygulanmış olması (14 gün) ve yine aynı çalışmada amoksisilin ile kombine kullanılan metronidazolün (250 mg, 3x1) 14 gün süreyle uygulanmış olması dolayısıyla daha yüksek dozda kullanmayı uygun gördük [85].

Periodontal başlangıç tedavisi sonrası ilk klinik değerlendirmeyi 3. ayda yaptık. Tedavinin uzun dönem etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 6. ayda da tüm değerlendirmelerimizi tekrarladık. Düzenli plak kontrolüne sahip bireylerde cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası iyileşmenin ~3-6 ayda tamamlanması nedeniyle kontrol zamanımızı bu süreyle sınırlı tutmayı uygun gördük [152].

Çalışmaya katılan bireylerden 2'sinde ilaç kullanımı esnasında diyare, 1'inde ise baş dönmesi şikayeti meydana geldi. Araştırmada yer alan bireyler düzenli aralıklarla plak kontrolü açısından izlendi ve gerekli görülen durumlarda supragingival diş yüzeyi temizlikleri tekrarlandı.

Periodontitis dişeti iltihabının varlığı, periodontal cep oluşumu, ataşman kaybı ve alveolar kemik kaybıyla karakterize bir hastalıktır [73]. Uygulanmış olan tedavinin klinik olarak etkinliğinin anlaşılması ancak bu parametrelerdeki değişimin ölçülmesiyle mümkün olmaktadır. Bu ölçümlerden en sık kullanılanları ve klinik kullanıma yönelik olanları plak indeksi, gingival indeks, sondalama derinliği ve klinik ataşman seviyesi ölçümleridir. Biz çalışmamızda tüm ölçümleri her bir diş için 6 noktadan gerçekleştirdik.

Matriks metalloproteinazların (MMP'ler) asıl işlevi hücre plazma membranı veya ekstraselüler matriks içinde bulunan proteinlerin yıkımıdır. Ekstraselüler matriks kollajen içeren ve kollajen içermeyen proteinlerden oluşur. Kollajenazların kollajen substrata erişebilmeleri için öncelikle belirli MMP'lerin proteoglikanları ve fibronektini ortadan kaldırması gerekir [154]. Fibroblastlar, keratinositler, nötrofiller, makrofajlar ve endotelial hücrelerden oluşan periodontal doku hücreleri MMP'lerin asıl kaynaklarını oluştururlar. Periodontal dokuların sağlık durumunda kollajen homeostazı MMP-1'in kontrolü altındadır. İltihap durumunda ise çeşitli mediatörler MMP üretimini artırır. MMP fonksiyonlarının düzenlenmesinde ise en önemli görev bunların endojen doku

inhibitörleri (TIMP'ler) ile α 2-makroglobuline düşmektedir. Doku inhibitörleri de tıpkı MMP'ler gibi fibroblast, keratinosit, endotel hücreleri, makrofajlar gibi konak hücreleri tarafından üretilirler. İltihaplı periodontal dokularda MMP'ler ile TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması klinik ataşmanın ve alveol kemiğinin kaybıyla sonuçlanır. Sağlık, gingivitis, kronik periodontitis, agresif periodontitis gibi farklı koşullar altında dişeti dokuları, dişeti oluk sıvısı ve tükürükte farklı seviyelerde MMP kombinasyonları gösterilmiştir [77;86].

Matriks metalloproteinaz seviyelerinin doku yıkımı ve remodeling esnasında artış gösterdiği bilinmektedir. Pek çok in vitro ve in vivo çalışmada MMP'ler ile periodontal hastalık arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur. Periodontitisli bireylerde dişeti oluk sıvısı ve doku örneklerinde MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 ve MMP-9 varlığı gösterilmiştir [3;202].

Hastalığın remisyon periyotlarında ise matriks metalloproteinazların doku inhibitörlerindeki (TIMP'ler) artış sayesinde dokuda tekrar bir denge gelişir. Soell ve ark. tarafından yapılan çalışmada periodontitisli bireylerin dişeti oluk sıvısı ve doku örneklerinde sağlıklı kontrollere göre daha yüksek oranda MMP-1 ve anlamlı daha düşük seviyelerde TIMP-1 gözlenmiştir [186].

Periodontal hastalık aktivitesinin belirlenmesinde yıkımın görüldüğü bölgelerde dişeti oluk sıvısı seviyelerinde artış olduğu bilinen MMP-1'in incelenmesi etkili bir yöntemdir. Biz çalışmamızda MMP-1 seviyeleri ile aynı kollajenazın doku inhibitörü olan TIMP-1 seviyelerinde tedaviye bağlı olarak gelişen değişimleri inceledik. Dişeti oluk sıvısı örnekleri tedavi öncesinde klinik ölçümlerden 1 hafta sonra, tedavi sonrası takip dönemlerinde ise klinik ölçümler öncesinde elde edilmiştir. Örnek alım yöntemi gereç ve yöntem bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmış olup, literatürle uyumludur.

Subgingival plağın mikrobiyolojik incelemesi etyolojiye yönelik araştırmaların yanısıra periodontitisin klinik tedavisinde doğru antibiyotik seçiminde de kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik incelemenin doğru sonuç vermesinde etkili faktörler den biri de plağın toplanmasında kullanılan tekniktir. Tanner ve Goodson [196] küret, scaler, paper point, kanül ve cep irrigasyonu yöntemlerini değerlendirmişlerdir. Kültür çalışmalarında paper point ile örnek toplama yönteminin daha yaygın kullanıldığını ancak burada özellikle dokuya

yapışık olan mikroorganizmalarda kayıp olabileceğini bildirmişlerdir. Kornman ise [94] küretle plak toplama yönteminden özellikle subgingival ekolojinin bozulmasının istenmediği durumlarda kaçınılması gerektiğini bildirmiştir. Loomer küret ve paper pointle plak toplama yöntemlerini kendi içlerinde değerlendirmiş ve paper pointlerle subgingival plağın dış tabakasından daha patojen olan mikroorganizmaların toplanabildiğini belirtmiştir [112]. Jervoe ve ark tarafından 2007’de yayınlanan araştırmaya göre ise küret ile plak toplama yöntemiyle tüm örnekleme zamanlarında daha fazla total bakteri sayılarına ulaşılmış, ancak hedef bakteriler açısından bulgular değerlendirildiğinde ki yöntem arasında benzer sonuçlara rastlandığı bildirilmiştir [88].

Çalışmamızda periodontal patojen varlığının belirlenmesinde literatürdeki antibiyotik çalışmalarıyla uyumlu olarak kantitatif veriler elde edebilmek amacıyla standart kültür yöntemi kullanılmış, daha sonra aynı örneklerde PCR analizleri de yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Varlığı kültür yöntemiyle de araştırılan *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella cinsi bakterilere* ek olarak *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* da aranmıştır. *Prevotella intermedia* grubunun tür ayrımı (*P. intermedia*, *P. nigrescense*, *P. pallens*) PCR yöntemiyle yapılmıştır.

Kültür yöntemi periodontal patojenlerin belirlenmesinde kullanılan referans yöntemdir. PCR yöntemleri ise (geleneksel veya real-time) hassas ve hızlı yöntemlerdir. Real-time PCR ile aynı zamanda kantitatif sonuçlar da alınabilmektedir. Bizim çalışmamızda gerek kültür gerekse PCR yöntemleriyle varlıkları araştırılan bakterilerden *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola*’nın hem periodontitisler hem de periimplantitislerle ilişkileri ortaya konmuştur [46;80;167;172;181;209].

Anaerobik kültür yöntemi canlı hücrelere dayalı bir yöntemdir. Bu teknik varolan tüm patojenlerin spesifik olmayan yolla araştırılabilmesini sağlar [168]. Bu şekilde beklenmedik patojen kolonileriyle de karşılaşılabilir. Rutin problemlerle ise bunu gerçekleştirmek mümkün değildir. Bu gibi avantajlarının yanısıra problemlerle karşılaştırıldığında özellikle düşük konsantrasyonlardaki mikroorganizmaları saptayamamaktadır. Kültür yönteminde bakterinin saptanma

eşığı 10^3 iken moleküler tekniklerde aynı eşik 10^2 ' dir. Real-time PCR yönteminde, Problar ve/veya primerlar hem yaşayan hemde ölü bakteri DNA'sını belirleyebilmektedir. Bu şekilde periodontal cebin hedef bakteriyle ilgili tarihçesini yansıttığı söylenebilir [214]. Burada değerlendirilmesi gereken bir diğer konu klinik kullanımda hangi yöntemin daha kıymetli olduğudur. Anaerobik kültür yöntemi cebin içinde bulunduğu devinimle ilgili daha fazla bilgi verirken PCR yöntemleri ise mevcut periodontitisin tarihçesini sunar. Problarla düşük konsantrasyonlarda dahi cep içinde yaşayan veya yaşamış patojenler belirlenebilir. Bu şekilde yalnızca hedef patojenlerle ilgili olarak daha hassas bir yöntem olduğu söylenebilir. Analiz sürelerinde ise anaerobik kültür yönteminde 7-8 gün gerekirken PCR için bu süreler çok daha kısadır. Kültür yönteminin bilinen en önemli avantajlarından biri de antibiyotik duyarlık testlerinin yapılabilmesidir.. Konvansiyonel ve moleküler teknikler birbirlerini tamamlayıcı teknikler olarak değerlendirilebilir.

Geleneksel mikrobiyolojik teknikler kullanılarak mikrobiyolojik açıdan karmaşık ekosistemlerle ilgili geniş skalalı çalışmalar yapmak mümkün olamamaktadır. Moleküler yöntemlerden real-time PCR yöntemi pek çok avantajına rağmen farklı türleri içeren geniş miktarda miktarlardaki örneklerin incelenmesi için uygun bir yöntem olamamaktadır [214]. Yeni prob-hedef formatındaki moleküler yöntemlerden checkerboard DNA-DNA hibridizasyon ise fazla sayıda tür içeren çok miktardaki örneğin detaylı şekilde çalışılmasına izin veren bir yöntemdir. Bu yöntem ilk kez Socransky ve ark. tarafından tanımlanmıştır [183]. Oral bakterilerin tespit edilmesinde 40 adet türe özgü DNA-DNA hibridizasyon probu kullanılan çalışmada subgingival plak içindeki bakteri türlerinin birbirinden farklı kompleksler halinde bulundukları gösterilmiştir. Socransky ve ark. cluster analizi kullanarak 5 ana bakteri kompleksi gözlemlemişlerdir. Bunlardan Pg, Tf ve Td' den oluşan kırmızı kompleks özellikle sondalanabilir cep derinliği ve sondalamada kanama gibi klinik parametrelerle yakından ilişkilidir [181]. Checkerboard yöntemi sağlıklı ve gingivitisli bireylerde supra ve subgingival plağın mikrobiyal içeriğinin belirlenmesinde, periodontal durumla ilişkili olarak tükürük mikrobiyota seviyelerinin belirlenmesinde, subgingival plak içeriği ve sigara ilişkisinin belirlenmesinde, farklı coğrafik bölgelerde subgingival mikrobiyotadaki farklılıkların gözlenmesinde, etnik/ırk

ilişkili gruplarda parodontal durumun saptanmasında, ayrıca farklı periodontal tedavilerin etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır [20;35;54;81;83]. Bu teknik hızlı, hassas ve diğer moleküler yöntemlere göre daha ucuzdur .

Periodontal yeniden değerlendirmenin dökümanite edildiği pek çok literatürde en uygun yeniden değerlendirme zamanı olarak 2 hafta ile 6 ay arasında değişen zaman aralıkları ifade edilmektedir. Amerikan Periodontoloji Akademisi'nin konsensüs raporuna göre ise tedavi sonrası başlangıç yanıtın değerlendirilmesinde 4-6 haftalık zaman aralığının yeterli olduğu bildirilmektedir [30]. Tedavi sonrası 1. haftada cep derinliğinde meydana gelen sığlaşmanın dişeti çekilmesiyle meydana geldiği, sonraki 3 haftalık zaman diliminde meydana gelen sığlaşmanın ise klinik ataşman seviyesindeki artışla ilgili olduğu bildirilmiştir. Periodontal başlangıç tedavisi sonrası uygun değerlendirme şartları şu şekilde sıralanabilir;

- BT (başlangıç tedavisi) sonrası diş yüzeyinde yeniden bağlantı epitelinin oluşumu için 1-2 haftanın geçmesi gerekmektedir; iki haftadan önce yapılan klinik değerlendirme için aşırı erkendir.
- BT sonrasında bağ dokusunun tamiri için 4-8 haftalık bir zamanın geçmesi gerekmektedir.
- Mekanik temizlik sonrası subgingival mikroflora yeniden iki ay içinde tedavi öncesi kompozisyonuna ve seviyelerine dönme eğilimindedir.
- İki aydan daha uzun bir süre sonra yeniden değerlendirme yapılması patojen bakteriler periodontal cepler içinde yeniden çoğalmış olacakları için uygun değildir.
- Literatürle uyumlu olarak BT sonrası 4-8 hafta arası uygun değerlendirme zamanı olarak düşünülebilir.
- Belirlenen zamanda klinik değişkenlerde özellikle anterior dişlerde azalma beklenirken aynı düzeyde iyileşmeye furkasyon bölgelerine sahip çok köklü dişlerde rastlanmayabilir.

- Oklüzal düzenleme sonrası yeniden değerlendirme için ise 6-12 ay beklenmelidir. [160].

Periodontal başlangıç tedavisinin amacı iltihabın parametrelerinin azaltılarak çözülmesi, cep derinliğinde sığlaşma elde edilmesi, klinik ataşman seviyesinde kazanç sağlanmasının yanısıra telkinlerle hastanın ağız bakımı alışkanlıklarının optimum düzeylere ulaştırılarak tedavinin iyi sonuçlarının devamının sağlanmasıdır.

Çalışmamızda tedavi prosedürü dört segment diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemlerinin tamamlanması şeklinde tasarlanmıştır. Test grubu mekanik temizliğin başladığı birinci günde antibiyotik kullanmaya başladı, kontrol grubu ise başlangıç tedavisini destekleyici nitelikte herhangi bir ilaç veya antiseptik kullanmadı. Antibiyotik kullanım süresinin bir hafta olması dolayısıyla başlangıç tedavisinin de her iki grupta bir hafta içinde bitirilmesi planlandı.

İlk kez Quirynen ve ark. tarafından tanımlanan ‘tek aşamalı başlangıç tedavisi’ tek seansta dört segment diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme işlemlerinin tamamlanması esasına dayanmaktadır. Burada amaç tedavi edilmemiş bölgelerden tedavisi tamamlanmış bölgelere olacak olan muhtemel bulaşmanın önüne geçmektir [138]. Çalışma sonuçlarına göre tek seansta tedavisi bitirilen grubun klinik ve mikrobiyolojik bulguları daha iyidir. Apatzidou ve Kinane tarafından daha sonra yayınlanan, tek aşamalı tedavi ile kadrantların farklı haftalarda tedavisinin klinik ve mikrobiyolojik değişkenler açısından karşılaştırıldığı çalışmaya göre ise gruplar arasında takip zamanlarında anlamlı fark bulunmamıştır [6;7]. Biz de çalışmamızda hasta açısından tolere edilmesi daha kolay olan iki aşamalı tedavi şeklini tercih ettik.

Çalışmamızın kantitatif mikrobiyolojik bulgularında her iki grupta da total bakteri sayılarında başlangıç değerlere göre azalma meydana gelmiş ancak test grubunda meydana gelen azalma kontrol grubuna göre daha fazla düzeyde gerçekleşmiştir (Tablo 4-6). Zorunlu anaerob bakteri sayılarında ise yine test grubunda 3.ayda kontrol grubuna göre daha fazla azalma meydana gelmiş, 6.ayda bakteri sayıları her iki grupta da tekrar artmıştır (Tablo 4-8). Periodontal hastalıkla yakından ilişkilendirilen siyah pigmentli patojen sayılarında ise her iki grupta da başlangıca göre 3. ve 6. aylarda istatistiksel anlamlı azalma meydana gelmiş (Tablo

4-9), ancak farkların değerlendirmesine bakıldığında test grubunda istatistiksel anlamlı farklılık görülmektedir (Tablo 4-10). Bu durum kullanılan antibiyotiklerin özellikle yakın takip döneminde (3. ay) daha etkili olmasıyla açıklanabilir. 6.ayda kontrol grubunda test grubuna göre daha az sayıda siyah pigmentli patojen izole edilmesi ise başlangıçta test grubunda anlamlı düzeyde daha fazla siyah pigmentli bakteri bulunmasıyla ilişkili olabilir.

Çalışmamızda idame fazında (başlangıç ile 3.ay, 3.ay ile 6.ay arası) yalnızca supragingival temizlik yapılmıştır. Periyodik yapılan subgingival temizlikler idame fazında daha fazla tercih edilmekle birlikte supra ve subgingival temizliğin idame fazındaki etkilerinin doğrudan karşılaştırıldığı tek çalışma olan Jenkins'in çalışmasında anlamlı farktan bahsedilmemektedir [87].

Çalışmamızın klinik bulguları plak indeks skorlarının her iki grupta iki takip zamanında da (3. ay ve 6. ay) anlamlı düzeyde azaldığını, test ve kontrol grupları arasında fark olmadığını göstermektedir. Bu durum dört haftada bir yapılan supragingival temizlik ve profilaksi işlemleri, aynı zamanda ağız bakımı eğitiminin her seansta tekrarlanmasıyla açıklanabilir. Gingival indeks değerleri de plak skorlarına paralel olarak her iki takip döneminde de anlamlı düzeyde azalmış ve yine test ve kontrol grupları arasında fark bulunmamıştır. Çalışmamızın bu bulguları literatürle uyumludur [15;83;133].

Çalışmamızda başlangıç cep derinliklerine göre ayırım yapılmamış olup, ölçümler ağız içinde bulunan tüm dişlerden, örnekler ise tek kök/çok kök ayrımı yapılmaksızın en derin periodontal cep bölgelerinden elde edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalara göre daha sığ olan başlangıç ataşman seviyeleri ve cep derinlikleri sığ bölgeler nedeniyle ağız ortalamasında meydana gelen azalmayla ilişkilidir [15;149].

Literatürde antibiyotik kullanımına ilişkin yeralan pek çok derleme ve meta-analize rağmen halen belirli hastalık tiplerine özgü standart protokoller bulunmamaktadır . Subgingival biofilmlerde bulunan mikrobiyal komplekslerin farklılığı nedeniyle kişiye özgü ilaç seçiminde mikrobiyolojik örnekleme, antibiyotik duyarlık testleri ve ilacın DOS konsantrasyonları ile minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) bilinmelidir [13;82].

Çalışmamızda klinik ataşman seviyelerinde 3. ayda elde edilen kazancın stabilitesini koruyamadığı ve 6. aya ulaşıldığında ataşman kaybının (klinik olarak anlamlı olmasa bile) başladığı görülmektedir. Hasta grubumuz generalize agresif periodontitisli bireylerden oluşmaktadır. Bu durum bu hasta grubunda konak savunmasındaki yetersizliğin bir göstergesi olarak kabul edilebilir [91].

Çalışmamızın subgingival plak örneklerinden doğrudan yapılan PCR incelemelerinin sonuçlarına baktığımızda; *P. intermedia* prevalansında; test grubunda başlangıç değerler ile takip dönemleri arasında prevalansta değişiklik meydana gelmemiştir. Kontrol grubunda ise *P. intermedia* prevalansında 6. ayda %50 azalma gerçekleşmiş, ancak tam eliminasyon meydana gelmemiştir. Bununla birlikte çalışmamızın kantitatif bulgularında siyah pigmentli patojen sayısında her iki grupta anlamlı azalma meydana gelmiştir. *P. pallens* prevalansında; kontrol grubunda başlangıçta *P. pallens* (+) olan beş bireyin birinde 3. ayda *P. pallens* eliminasyonu görülmüş, 6. ayda ise prevalansta azalma devam etmiştir. Test grubunda 3. ayda *P. pallens* prevalansı artmış, 6. ayda ise tekrar başlangıç düzeyine dönmüştür (Tablo 4-16). Literatürde bu bakteri ile ilgili antibiyotik çalışması yoktur. Biz bakterinin azaltılması/eliminasyonunun yalnızca mekanik tedavi ile sağlanabileceğini düşünmekteyiz. *T. forsythia* prevalansında; test grubunda başlangıçta *T. forsythia* (+) olan sekiz hastanın hiçbirinde 3. ve 6. aylarda aynı bakteriye rastlanmamış olup, tam eliminasyon sağlanmıştır. Kontrol grubunda ise *T. forsythia* (+) olan beş hastanın birinde 3. ayda aynı bakteriye rastlanmış, 3. ayda oluşan tablo 6. ayda korunmuştur (Tablo 4-22). *T. denticola* prevalansında; her iki grupta da başlangıçta 7 olan *T. denticola* pozitif birey sayısı test grubunda 3. ayda 5, kontrol grubunda ise 4 olarak saptanmıştır. 6. ayda ise test grubunda *T. denticola* pozitif birey sayısı 4'e düşmüş, kontrol grubunda herhangi bir değişim söz konusu olmamıştır. (Tablo 4-23). Literatür ile uyumlu olarak yalnızca mekanik tedavi ile bakteri uzun süreler baskılanabilir. *P. gingivalis* prevalansına baktığımızda; kontrol grubunda dokuya invaze olma yeteneği bilinen *P. gingivalis*'in prevalansında takip zamanlarında azalmaya rastlanmamıştır (Tablo 4-24). Literatürde bakterinin antibiyotik kullanımının hemen sonrasında (10. gün) eliminasyon bildiren çalışmalar mevcuttur [50;57;58], ancak bizim antibiyotik uygulama sonrası ilk değerlendirmemiz 3. ayda gerçekleşmiştir. Test grubunda ise 3. ayda prevalansta başlangıca göre azalma meydana gelmiş, ancak

6. ayda tekrar başlangıç değerlere dönme eğilimi kazanmıştır. Bu durum ağız içi diğer bölgelerden bulaşma sonucunda rekolonizasyon ihtimalini akla getirmektedir. Bulgularımız literatür ile uyumludur. *A. actinomycetemcomitans* varlığında; kontrol grubunda başlangıçta Aa varlığı tespit edilememiştir. Ancak diğer takip dönemlerinde *A. actinomycetemcomitans* pozitifliğine rastlanmış, 3. ayda iki bireyde *A. actinomycetemcomitans* görülürken, 6. ayda dört bireyde bakteri varlığına rastlanmıştır. Bu durum *A. actinomycetemcomitans*'nın mekanik tedavi ile yetersiz eliminasyonu ya da ağız içi diğer bölgelerden bakterinin bulaşmasıyla ilişkilendirilebilir. Test grubunda ise bir hastada başlangıçta tespit edilen pozitiflik devam etmiş, ancak *A. actinomycetemcomitans* prevalansında artış olmamıştır. Bu durum antibiyotik ile diğer bölgelerde bulunan bakterinin de baskılanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak literatür karşılaştırması yapmak için sayımız yetersizdir.

Ehmke ve ark. tarafından yapılan 24 ay takipli çalışmada bizim çalışmamızın PCR incelemelerinde varlıklarını araştırdığımız patojenlere yine PCR yöntemiyle bakılmıştır [50]. Çalışmanın [50] mikrobiyolojik bulgularına göre; *A.actinomycetemcomitans* dışında varlığı araştırılan hiçbir patojende uzun dönemde tam bir eradikasyon sağlanmamıştır. 24.ayın sonunda ise *A.actinomycetemcomitans* prevalansının kontrol grubunda da azalmış olması nedeniyle gruplar arasında anlamlı fark gerçekleşmemiştir. Ancak 3. ve 18.aylar arası değerlerde test grubunda bakteri anlamlı oranda azalmıştır. Test grubunda yalnızca bir hastada *P. gingivalis* eradikasyonu sağlanmıştır. *P. gingivalis* prevalansı ile ilgili geçici azalmaya yalnızca antibiyotik uygulama sonrası 10. günde sağlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise *P. gingivalis* izolasyon bulgularına bakıldığında başlangıçta *P. gingivalis* pozitif olan 3 bireyden birinin pozitifliğini koruduğu, 6. ayda ise iki bireyde yeniden pozitiflik saptandığı görülmektedir. *P. intermedia*, ve *T. denticola* prevalansında ise her iki tedavi şekli ile de eradikasyon sağlanamamış, *T.forsythia* ise test grubunda eradike edilmiştir. Pi prevalansında test grubunda tedavi sonrası değişim olmamıştır. Ehmke'nin çalışmasında [50] *A.actinomycetemcomitans*'ın 24 aya kadar olan baskılanması ve yine *P. gingivalis*'nin 10. güne kadar süren baskılanması dışında uygulanan tek seferlik destekleyici kombine antibiyotik tedavisi ile diğer patojenlerin (*E. corrodens*, *Treponema ssp.*, *T.forsythia*) prevalans profillerinde herhangi bir azalma

olmamakla birlikte *E. corrodens*'de artış, *T.forsythia*'da ise yalnızca geçici bir azalmayla karşılaşmıştır [50]. Bizim çalışmamızda *T.forsythia* 3. ve 6. ay kontrollerde test grubunda eradike edilmiş, kontrol grubunda ise yalnız bir hasta pozitifliğini devam ettirmiştir. Çalışmamızın *T. forsythia*'ya ilişkin bulguları bu çalışmayla uyumsuz, *T. denticola* prevalansında her iki grupta da Ehmke'nin bulgularında rastlanan artışın olmayıp, hatta azalma gözlenmiş olması nedeniyle uyumsuz, *P. intermedia* prevalansında ise her iki grupta da anlamlı azalma meydana gelmemesiyle uyumlu bulunmuştur.

Haffajee ve ark. tarafından yapılan çalışmada [83] inatçı periodontitisli bireylerde periodontal başlangıç tedavisi uygulanmış, PD>4 mm olan bölgelere tetrasiklin fibriller yerleştirilmiş. Başlangıç tedavisinin ilk seansı ile birlikte hastalara metronidazol 250 mg, 3x1 ve amoksisilin 500 mg, 3x1, 14 gün süreyle kullanılmış. Çalışmanın klinik bulgularına bakıldığında klinik ataşman seviyesinde gelişimin 6. ve 12. aylar arasında gerçekleştiği ve 24. aya kadar devam ettiği görülmektedir. Tedaviye iyi yanıt veren grupta elde edilen ataşman kazancı 0.77 ± 0.11 mm olarak gerçekleşmiş. Bizim çalışmamızda ise 3. ayda kontrol grubunda ortalama 0.99 ± 0.62 mm, test grubunda ise 1.13 ± 0.40 mm kazanç elde edilmiştir. Bu değerler Haffajee'nin değerlerinden daha yüksektir. Ancak yine çalışmamızda 6. ayda ataşman seviyelerinde 3. aya göre her iki grupta da klinik olarak ihmal edilebilir düzeylerde kayıp meydana gelmiştir.

Çalışmanın mikrobiyolojik bulgularına bakıldığında tedavi sonrası bulgulara turuncu ve kırmızı kompleks üyelerinin çoğunluğu (*P.intermedia*, *P.nigrescense*, *T.forsythia*, *P.gingivalis*) 3. ayda meydana gelen azalmayı devam ettirmemiş ve 9-24 aylar arasında tekrar artış eğilimine girmiştir. Bizim çalışmamızda ise *T. forsythia* test grubunda eradike olmuş, *T.denticola* her iki grupta da benzer düzeylerde ancak istatistiksel anlam ifade etmeyen oranlarda azalmış, *P.gingivalis* ise 3. ayda azalıp, 6. ayda tekrar artmaya başlamıştır.

Pavicic ve ark. tarafından yapılan çalışmada (1994) 48 adet lokalize agresif periodontitisli hastaya periodontal başlangıç tedavisi sonrası aynı antibiyotik kombinasyonu uygulanmıştır [133]. Klinik ölçümler ve örneklemeler bizim çalışmamızla uyumlu olarak tedavi sonrası 3. ayda, sonraki örneklemeler ise kontrol zamanı daha uzun tutularak 24. ayda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kanlı

agar petrilerde *P. gingivalis*, *P.intermedia*, *P. micros*, *B.forsythus* sayıları ile total bakteri sayılarına bakılmış, ayrıca TSBV agar petrilerde üreyen Aa kolonileri yine sayılarak kantitatif veriler elde edilmiş. Çalışmada başlangıçta bulunan yüksek Aa prevalansının araştırmaya dahil edilen hasta grubuyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışma bulgularına göre bu kombinasyon Aa'nın eliminasyonunda son derece etkilidir. Başlangıçta Pg pozitif olan bireylerden 2'sinde yine Pg pozitifliğine rastlanmıştır. Pi sayılarında anlamlı azalma gözlenirken, tam eliminasyon sağlanmamıştır. Çalışmanın bulguları bizim bulgularımızla uyumludur. Aynı çalışmanın klinik bulgularına bakıldığında; hastaların çoğunda 24. ayda da devam eden klinik ataşman kazancı ve cep sığlaşması görülmüş, birkaç hastada ise bizim çalışmamızla uyumlu olarak 1. ve 2. kontroller arasında hastalık seyrinde ilerlemeye rastlanmıştır. Çalışmamızın klinik bulguları da bu yöndedir.

Van Winkelhoff ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise (1989) kombinasyonun Aa'nın eliminasyonunda oldukça etkili olduğu, ancak Pi sayılarında anlamlı azalma sağlamadığı bildirilmiştir. Pi sayılarında ise bizim çalışmamızda test grubunda azalma meydana gelmiş, ancak bu azalmanın istatistiksel anlam ifade etmediği belirlenmiştir. Çalışmanın klinik bulguları mikrobiyolojik bulgular ile korelasyon göstermektedir. Bizim çalışmamızda da mikrobiyolojik düzeyde iyileşmeye klinik bulgulardaki düzelme eşlik etmektedir [211].

Van Winkelhoff ve ark. tarafından yapılan aynı antibiyotik kombinasyonunun kullanıldığı, 118 denneğin dahil edildiği bir diğer çalışmada (1992), denekler lokalize agresif peiodontitis, kronik periodontitis ve inatçı periodontitis gruplarına ayrılmış [212]. Başlangıç tedavisi tamamlandıktan sonra tüm gruplara antibiyotik kombinasyonu uygulanmış ve kültür yöntemi kullanılarak periodontal patojenlerden *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* ve *P.intermedia* varlıklarına bakılmış. *A.actinomycetemcomitans* pozitif olan 118 bireyin 114'ünde tedavi sonrası Aa saptanmamış. Başlangıçta *P.gingivalis* (+) 34 bireyin dördünde tekrar *P.gingivalis*, başlangıçta *P.intermedia* (+) olan 67 bireyin ise 32'sinde tekrar *P.intermedia*'ye rastlanmıştır. Sonuç olarak çalışma; *A.actinomycetemcomitans* üzerinde anlamlı etkiler bildirirken *P.gingivalis* pozitif

birey sayısında anlamlı azalma, *P.intermedia* pozitif birey sayısında is yarı yarıya azalma bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın PCR bulgularına göre *P. intermedia* prevalansı test grubunda azaltılamamıştır. Aynı çalışmanın klinik verilerine bakıldığında farklı periodontitis tiplerinde tedavinin klinik sonuçları arasında fark görülmezken, grup içi karşılaştırmalarda başlangıç ve tedavi sonrasında anlamlı farklılıklar görülmektedir. Bizim çalışmamızda da grup içi karşılaştırmalarda klinik parametrelerde anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

Flemmig ve ark. tarafından yapılan kontrollü çalışmaya *A.actinomycescomitans* ve/veya *P. gingivalis* (+) olan 48 erişkin periodontitisli bireyler dahil edilmiş ve bireyler aynı bakterilerin varlığı açısından değerlendirilmiş [58]. Test grubuna başlangıç tedavisi ile birlikte metronidazol 250 mg, 3x1 ve amoksisilim 375 mg, 3x1, 8 gün süreyle uygulanmış, subgingival plak örnekleri başlangıç, 10. gün, 3., 6., 9. ve 12. aylarda elde edilmiştir. Bakteri analizleri PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın mikrobiyolojik bulgularında test grubu hastalarda *A.actinomycescomitans*'nın saptanma oranları anlamlı düzeyde azalmış. Antibiyotik tedavisi subgingival plak içinde bulunan *A.actinomycescomitans* üzerine etkin bulunurken aynı anlamlı sonuçlara müköz membranlarda bulunan *A.actinomycescomitans*' ya ilişkin olarak rastlanmamış. *P. gingivalis* prevalansında yalnızca antibiyotik uygulamasının hemen sonrasındaki 10. günde ve test grubunda anlamlı azalma görülmüş, 6. ve 12. aylar arasında gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir. Başlangıçta (+) olan 15 test grubu hastasının yalnızca ikisinde kontrol zamanlarının hiç birinde bakteriye rastlanmazken, kontrol grubu hastalarının tamamında takip zamanlarında aynı bakteriye rastlanmıştır. Araştırmacılar *P. gingivalis* prevalansında azalmayla yalnızca 10. günde karşılaşmışlardır; bulgular bu yönüyle Ehmke'nin bulgularıyla da korelasyon göstermektedir. Bizim çalışmamızın bulguları da başlangıçta *P. gingivalis* (+) olan kontrol grubu hastaların diğer kontrol zamanlarında da aynı bakteriye rastlanmıştır olması, test grubu hastaların ise yalnızca birinde tüm kontrol zamanlarında tam eliminasyon sağlanmış olmasıyla Flemmig'in bulgularıyla uyumludur. Aynı çalışmada antibiyotik kombinasyonunun *A.actinomycescomitans*'nin saptanma sıklığına ilişkili bulgularına bakılacak olursa test ve kontrol grupları arasında anlamlı farkın yalnızca 9. ve 12. ay kontrollerde gerçekleştiği görülmektedir. Bizim

çalışmamızda gruplar arasında *A. actinomycetemcomitans* ile ilgili anlamlı fark hiçbir kontrol zamanında görülmemiştir

. Çalışmanın klinik bulgularının sunulduğu diğer çalışmada [57] yalnızca bir hastanın *P. gingivalis* (-) olması dolayısıyla istatistiksel değerlendirme yapılamamış, ancak *P. gingivalis* varlığından bağımsız olarak başlangıçta *A. actinomycetemcomitans* (+) olan test grubu hastalarında tedavi sonrası ataşman kazancı insidansı 2 mm daha yüksek bulunmuş. *A. actinomycetemcomitans*'ın baskılandığı yedi test ve üç kontrol grubu hastasında ise *A. actinomycetemcomitans*'ın persiste kaldığı hastalara göre daha fazla ataşman kazancı sağlanmış. Bizim çalışmamızda ise klinik bulgular bakteri varlığına göre değerlendirilmemiştir. Ancak tedavi grupları arasında meydana gelen yaklaşık ataşman kazancı ve cep sığlaşması açısından fark bulunmamıştır.

Generalize agresif periodontitisli bireylerin dahil edildiği ve aynı antibiyotik kombinasyonunun destekleyici etkisinin değerlendirildiği plasebo kontrollü çalışmada [223] mikrobiyolojik analizler başlangıçta ve ilaç bitiminden sonraki 3. ayda yapılmış [223]. Kültür yöntemi kullanılarak *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* ve *P. micros* varlıkları araştırılmış. Çalışmanın mikrobiyolojik bulgularına bakıldığında *P. gingivalis*, , *B. forsythus* ve *P. intermedia* pozitif birey sayısı açısından antibiyotik ve plasebo kullanan gruplar arasında anlamlı fark bulunmuş. Klinik bulgular antibiyotik kullanan grup lehine gerçekleşmiş. Aynı takip aralıklarının kullanıldığı bizim çalışmamızda da klinik ataşman seviyesi ve cep derinliği değişkenleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Çalışmamızın *P. intermedia* ile ilgili bulgularının korelasyon gösterdiği bir diğer çalışma Berglundh ve ark. [15] tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada gruplar öncelikle antibiyotik kullanılan sekiz hasta ve plasebo uygulanan sekiz hasta olmak üzere ikiye ayrılmış. Her gruptaki hastaların çapraz iki segmentlerine mekanik tedavi uygulanırken, diğer iki segmentlerine herhangi bir tedavi uygulanmamış; böylece dört çalışma grubu elde edilmiş. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* proporsiyonlarına ve total bakteri sayılarına kültür yöntemiyle bakılan çalışmada *P. intermedia*'nın eliminasyonuna hiçbir grupta rastlanmamış.

Dişeti oluğu sıvısı serum, lökositler, periodonsiyumun yapısal hücreleri ve oral bakterilerden kaynak alan karmaşık bir yapıdır. Bu sıvı periodontal hastalık ve tedavi sonrası iyileşme göstergelerini sunabilen büyük bir potansiyele sahiptir. ve *Treponema denticola* gibi periodontal patojenler virulanslarının bir parçası olarak geniş spektrumlu nötral proteinazlar üretirler. Bakteriler tarafından üretilen bu proteinazlar periodontitis hastalarında, plak ve dişeti oluğu sıvısı örneklerinde saptanabilir.

Dişeti oluğu sıvısı içinde bulunan konak kaynaklı maddeler antikorlar, sitokinler, enzimler ve doku yıkım ürünleridir [31]. Oluk sıvısında bulunan antikorlar lokal ve sistemik olarak sentezlenen moleküller içerir ve belirli mikrobiyal türlerin kolonizasyonunu ifade eder. Antikorlar konağın patojen bakterilere karşı korunmasında anahtar role sahiptir. Bununla birlikte yine aynı antikorlar periodonsiyumda iltihapsal yıkımı da başlatabilirler.

İnflamasyon esnasında periodontal dokularda lökositler, epitel hücreleri ve bağ dokusundan proteolitik hücreler salınır. Bu enzimler içinde matriks metalloproteinazlar periodontal dokuların yıkımında asıl role sahiptir [51;202;204]. Periodontal hastalıklarda belirli bir MMP indikatörünün bulunmasında çalışmalar iltihapsal süreç içinde nötrofillerden salgılananların dışında, hastalığın aktif doku yıkım episodlarında salgılanan enzimler üzerinde yoğunlaşmalıdır. Enzimlerin latent ve aktif hallerinin birlikte yapıldığı total ölçümlerin yanı sıra yalnızca aktif fazdaki aktiviteleri de ölçülebilmelidir .

Sonuç olarak dişeti oluğu sıvısının periodontal durumun değerlendirilmesinde benzersiz bir pencere açtığını söyleyebiliriz. Dişeti oluğu sıvısı toplama işlemi diğer yöntemlere göre son derece non-invaziv ve basit bir yöntemdir. Oluk sıvısının periodontitisin erken dönemlerde teşhisi ve periodontal dokuların tedavi sonrası iyileşme sürecinin değerlendirilmesindeki rolünün anlaşılması 50 yıl öncesine dayanmaktadır [75].

Dişeti oluğu sıvısıyla ilgili ilk araştırmalar sıvının oluşumunu oluk ve bağlantı epitellerinin altında bulunan bağ dokusundaki iltihapsal değişimlerle ilişkilendirmeye yöneliktir. Bu değişimlerin başlıcası çeşitli kimyasal ve mekanik yollarla kan damarlarında meydana gelen permeabilite artışıydı. Dişeti oluğunun sistemik dolaşımın bir parçası olarak düşünülmesiyle birlikte ilk

çalışmalar sistemik dolaşımdaki maddelerin DOS' a geçtiğini ispatlar nitelikteydi. Bu amaçla köpeklerde yapılan ilk çalışmalar dolaşıma verilen fluoresans maddenin dişeti oluğu sıvısına geçtiğini göstermiştir [23]. Oluk sıvısıyla yapılan hayvan çalışmalarını insan çalışmaları takip etti. Oral epitelin fluorokrom maddenin dişeti oluğuna geçişine izin vermemesi bağlantı epiteli ile oral epitel arasındaki permeabilite farkının anlaşılmasını sağladı. Dişeti oluğu epitelinde sıvının taşınması bu durumun fizyolojik mi yoksa patolojik bir süreç mi olduğuna ilişkin soruları oluşturdu. Sonraki çalışmalar oluk sıvısı akışının çiğneme ya da diş fırçalama gibi uyarılarla birlikte belirgin artışını gösterdi. Bu gelişmeyle birlikte oluk sıvısı üretiminin uyarılması için kimyasal veya mekanik uyarılara ihtiyaç olduğunu, dolayısıyla da bu sıvının patolojik bir fenomen olarak algılanması gereği ortaya kondu. Patolojik bir sıvı olmakla birlikte araştırmacılar oluk sıvısının özellikle dişeti oluğu bölgesinin korunmasındaki yararlı etkilerini de belirtmişlerdir. Dişeti oluğu bölgesindeki karbon partikülleri ya da bakterilerin yok edilmesinin yanı sıra, konak kaynaklı ya da sistemik dolaşımda bulunan antibiyotikler gibi çeşitli antibakteriyel maddelerin dişeti oluğuna taşınmasındaki önemli rolü açıklık kazanmıştır.

Dişeti oluğu sıvısının bir transüda mı yoksa oluk sıvısında ozmotik basınç farkıyla oluşan interstisyel bir sıvı mı olduğuna ilişkin tartışmalar başlangıçta inflamasyon öncesinde oluşan sıvının transüda olduğu, uyarılarla birlikte iltihapsal bir eksüdaya dönüştüğü noktasında fikirbirliğiyle sonuçlanmıştır [205].

Dişeti oluğu sıvısının toplanmasına yönelik pek çok yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntemlerin tercih edilmesi çeşitli avantaj ve dezavantajlarının değerlendirilmesiyle mümkündür. Bunlardan biri olan dişeti yıkama yönteminde; dişeti oluğu genellikle sabit bir hacimdeki izotonik bir solüsyonla yıkanır. Bu yöntemle toplanan sıvı dilüe oluk sıvısını ve plazma proteinleri gibi maddeleri içerir. Oluk bölgesinden hücre toplanmasında etkili bir yöntem olmakla birlikte, uygulama sahası kısıtlıdır ve yalnızca küçük denek sayılı çalışmalar için uygundur. En önemli dezavantajı ise aspirasyonla sıvının tamamının toplanamamasıdır. Bir diğer yöntem olan kapiller tüplerle toplamada; belirli çaplardaki tüpler dişeti oluğu girişine yerleştirilir. Harekete geçen oluk sıvısı kapiller hareketle tüplere yönelir. Tüplerin çapı bilindiği için sıvının göç ettiği

mesafe ile hacim hesabı yapılır. Ancak bölge iltihaplı ve büyük miktarda dişeti oluşu sıvısına sahip olmadıkça bu yöntemle yeterli oluk sıvısı toplamak oldukça zordur. Ayrıca tüplere alınan sıvı örneğinin tamamının geri kazanılması da oldukça güçtür. Bizim de tercih ettiğimiz yöntem olan filtre kağıtlarıyla toplama yöntemi ise; oldukça kolay ve hızlı bir yöntemdir. Farklı bölgelere uygulanabilir ve diğer yöntemlere göre en az travmatik yöntemdir. Bu yöntemde kağıt tercihe göre oluk içine veya oluk dışına yerleştirilebilir. Oluk içine yerleştirme daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Burada kağıt periodontal cebin veya oluğun girişine ya da cep tabanına hafif direnç hissedilinceye kadar yerleştirilir. Biz çalışmamızda tedavi sonrası da yeterli sıvı hacmi elde edebilmek amacıyla oluk içi yöntemi tercih ettik. Sığ ve sağlıklı bölgelerde filtre kağıdının oluk girişine ve cep tabanına yerleştirilmesi arasında verilen travma ve elde edilen sıvı hacmi açısından fark olmadığı bilinmektedir [75].

Elde edilen oluk sıvısının hacminin belirlenmesinde literatürde farklı yöntemler tanımlanmıştır. Bu yöntemlerden biri filtre kağıdı üzerinde ıslanan bölgenin boyutsal olarak değerlendirilmesidir. Bu yönteme göre daha doğru olan bir diğer yöntem kağıdın ninhidrin ile boyanması ve oluk sıvısının biriktiği bölgede oluşan mor rengin değerlendirilmesidir. Benzer bir diğer yöntem ise oluk sıvısı toplanmadan 2 saat önce sistemik dolaşıma flouresan madde verilerek kağıdın ultraviyole ışığı altında değerlendirilmesidir. Flouresanla işaretleme boyama yöntemine göre daha hassas bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin hiçbirisi doğru şekilde hacim hesabı yapılmasına izin vermemektedir. Bu amaçla geliştirilmiş olan Periotron® cihazı bizim çalışmamızda da oluk sıvısı hacminin hesaplanmasında kullanılmıştır. Cihaz iki metal elektroda sahiptir. Elektrotlara kuru kağıt yerleştirildiğinde dijital okuyucu ‘sıfır’ değerini vermektedir. Islak kağıtta ise okuyucuda artan bir değer görülür. Oldukça hızlı bir teknik olmakla birlikte oluk sıvısı içeriğinde herhangi bir değişikliğe sebep olmaması sonraki laboratuvar işlemlerini de mümkün kılar. Şimdiye dek üç periotron tipi (600, 6000,8000) üretilmiştir. Her üç periotron da filtre kağıtlardan elde edilen sıvının hacminin hesaplanmasında etkilidir. Biz çalışmamızda Periotron 6000® cihazını kullandık. Cihazın kalibrasyonu 0,1 µl ile 1 µl arasında değişen miktarlarda serum fizyolojik emdirilen filtre kağıtlarının ölçümün her hacim için üç defa tekrarlanarak cihazda okutulması ve bu üç değer aritmetik

ortalamalarının hesaplanarak elde edilen parabolün kullanılmasıyla sağlanmıştır. Periotron cihazının kalibrasyonu geriye dönük yapılamamaktadır. Bu nedenle çalışma süresince ayda bir gerçekleştirilen kalibrasyon işlemi sonrası elde edilen paraboller hacim hesabında kullanılmıştır.

Dişeti oluğu sıvısı toplama işlemi öncesinde bölgenin plak ve tükrükten izolasyonu önemlidir. Filtre kağıtları üzerinde plak varlığının hesaplanan hacim üzerinde belirgin etkisi gösterilmiştir. Geniş bir plak kitlesinin içerdiği sıvı dişeti oluk sıvısı olarak değerlendirileceği için hacim hesabının doğru şekilde yapılmasını engelleyecektir. Biz çalışmamızda örnek alımı esnasında plakla kontaminasyonun önüne geçebilmek için supragingival plağı dişetini travmatize etmeden iyi şekilde elimine etmeye çalıştık. Tüm çabalara rağmen plak veya kan ile kontamine olmuş olan filtre kağıtlarını değerlendirme dışı bıraktık. Bölgenin pamuk tamponlarla izolasyonu ve hafif şekilde kurutulması işlemi tükrükle olan kontaminasyonun engellenmesinde yeterli yöntemler olarak bilinmektedir. Biz de çalışmamız esnasında aynı yöntemlerle kolaylıkla tükrükle kontaminasyonun önüne geçebildik.

Filtre kağıtlarına emdirilmiş olan dişeti oluk sıvısının geri kazanılmasında farklı araştırma grupları farklı yöntemler kullanmaktadır [89]. Literatürde bildirilmiş olan değişik sıvı konsantrasyonlarının sebeplerinden biri de sıvının elüsyonunda kullanılan yöntemlerin farkıdır. Biz çalışmamızda santrifüj ile geri kazanım yöntemini tercih ettik.

Periodontal hastalıklar periodontal dokuların kollajen fibril ve diğer ekstraselüler matriks bileşenlerinin yıkıma uğramasıyla karakterizedir. Periodontal ekstraselüler matriksin yıkımında muhtemel yollardan biri de insan ve bakteri kaynaklı proteinazların bağımsız ya da birlikte hareketleridir [187;188]. Ancak periodontal dokuların yıkımından esas olarak sorumlu olan kollajenazların konak kaynaklı MMP'ler olduğu bilinmektedir. MMP'lerin doku inhibitörleri olan TIMP'ler ise matriks yıkımını regüle ederler. Bu regülasyon proteinaz inhibisyonu ya da MMP aktivasyonunun blokajıyla gerçekleşir. TIMP-1 ve TIMP-2 mRNA'sının farklı faktörler tarafından eksprese edildiği bildirilmiştir. Ayrıca TIMP-1 ve TIMP-2'nin farklı MMP'leri kontrol altında tuttukları da bilinmektedir. Örneğin TIMP-2, MMP-2 ve MMP-9'ye karşı daha etkiliyken,

TIMP-1'in MMP-1'i diğer inhibitöre göre daha etkin şekilde baskıladığı bilinmektedir. Ingman ve ark. lokalize agresif periodontitisli bireylerin dişeti oluk sıvılarında MMP-1'in dominant kollajenaz olduğunu, kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusu, dişeti oluk sıvısı ve tükrüklerinde asıl kollajenazın ise MMP-8 olduğunu bildirmiştir [86]. Aiba ve ark. ise bu görüşün aksine MMP-1 mRNA'sının kronik periodontitisli bireylerin iltihapsal lezyonlarında artış gösterdiğine dikkat çekmiştir [3]. Bu bulgular Nomura ve ark.'nın bulgularıyla korelasyon göstermektedir [126]. Dişeti oluk sıvısında MMP-1 varlığının gösterilmiş olmasına rağmen periodontal başlangıç tedavisiyle enzim seviyesinin azaldığını gösteren az sayıda çalışma vardır [204]. Biz çalışmamızda generalize agresif periodontitisli bireylerde periodontal başlangıç tedavisi uygulanan kontrol ve ilave olarak kombine antibiyotik kullanılan test grubunda dişeti oluk sıvısı MMP-1 ve TIMP-1 seviyelerini araştırdık. Literatürde aynı antibiyotik kombinasyonu kullanılan ve DOS'ta MMP-1 ve TIMP-1 seviyelerinin değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Klinik değişkenler tek başlarına hastalığın seyriyle ilgili tam bir fikir verememektedir, bu nedenle araştırmalar ataşman kaybıyla DOS içeriğinin ilişkisini inceleyerek hastalık aktivitesinin ve tedaviye karşı gelişecek yanıtın önceden tahminin edilebilirliğine odaklanmıştır. Tüter ve ark.'nın çalışmasında [204] tedavi sonrası MMP-1 seviyesinde anlamlı azalma, TIMP-1 seviyesinde ise anlamlı artış bulunmuştur. Tedavi sonrası TIMP-1 seviyesinin artışını araştırmacılar şu şekilde yorumlamışlardır; 1) Serbest TIMP'lere bağlanan MMP-1 seviyesinde azalma dolayısıyla artmış olabilir ancak TIMP-1 regülasyonu yalnızca MMP-1'e bağlı değildir. 2) Faz I tedavi ile birlikte nötrofil sayısında ve dokuda iltihabın çözülmesi ve iyileşmeye bağlı olarak elastaz miktarında azalma sonucunda TIMP miktarı artmış olabilir. 3) Artmış TIMP-1 seviyesi molekülün iyileşme sürecindeki yerini gösterir. Hayakawa ve ark. periodontal başlangıç tedavisi sonrası tükrükte TIMP-1 konsantrasyonunda artış ve kollajenaz aktivitesinde azalma bildirmişlerdir [84].

Alpagot ve ark. tarafından yapılan çalışmada periodontitisli ve sağlıklı bireylerde TIMP-1 ve MMP-3 düzeyleri bizim çalışmamızda da kullandığımız

yöntem olan sandwich ELISA yöntemiyle değerlendirilmiş ve periodontitisli grupta istatistiksel anlamlı daha yüksek MMP-3 ve TIMP-1 düzeylerine rastlanmıştır. Çalışmanın sonuçları periodontitisli bölgelerde artmış MMP-3 ve TIMP-1 düzeylerinin ataşman kaybının izlenmesinde prognostik faktörler olabileceği şeklinde yorumlanmıştır [4]. Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu bulunmamaktadır. Ancak iyileşmeye bağlı kontrol grubunda TIMP-1 konsantrasyon düzeylerinde artış görülmüştür

Tüter ve ark. tarafından yapılan çalışmaya (2002) kronik periodontitisli bireyler dahil edilmiş, periodontal başlangıç tedavisi öncesinde ve sonrasında dişeti oluk sıvısı MMP-1 ve TIMP-1 seviyelerinin belirlenmesinde ELISA yöntemi kullanılmıştır. Tedavi sonrası bizim çalışmamızla uyumlu olarak MMP-1 seviyelerinde azalma ve TIMP-1 seviyelerinde artış görülmüştür [204].

Emingil ve ark. tarafından yapılan çalışmada [51] generalize agresif periodontitis, kronik periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireylerin dişeti oluk sıvılarında ELISA yöntemiyle MMP-7 ve TIMP-1 araştırılmış. Araştırma bulgularına göre hastalık şiddeti azaldıkça TIMP-1 seviyelerinde artış gerçekleşmiş. Bizde çalışmamızda her iki grupta da tedavi sonrası 3. ayda TIMP-1 seviyelerinde artış saptadık. Yine Emingil'in çalışmasında TIMP-1 seviyeleri ile klinik değişkenlerden klinik ataşman seviyesi ve sondalanabilir cep derinliği arasında gözlenen korelasyon bizim çalışmamızda da gözlenmiştir. Araştırma sonuçları bizim çalışmamızla uyumludur.

Biz çalışmamızda oluk sıvısı elde edilen bölgelerin seçimini hastalık aktivitesinden bağımsız olarak başlangıç cep derinliklerine göre yaptık. Burada örnek bölgeleri geçmişte periodontal yıkım meydana gelmiş olan bölgelerdi. Aktif yıkımın görüldüğü veya pasif olan bölgelerde farklı oranlarda aktif ve/veya latent enzimlerle karşılaşılması beklenebilir. Enzimin aktif veya latent fazda olması iltihapsal eksüdanın yıkım potansiyeliyle ilgili fikir verir.

Lee ve ark. aktif bölgelerde aktif enzimlerle karşılaşma sıklığının benzer cep derinliklerine sahip inaktif bölgelerden daha fazla olduğunu bildirmiştir [106]. Golub ve ark. periodontitisli hasta grubunda uygulanan ilave düşük doz doksisisiklinin DOS kollajenaz aktivitesinde azalma sağladığını bildirmiştir [68]. Aynı araştırmacı MMP-1'in tetrasiklin ihhhibisyonuna dirençli olduğunu MMP-8 ve

MMP-13'ün ise tetrasiklin inhibisyonuna karşı oldukça duyarlı olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda mekanik tedaviye ek olarak kullanılan metronidazol ve amoksisilin kombinasyonunun DOS MMP-1 konsantrasyon değerlerinde anlamlı azalma sağladığı görülmüştür (Tablo 4-14) .

Çalışmamızda her iki grupta MMP-1 seviyeleriyle klinik değişkenler arasında korelasyon bulunmuştur. Ancak gruplardan birinde diğerine göre daha fazla korelasyon saptanmamıştır. Biyokimyasal ve klinik parametreler arasındaki korelasyonun değerlendirildiği çalışmalarda farklı bulgular örnekleme yönteminde ya da uygulanan laboratuvar tekniklerindeki farklılıklarla ilişkilendirilebilir. Bizim bulgularımız mekanik tedavi sonrasında MMP-1 seviyelerinde azalma, TIMP-1 seviyelerinde artış yönündedir.

5. SONUÇLAR

1. Her iki tedavi grubunda 3. ve 6. aylarda başlangıca göre sondalama derinliğinde anlamlı düzeyde sığlaşma görülmüştür. Gruplar arasında fark görülmemiştir.
2. Kinik ataşman seviyesi ölçümlerinde başlangıca göre her iki grupta anlamlı düzeyde artış görülürken, gruplar arasında fark görülmemiştir.
3. Plak indeksi ve gingival indeks ölçümlerinde her iki grupta da anlamlı düzeyde azalma görülmüştür. Gruplar arasında fark bulunmamıştır.
4. Her iki grupta da MMP-1 total düzeylerinde başlangıca göre 3. ve 6. aylarda anlamlı azalma meydana gelmiştir.
5. MMP-1 konsantrasyon düzeyinde test grubunda anlamlı azalma görülmüştür.
6. TIMP-1 total düzeylerinde her iki grupta meydana gelen artış istatistiksel anlam ifade etmemektedir.
7. Her iki grupta da siyah pigmentli patojen sayısı anlamlı düzeyde azalmıştır.
8. Metronidazol+amoksisilin kombinasyonu *T. forsythia*'nın eradikasyonunda uygun bir seçenek olabilir.
9. Konak yanıtı ve mikrobiyal flora uyguladığımız antibiyotik kombinasyonu ile uzun süreler baskılanamamaktadır.
10. Benzer antibiyotik uygulamalarında mikrobiyolojik ve biyokimyasal takipler 3 aydan daha kısa süreler içinde gerçekleştirilmelidir.

7.KAYNAKLAR

- (1) Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics Ann Periodontol 1996; 1:1-947.
- (2) Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. J Periodontol 1988; 59(4):222-230.
- (3) Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. Eur J Oral Sci 1996; 104(5-6):562-569.
- (4) Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. J Clin Periodontol 2001; 28(4):353-359.
- (5) Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(24):14014-14019.
- (6) Apatzidou DA, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. J Clin Periodontol 2004; 31(2):132-140.
- (7) Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. II. Microbiological findings. J Clin Periodontol 2004; 31(2):141-148.

- (8) Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4(1):1-6.
- (9) Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11(4):266-273.
- (10) Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Periodontol* 1991; 62(3):203-206.
- (11) Barone A, Sbordone L, Ramaglia L, Ciaglia RN. Microbiotica associated with refractory periodontitis. Prevalence and antibiotic susceptibility. *Minerva Stomatol* 1999; 48(5):191-201.
- (12) Beertsen W, Brekelmans M, Everts V. The site of collagen resorption in the periodontal ligament of the rodent molar. *Anat Rec* 1978; 192(2):305-317.
- (13) Beikler T, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy. *J Periodontol* 2004; 75(1):169-175.
- (14) Bennick A, Hunt AM. Collagenolytic activity in oral tissues. *Arch Oral Biol* 1967; 12(1):1-10.
- (15) Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G, Lindhe J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 1998; 25(5):354-362.
- (16) Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl):474-484.

- (17) Birkedal-Hansen H, Cobb CM, Taylor RE, Fullmer HM. Serum inhibition of gingival collagenase. *J Oral Pathol* 1974; 3(6):284-290.
- (18) Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(2):197-250.
- (19) Blandizzi C, Malizia T, Lupetti A, Pesce D, Gabriele M, Giuca MR, Campa M, Del Tacca M, Senesi S. Periodontal tissue disposition of azithromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70(9):960-966.
- (20) Bostrom L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2001; 28(3):212-219.
- (21) Bouwsma O, Payonk G, Baron H, Sipos T. Low dose doxycycline: effects on clinical parameters in adult periodontitis. *Journal of Dental Research* 71 (Spec. issue). 1992.

RefType: Abstract

- (22) Brandt KD. Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:199-205.
- (23) Brill N, Krasse B. The passage of of fluid into human gingival pockets. *Acta Odontol Scand* 1959; 17:11-21.
- (24) Britt MR, Pohlod DJ. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol* 1986; 57(2):104-107.
- (25) Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* 1986; 13(3):205-210.

- (26) Cao CF, Aepli DM, Liljemark WF, Bloomquist CG, Bandt CL, Wolff LF. Comparison of plaque microflora between Chinese and Caucasian population groups. *J Clin Periodontol* 1990; 17(2):115-118.
- (27) Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem* 1995; 270(2):801-805.
- (28) Caton J, Blieden T, Adams D, Crout R, Hefti A, Killoy W, Nagy R, Oneal R, Quinones C, Taggart E, Wolff M, Ciancio S. Subantimicrobial doxycycline therapy for periodontitis. *J Dent Res* 76, 177. 1997.
Ref Type: Abstract
- (29) Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjo UM, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* 1987; 58(8):529-539.
- (30) Ciancio S. Non-surgical periodontal treatment. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: American Academy of Periodontology, 1989: II-4.
- (31) Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci* 1983; 12:III-152.
- (32) Collins JG, Offenbacher S, Arnold RR. Effects of a combination therapy to eliminate *Porphyromonas gingivalis* in refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64(10):998-1007.
- (33) Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176(8):2137-2142.

- (34) Cox SW, Eley BM, Kiili M, Asikainen A, Tervahartiala T, Sorsa T. Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Dis* 2006; 12(1):34-40.
- (35) Craig RG, Boylan R, Yip J, Bamgboye P, Koutsoukos J, Mijares D, Ferrer J, Imam M, Socransky SS, Haffajee AD. Prevalence and risk indicators for destructive periodontal diseases in 3 urban American minority populations. *J Clin Periodontol* 2001; 28(6):524-535.
- (36) Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M, Golub LM. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol* 1996; 67(5):506-514.
- (37) Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 1989; 16(5):305-310.
- (38) Dahlen G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(6):375-382.
- (39) Dahlen G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(3):137-142.
- (40) Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14:12-32.
- (41) DeCarlo AA, Grenett HE, Harber GJ, Windsor LJ, Bodden MK, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts

and epithelial cells by secreted *Porphyromonas gingivalis* proteinase. *J Periodontal Res* 1998; 33(7):408-420.

- (42) Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, Uygur C, Firatli E, Lakio L, Asikainen S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(6):803-814.
- (43) Dowsett SA, Kowolik MJ, Archila LA, Eckert GJ, LeBlanc DJ. Subgingival microbiota of indigenous Indians of Central America. *J Clin Periodontol* 2002; 29(2):159-167.
- (44) Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC, III, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4(1):1-5.
- (45) Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15(5):316-323.
- (46) Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1985; 12(8):648-659.
- (47) Edlund C, Hedberg M, Nord CE. Antimicrobial treatment of periodontal diseases disturbs the human ecology: a review. *J Chemother* 1996; 8(5):331-341.
- (48) Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26(3):143-152.
- (49) Eggert FM, McLeod MH, Flowerdew G. Effects of smoking and treatment status on periodontal bacteria: evidence that smoking

influences control of periodontal bacteria at the mucosal surface of the gingival crevice. *J Periodontol* 2001; 72(9):1210-1220.

- (50) Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF. Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. *J Periodontol* 2005; 76(5):749-759.
- (51) Emingil G, Tervahartiala T, Mantyla P, Maatta M, Sorsa T, Atilla G. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(12):2040-2050.
- (52) Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, Gershoni-Baruch R. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med* 1992; 327(25):1789-1792.
- (53) Everts V, van der ZE, Creemers L, Beertsen W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J* 1996; 28(4):229-245.
- (54) Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 2001; 28(7):597-609.
- (55) Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999; 20:136-167.
- (56) Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4(1):32-38.
- (57) Flemmig TF, Milian E, Karch H, Klaiber B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in

- patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 1998; 25(5):380-387.
- (58) Flemmig TF, Milian E, Kopp C, Karch H, Klaiber B. Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *J Clin Periodontol* 1998; 25(1):1-10.
- (59) Fullmer HM, Gibson W. Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* 1966; 209(5024):728-729.
- (60) Fullmer HM, Taylor RE, Guthrie RW. Human gingival collagenase: purification, molecular weight, and inhibitor studies. *J Dent Res* 1972; 51(2):349-355.
- (61) Giancio SG, van Winkelhoff AJ. Antibiotic and antimicrobial use in dental practice. In: Newman MG, van Winkelhoff AJ, editors. *Antibiotics in periodontal therapy*. 2001: 113-126.
- (62) Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol* 1997; 24(7):478-485.
- (63) Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* 1989; 24(2):113-120.
- (64) Golub LM, Ciancio S, Ramamamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontal Res* 1990; 25(6):321-330.
- (65) Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity

during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res* 1983; 18(5):516-526.

- (66) Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998; 12(2):12-26.
- (67) Golub LM, Mc Namara T, D'Angelo G, Greenwald R, Ramamurthy N. A non-antibacterial chemically modified tetracycline inhibits mamalian collagenase activity. *J Dent Res* 1987; 66:1310-1314.
- (68) Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, Sipos T, Baron HJ. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28(2):146-156.
- (69) Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2(3):297-321.
- (70) Golub LM, Siegel K, Ramamurthy NS, Mandel ID. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. *J Dent Res* 1976; 55(6):1049-1057.
- (71) Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, Gruber B, Salo T, Konttinen YT. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995; 22(2):100-109.
- (72) Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon J, Ciancio S. Further evidence that tetracyclines inhibit

collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontal Res* 1985; 20(1):12-23.

- (73) Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS. The relationship between attachment level loss and alveolar bone loss. *J Clin Periodontol* 1984; 11(5):348-359.
- (74) Greenstein G, Lamster I. Changing periodontal paradigms: therapeutic implications. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20(4):336-357.
- (75) Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003; 31:32-42.
- (76) GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48:1014-1022.
- (77) Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Docherty JP, Kinane DF. Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. *J Clin Periodontol* 1995; 22(7):505-509.
- (78) Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Manos A, Kinane DF. Effects of treatment on gingival crevicular collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases and their ability to predict response to treatment. *J Clin Periodontol* 1996; 23(2):83-91.
- (79) Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004; 31(11):996-1002.
- (80) Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5:78-111.

- (81) Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2001; 28(5):377-388.
- (82) Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8(1):115-181.
- (83) Haffajee AD, Uzel NG, Arguello EI, Torresyap G, Guerrero DM, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31(10):869-877.
- (84) Hayakawa H, Yamashita K, Ohwaki K, Sawa M, Noguchi T, Iwata K, Hayakawa T. Collagenase activity and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) content in human whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased subjects. *J Periodontal Res* 1994; 29(5):305-308.
- (85) Heath JK, Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. *J Periodontal Res* 1982; 17(2):183-190.
- (86) Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23(12):1127-1132.
- (87) Jenkins WM, Said SH, Radvar M, Kinane DF. Effect of subgingival scaling during supportive therapy. *J Clin Periodontol* 2000; 27(8):590-596.
- (88) Jervoe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as

analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007; 78(5):909-917.

- (89) Johnson RB, Streckfus CF, Dai X, Tucci MA. Protein recovery from several paper types used to collect gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1999; 34(6):283-289.
- (90) Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *KTL anaerobic Bacteriology Manuel* . 6 ed. Korea: Star Publishing Co., 2002.
- (91) Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2006; 40:144-163.
- (92) Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 1996; 15(4):251-261.
- (93) Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17124-17131.
- (94) Kornman KS. Reaction: Sampling of micro-organisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:21-22.
- (95) Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Jr., Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24(1):72-77.

- (96) Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. Arch Oral Biol 1979; 24(9):645-650.
- (97) Kryshchalskyj E, Sodek J. Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor activities in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. J Periodontal Res 1987; 22(4):264-269.
- (98) Kryshchalskyj E, Sodek J, Ferrier JM. Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the dog. Arch Oral Biol 1986; 31(1):21-31.
- (99) Kubota T, Matsuki Y, Nomura T, Hara K. In situ hybridization study on tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) mRNA-expressing cells in human inflamed gingival tissue. J Periodontal Res 1997; 32(5):467-472.
- (100) Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. Arch Oral Biol 1996; 41(3):253-262.
- (101) Kulekci G, Ciftci S, Keskin F, Kilic AO, Turkoglu S, Badur S, Develioglu ON, Leblebicioglu B, Kulekci M. PCR analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum* in middle ear effusion. Anaerobe 2001; 7(24):1-24.
- (102) Lamster IB, Hartley LJ, Oshrain RL, Gordon JM. Evaluation and modification of spectrophotometric procedures for analysis of lactate dehydrogenase, beta-glucuronidase and arylsulphatase in human gingival crevicular fluid collected with filter-paper strips. Arch Oral Biol 1985; 30(3):235-242.

- (103) Larivee J, Sodek J, Ferrier JM. Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J Periodontal Res* 1986; 21(6):702-715.
- (104) Lee HM, Golub LM, Chan D, Leung M, Schroeder K, Wolff M, Simon S, Crout R. alpha 1-Proteinase inhibitor in gingival crevicular fluid of humans with adult periodontitis: serpinolytic inhibition by doxycycline. *J Periodontal Res* 1997; 32(1 Pt 1):9-19.
- (105) Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, Choi SH, Cho KS, Chai JK, Kim CK. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(9):1329-1335.
- (106) Lee W, Aitken S, Kulkarni G, Birek P, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Collagenase activity in recurrent periodontitis: relationship to disease progression and doxycycline therapy. *J Periodontal Res* 1991; 26(6):479-485.
- (107) Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res* 1995; 30(1):23-33.
- (108) Li M, Liu Z, Umemoto T. Collagen binding proteins of human oral spirochetes. *Zhonghua Kuo Quiang Yi Xue Za Zhi* 1999; 34:165-167.
- (109) Liew V, Mack G, Tseng P, Cvejic M, Hayden M, Buchanan N. Single-dose concentrations of tinidazole in gingival crevicular fluid, serum, and gingival tissue in adults with periodontitis. *J Dent Res* 1991; 70(5):910-912.
- (110) Listgarten MA, Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 1978; 5(2):115-132.

- (111) LOE H, SILNESS J. PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. I. PREVALENCE AND SEVERITY. *Acta Odontol Scand* 1963; 21:533-551.
- (112) Loomer PM. Microbiologic diagnostic testing in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004; 34:49-65.
- (113) Magnusson I, Clark WB, Low SB, Maruniak J, Marks RG, Walker CB. Effect of non-surgical periodontal therapy combined with adjunctive antibiotics in subjects with "refractory" periodontal disease. (I). Clinical results. *J Clin Periodontol* 1989; 16(10):647-653.
- (114) Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, Taylor M, Padgett P, Jung J, Clark WB. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1994; 21(9):628-637.
- (115) Mann EA, Hibbs MS, Spiro JD, Bowik C, Wang XZ, Clawson M, Chen LL. Cytokine regulation of gelatinase production by head and neck squamous cell carcinoma: the role of tumor necrosis factor-alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104(3):203-209.
- (116) Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15(3):169-175.
- (117) McCulloch CA. Collagenolytic enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:152-164.
- (118) Melcher AH, Chan J. Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. *J Ultrastruct Res* 1981; 77(1):1-36.

- (119) Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966; 74(5):Suppl-380.
- (120) Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis* 2003; 9 Suppl 1:6-10.
- (121) Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002; 29 Suppl 3:10-21.
- (122) Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 2000; 71(1):14-21.
- (123) Muller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1998; 33(1):49-58.
- (124) Naito Y, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides gingivalis* to collagenous substrata. *J Dent Res* 1988; 67(8):1075-1080.
- (125) Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *J Periodontal Res* 1997; 32(7):598-607.
- (126) Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA in periodontitis-affected human gingival tissue. *J Periodontal Res* 1993; 28(5):354-362.

- (127) Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56(Pt 9):2135-2146.

- (128) Okamatsu Y, Kobayashi M, Nishihara T, Hasegawa K. Interleukin-1 alpha produced in human gingival fibroblasts induces several activities related to the progression of periodontitis by direct contact. *J Periodontal Res* 1996; 31(5):355-364.

- (129) Overall CM, Sodek J, McCulloch CA, Birek P. Evidence for polymorphonuclear leukocyte collagenase and 92-kilodalton gelatinase in gingival crevicular fluid. *Infect Immun* 1991; 59(12):4687-4692.

- (130) Overall CM, Wiebkin OW, Thonard JC. Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J Periodontal Res* 1987; 22(2):81-88.

- (131) Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12):3770-3783.

- (132) Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006; 42:80-87.

- (133) Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, Douque NH, Steures RW, de Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol* 1994; 21(2):107-112.

- (134) Pertuiset JH, Saglie FR, Lofthus J, Rezende M, Sanz M. Recurrent periodontal disease and bacterial presence in the gingiva. *J Periodontol* 1987; 58(8):553-558.
- (135) Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 2002; 28:56-71.
- (136) Pinchback JS, Gibbins JR, Hunter N. Vascular co-localization of proteolytic enzymes and proteinase inhibitors in advanced periodontitis. *J Pathol* 1996; 179(3):326-332.
- (137) Preber H, Bergstrom J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol* 1992; 19(9 Pt 1):667-671.
- (138) Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eyssen H. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res* 1995; 74(8):1459-1467.
- (139) Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, Lee HM, Sorsa T, Golub LM, Rifkin BR. Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J Bone Miner Res* 1993; 8(10):1247-1253.
- (140) Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5(3):166-168.
- (141) Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7(1):1-6.
- (142) Rams TE, Feik D, Slots J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(4):230-235.

- (143) Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2):153-157.
- (144) Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1990; 17(6):351-355.
- (145) Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997; 14:144-157.
- (146) Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):345-355.
- (147) Robertson PB, Fullmer HM. Collagenolytic activity in periodontal disease. *Ala J Med Sci* 1973; 10(1):115-118.
- (148) Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun* 1999; 67(5):2319-2326.
- (149) Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxycillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol* 2002; 29(4):342-350.
- (150) Ryan ME, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activity as a treatment strategy. *Periodontol 2000* 2000; 24(1):226-238.
- (151) Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3:85-96.

- (152) Rylander H, Lindhe J. Cause-related therapy I. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen: Blackwell Munksgaard, 2003: 432-443.
- (153) Sakellari D, Goodson JM, Kolokotronis A, Konstantinidis A. Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *J Clin Periodontol* 2000; 27(1):53-60.
- (154) Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005; 32 Suppl 6:108-129.
- (155) Sanz M, Herrera D. Individual drugs. In: Newman MG, van Winkelhoff AJ, editors. *Antibiotic and antimicrobial use in dental practice*. 2002: 33-88.
- (156) Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellembijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108(5):383-392.
- (157) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370(6484):61-65.
- (158) Saxen L, Asikainen S, Kanervo A, Kari K, Jousimies-Somer H. The long-term efficacy of systemic doxycycline medication in the treatment of localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990; 35 Suppl:227S-229S.
- (159) Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1998; 69(7):841-850.

- (160) Segelnick SL, Weinberg MA. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J Periodontol* 2006; 77(9):1598-1601.
- (161) Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellstrom MK, Socransky SS, Lindhe J. The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28(5):411-418.
- (162) Shah HN, Gharbia SE. The biochemical milieu of the host in the selection of anaerobic species in the oral cavity. *Clin Infect Dis* 1995; 20 Suppl 2:S291-S300.
- (163) Shiloah J, Patters MR, Dean JW, III, Bland P, Toledo G. The prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in humans 1 year after 4 randomized treatment modalities. *J Periodontol* 1998; 69(12):1364-1372.
- (164) Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E. A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72(3):275-283.
- (165) SILNESS J, LOE H. Periodontal disease in pregnancy.II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont Scand* 1964; 22:121-135.
- (166) Sissons CH, Wong L, Cutress TW. Patterns and rates of growth of microcosm dental plaque biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10(3):160-167.
- (167) Slots J. Subgingival microbial flora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979; 6(351):382.
- (168) Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1(1):48-57.

- (169) Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. (Am Acad Periodontol position paper). J Periodontol 1996; 67:831-838.
- (170) Slots J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. J Periodontal Res 2000; 35(2):108-114.
- (171) Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. J Periodontal Res 2002; 37(5):389-398.
- (172) Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol 1986; 13(6):570-577.
- (173) Slots J, Rams TE. Microbiology of periodontal disease. In: Slots J, Taubman MA, editors. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. St Louis: The Mosby Company, 1992: 425-444.
- (174) Slots J, Rams TE. Systemic and topical antimicrobial therapy in periodontics. Periodontol 2000 1996; 10:5-159.
- (175) Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontol 2000 2002; 28:106-176.
- (176) Smith GN, Jr., Brandt KD, Hasty KA. Procollagenase is reduced to inactive fragments upon activation in the presence of doxycycline. Ann N Y Acad Sci 1994; 732:436-438.
- (177) Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. J Periodontol 1977; 48(9):497-504.
- (178) Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J Clin Periodontol 1979; 6(7):16-21.

- (179) Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28:12-55.
- (180) Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005; 38:135-187.
- (181) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2):134-144.
- (182) Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 1991; 18(10):766-775.
- (183) Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17(4):788-792.
- (184) Sodek J, Overall CM. Matrix metalloproteinases in periodontal tissue remodelling. *Matrix Suppl* 1992; 1:352-362.
- (185) Soder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol* 1999; 70(7):761-771.
- (186) Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res* 2002; 81(3):174-178.
- (187) Sorsa T, Ding YL, Ingman T, Salo T, Westerlund U, Haapasalo M, Tschesche H, Kontinen YT. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol* 1995; 22(9):709-717.

- (188) Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O, Saari H, Uitto VJ. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992; 60(11):4491-4495.
- (189) Sorsa T, Suomalainen K, Uitto VJ. The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 1990; 35 Suppl:193S-196S.
- (190) Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol* 1993; 64(12):1225-1230.
- (191) Suomalainen K, Sorsa T, Saxen L, Vauhkonen M, Uitto VJ. Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6(1):24-29.
- (192) Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1999; 70(6):574-580.
- (193) Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol* 1980; 51(11):668-669.
- (194) Tanner A, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. From the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36:213-221.
- (195) Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin Infect Dis* 1993; 16 Suppl 4:S304-S309.

- (196) Tanner AC, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1(1):15-22.
- (197) Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6(5):278-307.
- (198) Ten Cate AR, Freeman E. Collagen remodeling by fibroblast in wound repair. Preliminary observations. *Anat Rec* 1974; 179:543-546.
- (199) Tenenbaum H, Jehl F, Gallion C, Dahan M. Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1997; 24(11):804-807.
- (200) Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 2000; 79(12):1969-1977.
- (201) Tinoco EM, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, Rams TE, Tinoco NM, Gjermo P, Preus HR. Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 1998; 69(12):1355-1363.
- (202) Tonetti MS, Freiburghaus K, Lang NP, Bickel M. Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res* 1993; 28(6 Pt 2):511-513.
- (203) Troil-Linden B, Alaluusua S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Torppa J, Asikainen S. Periodontitis patient and the spouse: periodontal bacteria before and after treatment. *J Clin Periodontol* 1997; 24(12):893-899.

- (204) Tuter G, Kurtis B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol* 2002; 73(5):487-493.
- (205) Uitto VJ. Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontol* 2000 2003; 31:9-11.
- (206) Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998; 152(6):1489-1499.
- (207) van der ZE, Everts V, Beertsen W. Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. *J Periodontal Res* 1996; 31(7):483-488.
- (208) Van Oosten MA, Notten FJ, Mikx FH. Metronidazole concentrations in human plasma, saliva, and gingival crevice fluid after a single dose. *J Dent Res* 1986; 65(12):1420-1423.
- (209) van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11(6):511-520.
- (210) van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 1996; 10:45-78.
- (211) van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goene RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989; 16(2):128-131.

- (212) van Winkelhoff AJ, Tijnhof CJ, de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol* 1992; 63(1):52-57.
- (213) van Winkelhoff AJ, Vanderbroucke CMJE. Principles of antimicrobial chemotherapy in dental and orofacial infections. Antibiotic and antimicrobial use in dental practice. 2001: 3-22.
- (214) Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21(6):341-346.
- (215) Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen H. Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects. *J Periodontal Res* 1987; 22(5):381-389.
- (216) Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen H. Crevicular fluid collagenase activity in healthy, gingivitis, chronic adult periodontitis and localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontal Res* 1987; 22(3):209-211.
- (217) Walker CB, Gordon JM, Magnusson I, Clark WB. A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64(8 Suppl):772-781.
- (218) Ward RV, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Murphy G. Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochem J* 1994; 304 (Pt 1):263-269.

- (219) Welgus HG, Stricklin GP. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J Biol Chem* 1983; 258(20):12259-12264.
- (220) Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, Salo T, Kjeldsen L, Borregaard N, Tjaderhane L, Konttinen YT, Sorsa T. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 1996; 75(8):1553-1563.
- (221) Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996; 44(2):79-87.
- (222) Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Barendregt DS, van der Weijden GA, Timmerman MF, Van d, V. Clinical and microbiological effects of initial periodontal therapy in conjunction with amoxicillin and clavulanic acid in patients with adult periodontitis. A randomised double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 1999; 26(7):461-468.
- (223) Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van d, V, van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2001; 28(4):296-305.
- (224) Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Van d, V. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1998; 25(11 Pt 1):857-864.
- (225) Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145-2154.
- (226) Woolley DE, Davies RM. Immunolocalization of collagenase in periodontal disease. *J Periodontal Res* 1981; 16(3):292-297.

- (227) Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33(4):254-264.
- (228) Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33(12):869-877.
- (229) Yano-Higuchi K, Takamatsu N, He T, Umeda M, Ishikawa I. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27(8):597-602.
- (230) Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol* 2002; 4(5):305-314.

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Emine	Soyadı	Yek (Çifcibaşı)
Doğ.Yeri	Istanbul	Doğ.Tar.	26.10.1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	19943586038
Email	emineyek@hotmail.com	Tel	05055394686

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı				Mez. Yılı
Doktora	Istanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi				
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi				2001
Lisans					
Lise	Kabataş Erkek Lisesi				1996
Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	98.75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	62.5	62.25	62
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows office programları	Çok iyi