

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KRONİK PERİODONTİTİSLİ  
BİREYLERDE NÖTROFİL HÜCRE DİŞİ TUZAK  
OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dt. Gizem YÜCESOY**

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. H. Ebru OLGUN**

**2019-KIRIKKALE  
TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**

**DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KRONİK PERİODONTİTİSLİ  
BİREYLERDE NÖTROFİL HÜCRE DİŞ TUZAK  
OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dt. Gizem YÜCESOY**

**PERİODONTOLOĞİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. H. Ebru OLGUN**

**ORTAK DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Kader YILDIZ**

**Bu tez Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından 2018/065 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**2019-KIRIKKALE**

Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Periodontoloji Uzmanlık Eğitimi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/04/2019

İmza

Prof. Dr. Nurdan ÖZMERİÇ KURTULUŞ

Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ebru OLGUN

Kırıkkale Üniversitesi,

Diş Hekimliği Fakültesi

Danışman

Doç. Dr. İ. Doruk KOÇYIĞIT

Kırıkkale Üniversitesi,

Diş Hekimliği Fakültesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Volkan ARIKAN

Kırıkkale Üniversitesi,

Diş Hekimliği Fakültesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Meltem HENDEK

Kırıkkale Üniversitesi,

Diş Hekimliği Fakültesi

Üye

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	4
ÖNSÖZ .....	6
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	7
ŞEKİLLER .....	10
TABLolar .....	12
ÖZET .....	12
SUMMARY .....	15
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Periodontal Hastalık .....	1
1.1.1. Periodontal Hastalık Tanımı ve Prevalansı .....	1
1.1.2. Periodontal Hastalık Teşhisi .....	1
1.1.3. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırması .....	2
1.1.4. Periodontal Hastalık Histopatolojisi .....	7
1.2. Periodontal Hastalık Risk Faktörleri .....	10
1.2.1. Periodontal Hastalık ve Sigara .....	10
1.3 İmmün Sistemde Nötrofillerin Rolü .....	13
1.3.1 Periodontal Hastalıkta Nötrofillerin Rolü .....	15
1.3.2. Nötrofiller ve ROT .....	17
1.4 Periodontal Hastalık ve ROT .....	18
1.5. Sigaranın Nötrofiller Üzerine Etkisi .....	20
1.6. Sigara ve ROT .....	21
1.7 NET Oluşumu .....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	26
2.1. Çalışma Materyali .....	26
2.2. Katılımcıların Seçilmesi .....	26
2.3. Periodontal Değerlendirme .....	27
2.4. Katılımcılardan Periferik Venöz Kan Eldesi .....	31
2.5. Laboratuvar Aşamaları .....	31
2.5.1. Çalışmada Kullanılacak Solüsyon ve Boyaların Hazırlanması .....	31
2.5.1.1. Percoll Solüsyonlarının Hazırlanması .....	31
2.5.1.2. PMA Hazırlanması .....	33
2.5.1.3. Mikrokokal Nükleaz (Mnaz) Hazırlanması .....	33
2.5.1.4. Sytox Orange Boyanın Hazırlanması .....	33
2.6. Periferik Venöz Kandan PMN İzolasyonu .....	33
2.7. PMN'in Sayılması .....	35
2.8. PMN'in Canlılık Oranının Tespiti .....	36
2.9. İzole Edilen PMN'in İçinde Nötrofil Oranının Belirlenmesi .....	36
2.10. Nötrofillerin PMA ile Aktivasyonu .....	37
2.11. NET Oluşumunun Niceliksel Olarak Değerlendirilmesi .....	38
2.12. İstatistiksel Analiz .....	38
3. BULGULAR .....	40
3.1. Çalışma Popülasyonu ve Demografik Veriler .....	40
3.2. Klinik Periodontal Parametreler .....	40

3.3. PMN Hücre Sayıları.....	42
3.4. NET'in Niceliksel Analizi .....	43
3.5. NET Miktarı ile Klinik Parametrelerin Korelasyonu.....	45
3.6. Periferel Venöz Kandan PMN İzolasyonu .....	48
3.7. PMN'in Sayılması.....	49
3.8. PMN'in Canlılık Oranının Tespiti .....	50
3.9. İzole Edilen PMN'in İçinde Nötrofil Oranının Belirlenmesi.....	50
3.10. Nötrofillerin PMA ile Aktivasyonu .....	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	53
KAYNAKLAR .....	63
EKLER.....	80
EK 1. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU .....	80
EK 2. OLGU RAPOR FORMU.....	84
ÖZGEÇMİŞ .....	85



## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, desteğini her zaman hissettiren, güçlü kişiliği ile örnek olan ve zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. H.Ebru OLGUN'a; tez çalışmam sayesinde tanıdığım, bana laboratuvarında çalışmayı öğreten ve çalışma için çok büyük emek gösteren saygıdeğer ortak danışman hocam Prof. Dr. Kader YILDIZ'a;

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Meltem HENDEK'e;

Çalışma sayesinde tanıdığım ve yardımlarını benden esirgemeyen asistan arkadaşım Dr. Neslihan SÜRSAL'a;

Çalışmamın istatistiksel değerlendirmeleri sırasında yardımcı olan Arş. Gör. Merve BAŞOL'a;

Uzmanlık hayatıma değer ve neşe katan çok sevgili oda arkadaşlarım Dr. Dt. Selva SÜME KEŞİR, Dt. Didem BEZİRCİ ve Dt. Şükran BAKIR'a;

Çalışma hayatı boyunca yardım ve desteklerini gösteren diğer asistan arkadaşlarım, bölümümüz hemşire ve çalışanlarına;

Tezimi maddi olarak destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca sevgi ve binbir emekle beni büyüten canım annem Hülya YÜCESOY ve canım babam Zeki YÜCESOY'a, bana kardeşlik yapan canım kuzenlerim Gökçen FERİZ, Selin ve Beyza ÇEÇEN'e, köpeğim Bıdık'a ve sevgisiyle yüzümü güldüren V.Kaan OCAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
8-OHdG	: 8-hidroksideoksiguanozin
BSA	: Sığır serum albümin
CD62L	: L-selektin
CSE	: Sigara dumanı ekstraktı
CSC	: Sigara dumanı kondensatı
Dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dnaz	: Deoksiribonükleaz
DOS	: Dişeti oluğu sıvısı
DPI	: Difenil iyodonyum
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Gİ	: Gingival indeks
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HBSS	: Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HNP	: İnsan nötrofil peptid
hsCRP	: Yüksek duyarlıklı C-reaktif protein
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
iNOS2	: Nitrik oksit sentaz
KAK	: Klinik ataçman kaybı
KAS	: Klinik ataçman seviyesi
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LL-37	: Katelisidin
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP	: Monosit kemotaktik protein

MDA	: Malondialdehit
mg/kg	: Miligram/kilogram
mg/L	: Miligram/Litre
MIP	: Makrofaj enflamatuvar protein
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm <sup>3</sup>	: Milimetre küp
MMP	: Matriks metalloproteinaz
Mnaz	: Mikrokokal nükleaz
MPO	: Myeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NE	: Nötrofil elastaz
NET	: Nötrofil hücre dışı tuzak
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
NO	: Nitrik oksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit anyonu
OCl <sup>-</sup>	: Hipoklorit
OH <sup>-</sup>	: Hidroksil
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	: Plak indeksi
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PMN	: Polimorfonükleer lökosit
RA	: Romatoid artrit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute
SCN <sup>-</sup>	: Tiyosiyanat
SD	: Sondlama derinliği
SLE	: Sistemik lupus eritamatozus
Sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz



USS

: Ultra saf su



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Periodontal Hastalık Patogenezi .....	9
<b>Şekil 1.2.</b> Nötrofillerin antimikrobiyal mekanizmaları: Nötrofiller patojenleri tanıdığı zaman, onları yok etmek için çeşitli fonksiyonlar üstlenmektedir. Fagositoz mikroorganizmanın fagositik vakuol içine alınıp sindirilmesidir. Bu sırada fagolizozom meydana gelmektedir. Bu yeni organelde, mikroorganizma düşük pH ve degrade edici enzimler ile parçalanmaktadır. Nötrofiller aynı zamanda degranülasyon ile granüllerinin içeriklerini çevreye yaymaktadır. Mikroorganizma sindirilmek için çok büyük olduğunda ise, nötrofil DNA lifleri ve granüllerindeki proteinlerden oluşan NET üretmektedir.....	15
<b>Şekil 1.3.</b> Nötrofillerde reseptör aracılı ROT üretimi .....	18
<b>Şekil 1.4.</b> Sytox Green DNA boyası ile boyanmış NET'in fluoresan görüntüsü .....	23
<b>Şekil 1.5.</b> Periodontitiste nötrofil hücre dışı tuzaklar. (A) Cep epitelinde NET görüntüsü(B) Detaylı görüntü (C) Büyütmede NET yapılarındaki yaklaşık 15-17 nm çapındaki kalın lifler görüntülenmiştir. (D) NET içinde hapsedilmiş bakteriler.....	25
<b>Şekil 2.1.</b> Sigara içmeyen ve periodontal olarak sağlıklı bir bireyin ağız içi görüntüsü .....	29
<b>Şekil 2.2.</b> Sigara içmeyen ve evre IV periodontitisli bir bireyin ağız içi görüntüsü .....	29
<b>Şekil 2.3.</b> Sigara içen ve evre IV periodontitisli bir bireyin ağız içi görüntüsü.....	29
<b>Şekil 2.4.</b> Çalışma akış şeması.....	30
<b>Şekil 2.5.</b> Tip 2 biyogüvenlik kabini (Nüve MN120, Türkiye) .....	32
<b>Şekil 2.6.</b> Santrifüjden önce tüp içindeki tabakalar .....	34
<b>Şekil 2.7.</b> Santrifüj cihazı (Thermo Scientific, ABD).....	34
<b>Şekil 2.8.</b> Santrifüjden sonra tüp içindeki tabakalar .....	35
<b>Şekil 2.9.</b> İnkübatör cihazı (Nüve EC160, Türkiye) .....	37
<b>Şekil 2.10.</b> Fluorometre cihazı (Fluorocan Ascent FL Thermo Scientific, ABD) .....	38
<b>Şekil 3.1.</b> Grupların klinik parametrelere göre kutu çizgi grafikleri.....	41
<b>Şekil 3.2.</b> Gruplarda NET miktarlarını gösteren kutu çizgi grafiği .....	43
<b>Şekil 3.3.</b> NET miktarı ile Pİ korelasyonunu gösteren saçılım grafiği .....	45
<b>Şekil 3.4.</b> NET miktarı ile Gİ korelasyonunu gösteren saçılım grafiği .....	45
<b>Şekil 3.5.</b> NET miktarı ile SD korelasyonunu gösteren saçılım grafiği.....	46
<b>Şekil 3.6.</b> NET miktarı ile KAS korelasyonunu gösteren saçılım grafiği.....	46
<b>Şekil 3.7.</b> Percoll tabakaları arasında bulutumsu tabaka şeklinde PMN izlenmiştir.....	47
<b>Şekil 3.8.</b> Santrifüj sonrası içinde eritrositlerin de bulunduğu tortu izlenmiştir.....	47
<b>Şekil 3.9.</b> Eritrositler patlatıldıktan ve tüp santrifüj edildikten sonra içinde nötrofillerin bulunduğu tortu tüpün altında izlenmiştir.....	48
<b>Şekil 3.10.</b> Neubauer sayım kamarasına alınan PMN'in ışık mikroskopik görüntüsü (x10) .....	48
<b>Şekil 3.11.</b> Boya alan ölü PMN (mavi renkte) ve boya almayan canlı PMN (şeffaf) izlenmiştir (Trypan blue boyası) (x40).....	49

**Şekil 3.12.** Nötrofillerin soluk pembe sitoplazması ve koyu mavi parçalı çekirdeği izlenmiştir (Diff-Quick boya) (x40).....49



## TABLolar

<b>Tablo 1.1.</b> Periodontitisin evre ve derecelendirmesi .....	5
<b>Tablo 2.1.</b> Percoll dilüsyonlarının hazırlanması.....	32
<b>Tablo 3.1.</b> Bireylere ait yaş (ortanca, min-max) ve cinsiyet dağılımı (yüzde).....	40
<b>Tablo 3.2.</b> Klinik değişkenlerin gruplarda karşılaştırılması (ortanca, min-max) .....	41
<b>Tablo 3.3.</b> PMN hücre sayılarının gruplarda karşılaştırılması (ortanca, min-max) .....	42
<b>Tablo 3.4.</b> Gruplarda NET miktarlarının sonuçları (ortanca, min-max) .....	43
<b>Tablo 3.5.</b> Periodontitisli ve sağlıklı bireylerde NET miktarlarının sonuçları (ortanca, min-max).....	43
<b>Tablo 3.6.</b> NET miktarının klinik parametreler ile korelasyonu .....	44

## ÖZET

### **Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisli Bireylerde Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun Değerlendirilmesi**

Periodontitis periodontal dokuların kaybıyla sonuçlanan, dental plak ile ilişkili enflamatuvar bir hastalıktır. Enflamasyon sırasında polimorfonükleer lökositler (PMN) ilk yanıtı oluşturmaktadır; ancak nötrofil varlığı her zaman koruyucu değildir. Nötrofil homeostazının bozulduğu birçok durumda periodontal sağlık olumsuz etkilenmektedir. 2004 yılında, nötrofillerin hücre dışı ortama ağ benzeri yapılar salgıladığı keşfedilmiştir. Bu yapılar ‘nötrofil hücre dışı tuzak’ (NET) olarak adlandırılmıştır. NET’ler yapısal komponenti deoksiribonükleik asit (DNA) olan ve üzerinde nötrofil elastaz (NE), myeloperoksidaz (MPO), jelatinaz gibi antimikrobiyal proteinler taşıyan ağı yapılarıdır. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz

tarafından reaktif oksijen türleri (ROT) üretilmesi NET oluşumunu başlatan anahtar basamaktır.

Sigara, periodontitis için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır ve periodontal doku hasarını arttırmaktadır. Bununla birlikte, hem NET için temel kabul edilen, hem de doku hasarı patogenezinde rol oynayan ROT üretimi sigara içen periodontitisli bireylerde artmaktadır. Artmış ROT üretiminden dolayı, sigara içen periodontitisli bireylerde NET miktarının sigara içmeyen periodontitisli bireylere kıyasla daha yüksek olacağı düşünülmüştür. Çalışmamızda, sigara içen ve içmeyen periodontitisli bireylerde NET miktarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışmaya 21 birey dahil edilmiştir [sigara içmeyen ve periodontal olarak sağlıklı (S-P-) 7 birey, sigara içmeyen ve periodontitisli (S-P+) 7 birey, sigara içen ve periodontitisli (S+P+) 7 birey]. Periodontal muayeneleri yapılan bireylerin plak indeksi (Pİ), gingival indeks (Gİ), sondlama derinliği (SD) ve klinik ataçman seviyesi (KAS) kaydedilmiştir. Katılımcılardan izole edilen periferik nötrofiller, NET oluşumunu sağlamak amacıyla forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile aktive edilmiştir. Aktivasyon sonucunda oluşan NET miktarı fluorometre cihazı ile niceliksel olarak ölçülmüştür.

Pİ, Gİ, SD ve KAS, S-P- grupta istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüktür ( $p=0,001$ ;  $p<0,001$ ;  $p=0,003$ ;  $p<0,001$ ). PMN sayısı S+P+ grup ile karşılaştırıldığında S-P- grupta düşüktür; ancak bu fark istatistiksel olarak sınırda bulunmuştur ( $p=0,05$ ). NET miktarı, S+P+ grupta en yüksek bulunmuştur. NET miktarı açısından, S+P+ grup ve S-P- grup karşılaştırıldığında, fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0,008$ ); ancak S-P+ ve S+P+ gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ). NET miktarı ile Pİ, Gİ ve SD arasında orta düzeyde; KAS ile arasında yüksek düzeyde pozitif ilişki bulunmuştur ( $r=0,67$ ;  $r=0,696$ ;  $r=0,533$ ;  $r=0,792$ ).

Sonuç olarak, S+P+ grupta NET miktarı daha yüksek bulunmasına rağmen, S-P+ ve S+P+ gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Periodontitisli bireylerde sigara içmenin NET oluşumu üzerine etkisini araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** NETozis, nötrofil hücre dışı tuzak, Nötrofil, periodontitis, sigara



## SUMMARY

### **Evaluation of Neutrophil Extracellular Trap Formation on Smoker and Non-smoker Subjects with Periodontitis**

Periodontitis is an inflammatory disease that is associated with dental plaque which results in loss of periodontal tissue. In the initial inflammation, polymorphonuclear leukocytes (PMNs) are the first responders; however the existence of neutrophils is not always protective. In many occasions of malfunctions in neutrophil homeostasis, periodontal health has been affected adversely. In 2004, it has been discovered that neutrophils release web like structures to extracellular matrix. These structures are named by 'neutrophil extracellular trap' (NET). Structural component of NET is deoxyribonucleic acid (DNA) and antimicrobial proteins as neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), gelatinase co-localize into web like structure. Key step on NET formation is reactive oxygen species (ROS) production by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase.

Smoking is a risk factor for periodontitis and increases damage on periodontal tissue. Meanwhile ROS which is essential for NET and plays role in pathogenesis of tissue damage, is increased in smokers. Because of the increased ROS production, in smokers with periodontitis expected to product higher levels NET than non-smokers with periodontitis. In this study, we aimed to evaluate NET in smoker and non-smoker periodontitis patients.

21 subjects [non-smokers and periodontally healthy (S-P-) 7 people, non-smokers with periodontitis (S-P+) 7 people, smokers with periodontitis (S+P+) 7 people] are included in this study. Plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) parameters of subjects have been recorded. The peripheral neutrophils isolated from the subjects have been activated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to induce NET formation. NET formed after the activation counted with the fluorometer.

In the S-P- group PI, GI, PD and CAL values are found statistically significant low ( $p=0,001$ ;  $p<0,001$ ;  $p=0,003$ ;  $p<0,001$ ). When compared to S+P+ group PMN

counts found low but this difference is statistically on board ( $p=0,05$ ). When compared NET count values, it was highest in the S+P+ group. When S-P- group and S+P+ group are compared, this difference is statistically significant ( $p=0,003$ ); but in between S-P+ and S+P+ groups, the difference is not statistically significant ( $p>0,05$ ). NET count with PI, GI, PD, there is mild positive; with CAL strong positive relation has been found.

As a result, even the S+P+ group NET count has been found higher, the difference of S-P+ and S+P+ groups is not statistically significant. There is need more researches about smoking effect on NET formation in patients with periodontitis.

**Key Words:** NETosis, neutrophil extracellular trap, neutrophil, periodontitis, smoking



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Periodontal Hastalık

### 1.1.1. Periodontal Hastalık Tanımı ve Prevalansı

Periodontitis, dental biyofilm ile ilişkili kronik, multifaktöryel, enflamatuvar bir hastalıktır ve dişi destekleyen yapılarda ilerleyici yıkımla karakterizedir. Temel özelliği, periodontal cep ve dişeti kanaması varlığında klinik ataçman kaybı (KAK) ve radyografik olarak alveoler kemik kaybı ile kendini gösteren, periodontal destek dokuların kaybıdır. Periodontitis diş kaybına, çiğneme fonksiyonunda olumsuz etkilere ve estetiğin bozulmasına sebep olabilmektedir. Bu yüzden büyük bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Papapanou ve Sanz 2017).

Periodontitisin dünya çapındaki prevalansı yetişkin popülasyonda %10-15 olmakla birlikte, bu oran zayıf oral hijyene sahip gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır (Petersen ve Ogawa 2005). Şiddetli periodontitis, insanlık açısından en sık karşılaşılan altıncı hastalıktır (Kassebaum ve Bernabe 2014). Ülkemizde, 35-44 yaş arasındaki bireylerin %43'ünde, 65 yaş ve üstündeki bireylerin ise %91'inde 3 mm ve daha fazla ataçman kaybı gözlenmiştir (Ilhan ve ark. 2017).

### 1.1.2. Periodontal Hastalık Teşhisi

Periodontitis, mine-sement birleşimini referans kabul ederek dişlerin standardize edilmiş bir periodontal sond yardımıyla çevresel olarak değerlendirilmesi sonucu KAK ölçümü ile teşhis edilmektedir (Tonetti ve Greenwell 2018). Kronik periodontitis, periodontitisin en sık karşılaşılan formudur ve genel olarak enflamatuvar hastalığın yavaş ilerlemesiyle karakterizedir. Ancak, konak immün yanıtı modifiye edebilen sistemik ve çevresel risk faktörleri ile ilişkili olarak periodontal yıkım hızlı ilerleyebilmektedir. Periodontal cep oluşumu, dişeti çekilmesi veya her ikisi ile

birlikte görülen ataçman kaybı periodontitis için karakteristiktir (Hinrics ve Kotsakis 2015).

Tedavi edilmemiş kronik periodontitisli hastalarda gözlenen klinik bulgular şunlardır (Dommisch ve Kebchull 2015);

- Supragingival ve subgingival plak ve diştaşı
- Dişetinde ödem, kızarıklık ve pürüklülük kaybı
- Değişmiş dişeti kenarları
- Cep oluşumu
- Sondlamada kanama
- Ataçman kaybı
- Kemik kaybı
- Kök furkasyon tutulumu
- Artmış diş mobilitesi
- Diş pozisyonunda değişim
- Diş kaybı

### **1.1.3. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırması**

19 yıldır kullanılan ‘1999 International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions’ sınıflandırmasına göre, periodontitis kronik, agresif (lokalize ve generalize), nekrotizan ve sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis olmak üzere 4 başlık altında sınıflandırılmıştır.

2017 Dünya Çalıştayı’nda, bu sınıflandırma hastalığın patofizyolojisine uygun bir şekilde revize edilerek periodontitisin üç formu tanımlanmıştır: nekrotizan periodontitis, sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis ve daha önceden “agresif” ve “kronik” olarak tanımlanan periodontitis formları “periodontitis” olarak tek kategori altında toplanmıştır. Revizyon süreci sonunda, zamanla ortaya çıkabilecek yeni kanıtlara adapte olabilecek, çok boyutlu evreleme ve derecelendirme sistemine dayanan bir sınıflandırma üzerinde karara varılmıştır.

Evreleme büyük oranda hastalığın şiddetine ve tedavinin karmaşıklığına bağlıdır. Derecelendirme ise hastalığın geçmişi, hastalığın ilerleyişi için risk değerlendirmesi, tedavinin olabilecek yetersiz sonuçları ve hastalık veya tedavinin genel sağlığı olumsuz etkileyebilecek riskleri gibi hastalığın biyolojik özellikleri ile ilgili bilgi vermektedir. Evreleme dört kategoriye içermektedir (evre I'den IV'e kadar). Evre, klinik ataçman kaybı, kemik kaybının miktarı ve yüzdesi, sondlama derinliği, açılal kemik defektlerinin varlığı ve şiddeti, furkasyon tutulumu, diş mobilitesi ve periodontitise bağlı diş kaybı gibi değişkenlere bakılarak belirlenmektedir (Papapanou ve Sanz 2018, Needleman ve Garcia 2018, Tonetti ve Greenwell 2018).

Tonetti ve ark. (2018) tarafından yapılan yeni sınıflandırmaya göre;

Evre I periodontitis, başlangıç periodontitis, gingivitis ve periodontitis arasındaki sınır olarak kabul edilmektedir ve ataçman kaybının ilk evresidir. Bu nedenle, evre I periodontitisli hastalarda dişeti enflamasyonu ve disbiyotik biyofilmin devam etmesine yanıt olarak periodontitis gelişmiştir. Ancak, periodontitis teşhisinde altın standart olarak kabul edilen periodontal sondlama, erken klinik ataçman kaybını belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Tükürük biyobelirteçlerinin değerlendirilmesinin ve/veya yeni görüntüleme tekniklerinin evre I periodontitisin erken teşhis edilmesine olanak sağlayabileceği önerilmiştir. Kaybın en çok olduğu bölgede interdental KAK 1-2 mm'dir. Koronal üçlüde %15'i geçmeyen radyografik kemik kaybı vardır. Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur. Maksimum sondlama derinliği 4 mm veya daha azdır. Genellikle horizontal kemik kaybı mevcuttur.

Evre II periodontitis, orta şiddette periodontitis, dikkatli bir klinik muayene ile belirlenen periodontitisin diş desteğinde neden olduğu hasarların görüldüğü yerleşmiş periodontitisi temsil etmektedir. Bu evrede, tedavi pek çok vakaya göre basit olsa da, evre II hastanın standart tedaviye verdiği yanıtı dikkatli değerlendirmek önemlidir. Hastalığın derecesi ve hastanın tedaviye verdiği yanıtı göre daha ileri tedaviler düşünülmelidir. Kaybın en çok olduğu bölgede interdental KAK 3-4 mm'dir. Koronal üçlüde %15-33 arasında radyografik kemik kaybı vardır. Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur. Maksimum sondlama derinliği 5 mm veya daha azdır. Genellikle horizontal kemik kaybı mevcuttur.

Evre III periodontitis, daha fazla diş kaybı için potansiyel taşıyan şiddetli periodontitis, ataçmada belirgin bir kayıp söz konusudur, tedavi edilmezse diş kaybedilebilmektedir. Bu evre, kökün orta üçlüsüne ilerlemiş derin periodontal lezyonlarla karakterizedir. Kaybın en çok olduğu bölgede interdental KAK 5 mm veya daha fazladır. Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan radyografik kemik kaybı vardır. Periodontitis sebebiyle en çok 4 diş kaybedilmiştir. Sondlama derinliği 6 mm veya daha fazladır. 3 mm veya daha fazla vertikal kemik kaybı vardır. II. veya III. derece furkasyon tutulumu ve orta derece kret defekti mevcuttur.

Evre IV periodontitis, bu evrede periodontal destek dokuda ciddi hasar oluşmuştur. Bu durum sıklıkla diş ve çiğneme fonksiyonunun kaybına neden olmaktadır. Periodontitis kontrol altına alınmaz ve yeterli tedavi uygulanmaz ise dentisyonun kaybedilme riski vardır. Bu evre kökün apikal üçlüsüne ilerlemiş derin periodontal lezyonlarla veya çoklu diş kayıplarıyla karakterizedir. Kaybın en çok olduğu bölgede interdental KAK 5 mm veya daha fazladır. Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan radyografik kemik kaybı vardır. Periodontitis sebebiyle en az 5 diş kaybedilmiştir. Hastaların çiğneme fonksiyonunun kaybı, sekonder okluzal travma, şiddetli kret defekti gibi nedenlerden dolayı kapsamlı tedaviye ihtiyacı vardır.

Ancak evrelerden bağımsız olarak, periodontitis ilerleyişi kişiden kişiye farklılık gösterebilmektedir. Bazı hastalarda tedaviye verilen yanıt iyi olmayabilmekte ve genel sağlığı etkileyebilmektedir. Sigara içme veya diyabetin metabolik kontrolü gibi tanımlanmış risk faktörleri periodontitisin ilerleme oranını etkilemekte ve periodontitisin bir evreden diğerine geçişini arttırabilmektedir. Derecelendirme üç seviyeden oluşmaktadır (derece A-hastalık ilerleyişi için düşük risk, derece B-orta risk, derece C-yüksek risk) ve periodontitis ilerleyişine ek olarak genel sağlık, sigara içme ve diyabette metabolik kontrol gibi diğer maruziyetleri de kapsamaktadır. Bundan dolayı, derecelendirme hastalığın kapsamlı tedavisi için oldukça kritik olan hasta ile ilişkili faktörlerin teşhise dahil edilmesi için klinisyene olanak tanımaktadır. Hastada hastalık ilerleyişini arttıran veya tedaviye yanıtı azaltan risk faktörleri varsa, risk faktörüne ait bilgiler hastalığın gelecek dönemdeki prognozunu tahmin etmek için kullanılabilir. Bu nedenle, risk faktörü varlığında derece skoru yüksek bir değere taşınmalıdır (Tonetti ve ark 2018) (Tablo 1.1).

**Tablo 1.1.** Periodontitisin evre ve derecelendirmesi

Periodontitis evresi		Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Şiddet	En çok kayıp olan bölgede interdental KAK	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radyografik kemik kaybı	Koronal üçlü (<%15)	Koronal üçlü (%15-33)	Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanmıştır	Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanmıştır
	Diş kaybı	Periodontitis sebebiyle diş kaybı yok	Periodontitis sebebiyle diş kaybı yok	Periodontitis sebebiyle diş kaybı ≤4	Periodontitis sebebiyle diş kaybı ≥5
Komplekslik	Lokal	Maximum sondlama derinliği ≤4 mm Çoğunlukla horizontal kemik kaybı	Maximum sondlama derinliği ≤5 mm Çoğunlukla horizontal kemik kaybı	Evre II' ye ek olarak; Sondlama derinliği ≥6 mm Vertikal kemik kaybı ≥ 3mm Furkasyon tutulumu II veya III Orta derecede kret defekti	Evre III' ye ek olarak; Kompleks tedavi ihtiyacı vardır: -Çiğneme disfonksiyonu -Sekonder okluzal travma (diş mobilitesi ≥2) -Şiddetli kret defekti -Isırmada kollaps, kayma, açılma, -20 ve daha az diş
Şiddet ve dağılım	Evreye ek olarak tanımlayıcılar	Her evre için, lokalize (diş tutulumu <%30), generalize, molar/kesici tanımlamaları yapılabilmektedir.			
Periodontitis derecesi			Derece A: Yavaş ilerleyiş	Derece B: Orta ilerleyiş	Derece C: Hızlı ilerleyiş
Primer kriter	İlerleyişin direkt kanıtı	Uzun dönemli veri (radyografik kemik kaybı veya KAK)	5 yıldan fazla süre kayıp yok	5 yıldan fazla süre <2 mm	5 yıldan fazla süre ≥2 mm
	İlerleyişin indirekt kanıtı	% olarak kemik kaybı/yaş	< 0.25	0.25-1.0	>1.0
		Hasta fenotipi	Fazla miktarda biyofilm ve düşük seviyede yıkım	Biyofilm miktarı ile orantılı yıkım	Biyofilmden beklenenden daha fazla yıkım; hastalığın hızlı ilerleyişi ve/veya erken başlangıcı

Dereceyi modifiye edenler	Risk faktörleri	Sigara içme	Sigara içmeyenler	<10 sigara/gün Sigara içenler	≥10 sigara/gün sigara içenler
		Diyabet	Normoglisemik/ diyabet teşhisi yok	Diyabetli hastalarda HbA1c <%7.0	Diyabetli hastalarda HbA1c ≥ %7.0
Periodontitisin sistemik etkisinin riski	Enflamatuvar yük	Yüksek duyarlıklı CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1-3 mg/L	>3 mg/L

Derece A, uzun dönem verilere göre, 5 yıldan fazla zaman diliminde radyografik kemik kaybı veya KAK yoktur. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25'ten azdır. Fazla miktarda biyofilm ile düşük seviyede yıkım söz konusudur. Sigara içmeyen ve normoglisemik, diyabet öyküsü olmayan bireylerdir. Yüksek duyarlıklı C reaktif protein (hsCRP) seviyesi 1mg/L'den azdır.

Derece B, uzun dönem verilere göre, 5 yıldan fazla zaman diliminde 2 mm'den az radyografik kemik kaybı veya KAK görülmektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25-1.0 arasındadır. Biyofilm miktarı ile yıkım uyum içindedir. Bireyler günde 10 sigaradan daha az sigara içmektedir. Diyabetli hastalarda HbA1c %7'den düşüktür. hsCRP seviyesi 1-3mg/L arasındadır.

Derece C, uzun dönem verilere göre, 5 yıldan fazla zaman diliminde radyografik kemik kaybı veya KAK 2 mm ve üzerindedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 1'den fazladır. Yıkım beklenenden fazladır; spesifik klinik durum hızlı ilerlemeye ve/veya erken başlayan hastalığa işaret etmektedir. Bireyler günde 10 veya daha fazla sigara içmektedir. Diyabetli hastalarda HbA1c %7 veya daha fazladır. hsCRP seviyesi 3 mg/L'den fazladır (Tonetti ve ark. 2018).

#### 1.1.4. Periodontal Hastalık Histopatolojisi

Periodontitis dental biyofilmdeki mikroorganizmalardan kaynaklanan ve periodontal ligament ve alveoler kemik gibi dişin destekleyici dokularının progresif yıkımına neden olan enflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Hinrics ve Kotsakis 2015). Periodontal sağlık durumunda plağın bakteriyel kompozisyonu ve dişetindeki immün-enflamatuvar yanıt arasında denge vardır; ancak konak yanıtının veya konak ve bakteri arasındaki dengenin bozulması ile ilişkili olarak periodontal sağlık bozulmaktadır. Enflamasyon durumunda gingival dokular mikroskop altında incelendiğinde özellikle nötrofillerin, makrofajların, plazma hücrelerinin ve lenfositlerin bağ dokusuna infiltre olduğu görülmüştür. Araştırmalar dental plak akümülayonuna karşı gelişen enflamatuvar cevapta spektrum olduğunu göstermiştir. Bazı bireylerde minimal bir enflamasyon gelişirken, bazı bireylerde enflamasyon daha belirgindir. Bu gözlemler, dişetindeki enflamatuvar durum açısından bireyler arasında konak yanıtında meydana gelen varyasyonların önemini göstermektedir. Konağın immün-enflamatuvar yanıtı bireylerin periodontitis patogenezi için belirleyicidir (Preshaw ve ark. 2015).

Page ve Schroeder (1976), gingival dokularda görülen histolojik değişimleri göstermiştir. Buna göre, subgingival biyofilmin bir sonucu olarak, dişetinde düşük dereceli kronik enflamatuvar cevap vardır. ‘Başlangıç lezyonu’ olarak adlandırılan ilk evrede 2-4 günlük plağa cevap olarak gelişen düşük dereceli enflamasyon, damarsal ağın dilatasyonu ve geçirgenliğin artışıyla karakterizedir. Böylece dişeti sulkusundaki bakteriyel ürünlerin meydana getirdiği kemotaktik uyarılar sonucu nötrofiller ve monositler dişeti damarlarından dişeti bağ dokusuna göç etmektedir. Bu süreçte adezyon moleküllerinin up-regülasyonu nötrofillerin kapiller alandan bağ dokusuna göçünü kolaylaştırmaktadır.

Gingivitisin ‘erken lezyonu’ plak akümülayonundan yaklaşık 1 hafta sonra görülmektedir. Dişeti kapiller proliferasyon ve devam eden vazodilatasyona bağlı olarak eritamatöz görünmektedir. Damarsal geçirgenliğin artışı dişeti oluğu sıvısı (DOS) akışını ve dolayısıyla nötrofillerin sulkuler alana geçişini arttırmaktadır. Bu

evrelerde predominant infiltrate hücre tipi nötrofillerdir. Nötrofiller dokulardan sulkusa göç etmekte ve bakteriyi fagosite etmektedir.

Gingivitisin 'yerleşmiş lezyonu' ise klinisyenler tarafından 'kronik gingivitis' olarak adlandırılmaktadır. Erken lezyonun yerleşmiş lezyona ilerleyişi plağın kompozisyon ve miktarının yanı sıra konağın duyarlılığı ve risk faktörlerine (lokal/sistemik) bağlıdır (Şekil 1.1). Tüm çalışmalar yerleşmiş gingivitiste enflame bağ dokusunun, enflamatuvar hücreler tarafından işgal edildiğini açık olarak göstermektedir. Bu enflamatuvar hücrelerin büyük çoğunluğu, birleşim ve sulkus epiteline komşu alanda, kan damarlarının çevresinde ve kollajen lif demetleri arasında gösterilmiştir. Nötrofiller dokular içinde birikmekte ve lizozomal içeriklerini hücre dışı ortama salmaktadır. Bu durum ileride doku yıkımına neden olmaktadır. Diğer yandan, nötrofiller matriks metalloproteinaz-8 (MMP-8; nötrofil kollejenaz) ve MMP-9 (jelatinaz B)'un majör kaynağıdır. Bu enzimler, nötrofillerin sıkı kollajen lifler arasından sulkusa göç ettiği sırada, enflame dişeti dokularında büyük miktarlarda üretilmektedir. Birleşim epiteli ve sulkuler epitel, diş yüzeyine tutunmayan cep epiteli oluşturur ve büyük oranda nötrofil içermektedir. Cep epitelinin ülser ve sonda dirençsiz olması sonucu görülen sondlamada kanama kronik gingivitiste sık görülen bir bulgudur. Tüm histopatolojik değişimlere rağmen plak kontrolü sağlandığı durumda enflamatuvar değişimler tersine çevrilebilmektedir.

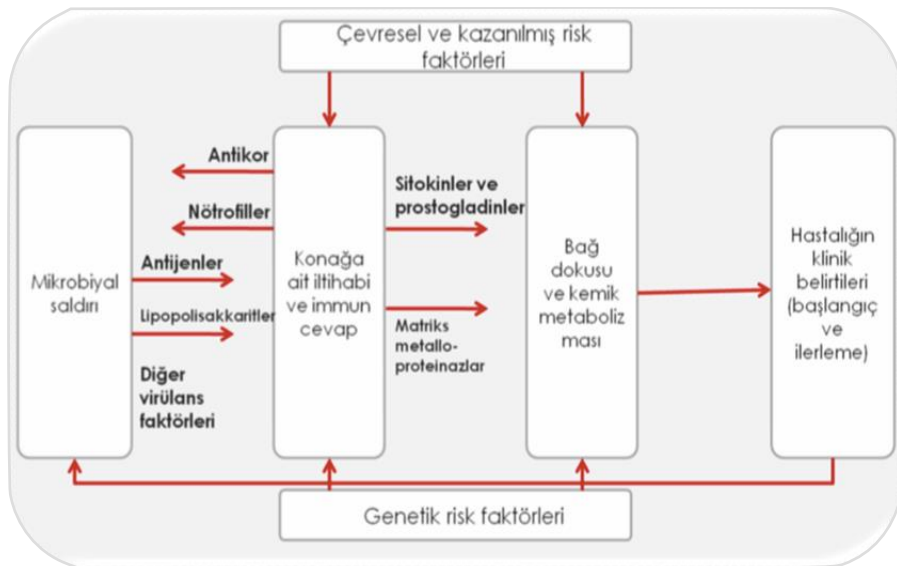
'İlerlemiş lezyonda' gingivitisten periodontitise geçiş söz konusudur. Bu durum, biyofilmin kompozisyonu ve miktarı; konağın enflamatuvar yanıtı, çevresel ve genetik risk faktörleri gibi pek çok faktörle ilişkilidir. Histolojik değerlendirmelerde, periodontal ligament ve alveoler kemik içine uzanan kollajen yıkımı gösterilmiştir. Cep epiteli ve periodontal cepte nötrofiller, bağ dokusunda ise plazma hücreleri baskın bulunmuştur. Birleşim epiteli kök yüzeyinde apikale yer değiştirmiştir. Bakterilerin kemik içine yayılmasını önlemek için bir savunma mekanizması olarak, osteoklastik kemik rezorpsiyonu görülmektedir. Cebin derinleşmesiyle, periodontal patojenler için oldukça elverişli bir ortam olan boşluğa doğru bakteriler prolifer olmaktadır. Periodontal cep, patojenler için korunaklı, ılık, nemli, besin desteği ile birlikte anaerobik bir çevre sağlamanın yanında, bakterileri konağın enflamatuvar yanıtından korumaktadır. Böylece, bir döngü halinde kronik enflamasyon gelişmekte



ve doku hasarı devam etmektedir. Biyofilm başlatıcı bir faktör olsa da doku hasarında temel rolü, konağın enflamatuvar yanıtı sergilemektedir (Page ve Schroeder 1976).

Artık bilinmektedir ki doku yıkımının büyük bir kısmı konağın immün-enflamatuvar yanıtının sonucu olarak meydana gelmektedir. Bir paradoks gibi görünse de konak immün-enflamatuvar yanıt sonucu meydana gelen doku hasarı periodontal hastalığa özgü değildir. Örneğin, enflamatuvar bir hastalık olan romatoid artrit (RA)'e sahip hastaların eklemlerinde görülen doku hasarı uzamış ve artmış enflamatuvar yanıtın sonucudur ve periodontal patogenezi için önemli olduğu bilinen pek çok sitokinün üretimi romatoid artritte artmaktadır. Her iki durumda da yıkıcı enflamatuvar olaylar olmasına rağmen, patogenezi farklı anatomilerin sonucu olarak farklılık göstermektedir. Benzer olarak, kardiyovasküler hastalıklar (Loos 2005), diyabet (Wellen ve Hotamisligil, 2005) ve ülseratif kolit (Satsangi ve ark. 2006) gibi pek çok hastalıkta enflamatuvar yanıtın önemi vurgulanmıştır.

Özet olarak, periodontitiste meydana gelen doku hasarının çoğunluğu artmış ve bozulmuş enflamatuvar belirteçlerin ve yıkıcı enzimlerin üretimi ile ilişkilidir (Preshaw 2015).



Şekil 1.1. Periodontal Hastalık Patogenezi (Page ve Kornman, 1997)

## 1.2. Periodontal Hastalık Risk Faktörleri

Risk, bireyin belirli bir zaman periyodu içinde bir hastalığa yakalanma olasılığıdır ve bireyden bireye değişmektedir. Risk faktörleri hastalarda yapılan uzun dönem çalışmalara dayanmaktadır. Risk faktörüne maruziyet tek bir zaman diliminde, çoklu ve farklı zaman dilimlerinde veya devamlı olabilmektedir; ancak bir risk faktörünün tanımlanabilmesi için maruziyet, hastalığın başlamasından önce olmalıdır (Novak ve Novak 2015).

Periodontal hastalığa yatkınlık bireyden bireye göre farklılık göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar hastalığın başlama yaşı, ilerleme hızı ve şiddetinin bireyin sistemik ve çevresel risk faktörleri tarafından belirlendiğini göstermiştir. Bu faktörler moleküler, hüresel ve genetik seviyede etki göstermektedir. Öte yandan, risk faktörlerinin modifiye edilmesi periodontal hastalığın kontrol altına alınması açısından kritik öneme sahiptir. Örneğin, sigara ve alkol tüketimi hastanın yaşam tarzı ile ilgili modifiye edilebilir risk faktörleridir (Genco ve Borgnakke 2013).

### 1.2.1. Periodontal Hastalık ve Sigara

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 verilerine göre, dünya çapında yaklaşık 1.1 milyar insan tütün ürünleri kullanmaktadır (World Health Organization 2015). 2012 yılında, Amerika'da yaklaşık 43.4 milyon insanın sigara içtiği ve 8.6 milyon sigara içen bireyin sigara ile ilişkili hastalıklara yakalandığı, bu vakalardan 443.000'in ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. 2012 yılında Avrupa'da popülasyonun yaklaşık %32'si sigara içicisidir. Bu oran, İsveç'te %16 iken Yunanistan'da %48'dir. Avrupa'da 30 yaş üstü popülasyonda görülen ölümlerin yaklaşık %16'sı tütün kullanımı ile ilişkilidir. Buna ek olarak, her yıl 79.000 sigara içmeyen Avrupalı birey pasif içiciliğe bağlı olarak hayatını kaybetmektedir. Dünya çapında 15 yaş ve üstü popülasyonun yaklaşık %13'ü sigara içicisidir. (Preshaw ve Chambrone 2015). Türkiye'de 15 yaş ve üstü erkeklerin %40.2'si, kadınların ise %12.4'ü sigara içmektedir (World Health Organization 2015).

Sigaranın vücuttaki her organ için zararlı etkileri vardır ve sigara, yaşam süresi ve kalitesinin azalmasına sebep olmaktadır (Preshaw ve ark. 2015). Sigara içmek, akciğer kanseri (Jemal ve ark. 2008), kardiyovasküler hastalıklar (Fagard 2009) ve kronik akciğer hastalıkları (Lin ve ark. 2008) gibi pek çok farklı hastalık için en sık görülen çevresel risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda, son zamanlarda yapılan çalışmalar, sigaranın kronik enflamatuvar hastalıklar ve RA, psöriyazis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi pek çok otoimmün hastalık üzerinde yaygın etkileri olduğunu göstermiştir (Renard 2004, Goncalves ve ark. 2011, Lee ve ark. 2012, Perricone ve ark. 2016).

Sigara ve periodontitis arasındaki ilişki, geçtiğimiz yüzyılın ortalarından itibaren araştırılmaya başlanmıştır (Borojevic 2012). Sigara içmenin, periodontal hastalığın başlaması ve şiddetlenmesi için bağımsız bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir (Buduneli ve ark. 2011). Kesitsel ve uzun dönem çalışmalarda, sigara ile periodontal hastalık gelişme riskinin arttığını gösteren güçlü kanıtlar bildirilmiştir. Sigara içmeyenler ile içenler karşılaştırıldığında, sigara içenlerde periodontal hastalık prevalans (Calsina ve ark. 2002) ve şiddetinin (Mullally 2004, Baljoon 2005) arttığı, hastalığın daha erken başladığı (Haber 1994, Mullally 2004), daha hızlı ilerlediği (Bergström 2004, Fisher ve ark. 2007) ve tedaviye daha az yanıt verdiği (Ah ve ark. 1994, Haffajee ve ark. 1997) gösterilmiştir. Hastalığın tanımı ve sigara maruziyetine bağlı olarak, sigara içenlerde kronik periodontitis gelişme riskinin 3-25 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Bergström 2003, Hyman ve Reid 2003). Kronik periodontitis teşhisi konan bireylerin yaklaşık yarısı sigara içmektedir (Tomar ve Asthma 2000, Hyman ve Reid 2003, Do ve ark. 2008). Sigara ve periodontitis arasındaki ilişkinin değerlendirildiği ve 12.000 bireyin dahil edildiği altı yıl süren bir çalışmada, sigara içen bireylerde periodontitis gelişme riskinin yaş, cinsiyet, ırk ve eğitim gibi faktörlere bağlı olmaksızın sigara içmeyen bireylerin 4 katı olduğu ve sigara ile periodontitis arasındaki ilişkinin doz bağımlı olduğu bulunmuştur (Tomar ve Asthma 2000). Sigara içen bireylerde, sigara içmeyen bireylere göre periodontal cep derinliğinin (Bergström ve Eliasson 1987a) ve dişeti çekilmesinin (Martinez-Canut ve ark. 1995, Calsina ve ark. 2002) arttığı gösterilmiştir. 142 sigara içmeyen ve 51 sigara içen bireyde yapılan kesitsel bir çalışmada, ataçman kaybı ve dişeti çekilmesinin

sigara içen bireylerde arttığı ve sigara içenlerde ataçman kaybının sigara içmeyenlerin iki katı olduğu bildirilmiştir (Gunsolley ve ark. 1998). 889 orta ve ileri derece periodontitisli hastalarda yapılan bir çalışmada, ataçman kaybı ve gün içinde içilen sigara sayısı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Martinez-Canut ve ark. 1995). Yine orta ve ileri derece periodontitisli hastalarda yapılan başka bir çalışmada, ileri derece periodontitisli hastalarda sigara içme prevalansının (%69) orta derece periodontitisli hastalardan (%40) daha çok olduğu gösterilmiş ve hastalık şiddeti ile sigara içme prevalansı arasında ilişki olduğu düşünülmüştür (Haber ve Kent 1992). Amerika (Albandar ve ark.2000), Avustralya (Arora ve ark. 2010), Brezilya (Haas ve ark. 2012), Hindistan (Bhagyajyothi ve Pushpanjali 2011) ve Tayland (Torrunguang ve Gongsakdi 2012) gibi farklı toplumlarda yapılan çalışmalar ile diş kaybı ve sigara arasında güçlü ilişki olduğu gösterilmiştir. Kronik periodontitisli hastalar genellikle cerrahi olmayan periodontal tedaviye olumlu cevap vermektedir; ancak sigara içen bireylerde cerrahi (Scabbia ve ark. 2001, Trombelli ve ark. 2003) ve cerrahi olmayan (Preber ve Bergström 1986, Apatzidou ve ark. 2005, Wan ve ark. 2009) periodontal tedaviye verilen yanıtın azaldığı gösterilmiştir (Bunaes ve ark. 2015, Reino ve ark. 2015). Sistematik bir derlemeye göre, sigaranın bırakılmasının ardından periodontal tedaviye verilen yanıt iyileşmektedir (Heasman ve ark. 2006). Dental implantlar kaybedilen dişin yerini alan güvenilir bir tedavi seçeneğidir; ancak sigara içenlerde implant başarısızlığının arttığı görülmüş ve sigara implant kaybı açısından primer risk faktörü olarak tanımlanmıştır (Kasat ve Ladda 2012). Periodontitis varlığı ve sigara içmenin, peri-implantitis riskini 4.7 kat arttırdığı gösterilmiştir (Mombelli ve ark. 2012).

Sigaranın periodontal durum üzerindeki etkisi, plak indeksi ve oral hijyenden bağımsız bir şekilde, tütünün periodontal dokular üzerine direkt etkisine bağlanmıştır (Preber ve Bergström 1985, Bergström ve Eliasson 1987b, Bergström 1990, Grossi ve Zambon 1994, Grossi ve ark.1997, Axelsson ve ark. 1998). Yapılan çalışmalarda, sigara içmenin subgingival biyofilmin yanı sıra, vaskülarizasyon, hümmoral ve hüccresel immün yanıt ve enflamatuvar mekanizmalar üzerinde etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda, sigara sitokin ve adezyon molekül ağını etkilemektedir (Kinane ve Chestnutt 2000). Tütün dumanı içindeki en önemli aktif komponent-

lerden biri olan nikotinin, periferik kan monositlerinden prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ve interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) salınımını (Payne ve ark. 1996) ve dişeti fibroblastlarında MMP-2 aktivasyonunu ve kollajen degradasyonunu arttırdığı (Zhang ve ark. 2011) gösterilmiştir. Sigara içen sağlıklı, gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylerde yapılan bir çalışmada, sigaranın lokal ve sistemik enflamatuvar yanıtı etkilediği bildirilmiştir (Ebersole ve ark. 2014). Sigara içen bireylerde periodontal tedaviden sonra tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Erdemir ve ark. 2004). Başka bir çalışmada, sigara içen kronik periodontitisli bireylerde sigara içmeyenlere göre, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-12 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin; IL-8, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), makrofaj enflamatuvar protein-1alfa (MIP-1 $\alpha$ ) gibi kemokinlerin ve IL-7 ve IL-15 gibi T-hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin düzenlenmesinden sorumlu düzenleyici moleküllerin azaldığı gösterilmiştir. Sigaranın immün sistem üzerindeki bu baskılayıcı etkilerinin periodontitis duyarlılığını arttırdığı düşünülmüştür (Tymkiw ve Thunell, 2011). Sigara içenlerde, artan periodontal yıkımın hangi mekanizmayla gerçekleştiği tam olarak açıklanamasa da nötrofil fonksiyonu, antikör üretimi, fibroblast aktivitesi, vasküler ve enflamatuvar belirteçlerin sentezinde değişimler olduğu bulunmuştur (Chang ve ark. 2002, Guntch ve ark. 2006).

### **1.3 İmmün Sistemde Nötrofillerin Rolü**

Düzensiz çekirdeklerinden dolayı PMN olarak da bilinen granülositlerin %50-70'ini nötrofiller oluşturmaktadır. Vücudumuzda günde yaklaşık 10<sup>11</sup> nötrofil üretilmektedir. Bu sayı bakteriyel enfeksiyon durumunda 10<sup>12</sup>'ye kadar çıkabilmektedir; ancak nötrofillerin yaşam süreleri oldukça kısadır (Rosales ve ark. 2016).

Homeostatik şartlar altında, dolaşımdaki nötrofiller fonksiyon görecekları dokuya göç etmekte ve gün sonunda apoptoza uğrayarak veya makrofajlar tarafından elimine edilerek ortadan kaldırılmaktadır (Scott ve Krauss 2012, Rosales ve ark. 2016). Sağlığın tekrar kurulabilmesi için enflamasyonun zamanında çözülmesi gereklidir. Nötrofillerin zamanında elimine edilememesi doku homeostazını bozarak

nötrofil-aracılı yıkıma ve kronik enflamasyona sebep olmaktadır (Van Dyke ve Serhan 2003).

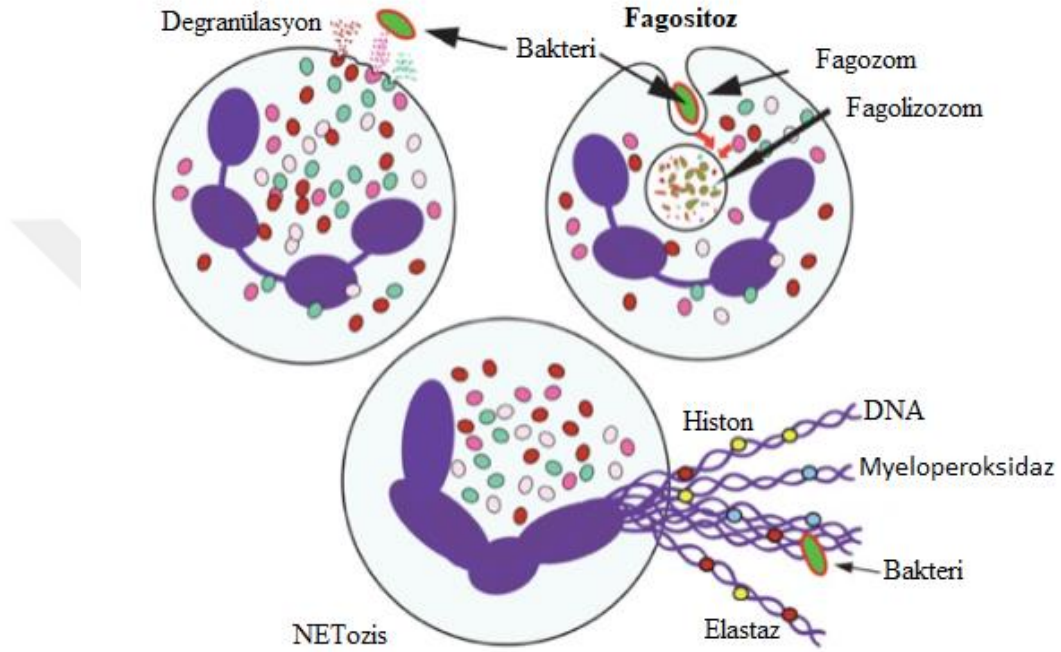
Nötrofillerin enfeksiyon bölgesine ulaşması akut enflamatuvar cevabın anahtarıdır ve dokuya göçü, enflamasyon sırasında konak tarafından üretilen kemotaktanlar ve patojen kaynaklı faktörler tarafından düzenlenmektedir. Nötrofiller fagositoz, degranülasyon ve NET oluşumu olmak üzere üç ana antimikrobiyal fonksiyona sahiptir (Şekil 1.2) (Rosales 2018).

Azurosidin, katelisidin (LL-37), insan nötrofil peptidler (HNP;  $\alpha$ -defensinler), laktoferrin, elastaz ve lizozimler direkt veya indirekt antimikrobiyal aktiviteye sahip nötrofil kaynaklı moleküllerdir (Almeida ve ark. 1996, Soehnlein 2009).

Mikroorganizmaların öldürülmesi amacıyla nötrofil içinde pek çok toksik ürün üretilmektedir. Bu ürünlere örnek olarak, bakteriler üzerine doğrudan toksik etki gösteren nitrik oksit (NO), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) verilebilmektedir. NO, nötrofil, makrofaj ve lenfositlerde nitrik oksit sentaz (iNOS2) tarafından üretilmektedir.  $O_2^-$ , çok komponentli membran ilişkili NADPH oksidaz tarafından, oksijen tüketiminde geçici bir artışa sebep olan ve oksidatif patlama adı verilen süreç sonunda oluşturulmaktadır.  $O_2^-$ , süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmektedir. Kimyasal ve enzimatik bir dizi reaksiyon sonucunda, peroksidaz enzimi ile  $H_2O_2$ 'den hidroksil radikali ( $OH^-$ ) ve hipoklorit ( $OCl^-$ ) dahil olmak üzere, bakterinin öldürülmesini sağlayan pek çok toksik kimyasal üretilmektedir (Murphy ve ark. 2007). Nötrofillerin enfeksiyona hızlı bir şekilde yanıt üretebilmesi konak immün yanıt için temel kabul edilmektedir; ancak yüksek seviyelerde sitotoksik moleküller üreten bu hücrelerin doku hasarı patogenezi ile ilişkili olması şaşırtıcı değildir (Kobayashi ve DeLeo 2009).

Nötrofiller üzerine yapılan güncel araştırmalar, nötrofillerin mikroorganizmaların basitçe öldürülmesini aşan pek çok önemli fonksiyonda geniş bir repertuvara sahip olduğunu ortaya koymuştur (Nauseef ve Borregaard 2014). Nötrofiller, sitokin üreten (Tecchio ve Cassatella 2016), komşu hücrelerin aktivitesini modüle eden, enflamasyonun rezolüsyonuna katkıda bulunan (Greenlee-Wacker 2016), uzun süreli

immün cevap için makrofajları regüle eden (Chen ve ark. 2014) ve kanser dahil olmak üzere pek çok hastalıkta önemli rol oynayan (Uribe-Querol ve Rosales 2015, Mishalian ve ark. 2017) aktif ve kompleks hücrelerdir (Ericson ve ark. 2014).



**Şekil 1.2.** Nötrofillerin antimikrobiyal mekanizmaları: Nötrofiller patojenleri tanıdığı zaman, onları yok etmek için çeşitli fonksiyonlar üstlenmektedir. Fagositoz mikroorganizmanın fagositik vakuol içine alınıp sindirilmesidir. Bu sırada fagolizozom meydana gelmektedir. Bu yeni organelde, mikroorganizma düşük pH ve degrade edici enzimler ile parçalanmaktadır. Nötrofiller aynı zamanda degranülasyon ile granüllerinin içeriklerini çevreye yaymaktadır. Mikroorganizma sindirilmek için çok büyük olduğunda ise, nötrofil DNA lifleri ve granüllerindeki proteinlerden oluşan NET üretmektedir (Rosales 2018).

### 1.3.1 Periodontal Hastalıkta Nötrofillerin Rolü

Normal şartlar altında, dolaşımda yaklaşık  $7400/\text{mm}^3$  beyaz kan hücresi mevcuttur ve bu hücrelerin yaklaşık %59'unu nötrofiller, %2.7'sini eozinofiller ve %4'ünü monositler oluşturmaktadır (Quinn ve ark. 2007). PMN'lerin büyük kısmını oluşturan nötrofiller, dişeti sulkusunda yaygın olarak bulunmaktadır (Ryder 2010). Enflamasyon durumunda ekstravazasyon ile damar dışına çıkarak enflamasyon bölgesine ulaşan nötrofillerin, periodontal dokularda enfeksiyöz ajana karşı savunmanın

ilk hattını oluşturdıkları kabul edilmektedir. Bununla birlikte, nötrofillerin varlığı her zaman koruyucu değildir (Kantarıcı ve ark. 2003). Periodontitisli hastalarda periferik nötrofil sayısının sağlıklı kontrollerden yüksek olduğu (Kweider ve ark. 1993) ve hastalık şiddetiyle birlikte sayının arttığı (Loos ve ark. 2000) gösterilmiştir. Enflamatuvar periodontal dokulardaki nötrofil sayısı hastalığın şiddeti ile korelasyon göstermektedir ve hiperaktif nötrofillerin doku hasarına neden olduğu düşünülmektedir (Landzberg ve ark. 2015). Nötrofillerin sayı ve fonksiyonunda hasar ile beraber seyreden tüm konjenital durumlarda periodontitisin şiddetli formlarının görülmesi bize periodontal dokuların sağlığının korunmasında nötrofillerin taşıdığı önemi göstermektedir (Chapple ve Matthews 2007, Ryder 2010, Aboodi ve ark. 2011). Nadir olarak görülen bu defektlerden bazıları Chediak-Higashi sendromu, Papillon-Lefèvre sendromu, tembel lökosit sendromu ve lökosit adezyon defektidir (Deas ve ark. 2003). Chediak-Higashi sendromu ve Papillon-Lefèvre sendromunda, nötrofillerde kemotaksis defekti vardır ve bu durumdan dolayı nötrofiller enfeksiyon bölgesine ulaşamamaktadır. Bu sendroma sahip hastalarda çok genç yaşta şiddetli ve hızlı bir şekilde periodontal kayıp meydana gelmektedir (Deas ve ark.2003, Hanna ve Etzioni 2012). Benzer olarak, lökosit adezyon defektinde nötrofil migrasyonu bozulmuştur. Bu hastalarda agresif periodontitis gelişmekte ve periodontal sebeple erken diş kayıpları görülmektedir. Down sendromlu bireylerde periodontitis prevalansı artmaktadır. Bu durumun, nötrofillerde görülen kemotaksis defekti ve azalmış bakterisidal aktiviteyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Lalwani ve ark. 2016). Fcγ-reseptör IIa (131H/H) polimorfizmine sahip bireylerde nötrofiller hiperreaktif fenotipe sahiptir ve nötrofillerden daha çok elastaz salgılanmaktadır. Bu bireylerde periodontal cep derinliğinin arttığı ve periodontal tedaviye verilen yanıtın azaldığı gösterilmiştir (Nicu ve ark. 2007). Aşırı miktarda ROT ile ilişkili hiperreaktif periferik nötrofil cevabı kronik periodontitiste de gösterilmiştir (Matthews ve ark. 2007). Yapılan bir çalışmada, anormal nötrofil fonksiyonu ile ilişkili şiddetli bir periodontal hastalık olan lokalize agresif periodontitiste nötrofil aşırı duyarlılığının doku hasarını arttırdığı görülmüştür. Lokalize agresif periodontitisli hastaların %70'inde nötrofil kemotaksisinde defekt olduğu ve nötrofillerin bakteriyel kemotaktiklere, sentetik kemotaktik peptidlere ve kompleman fragmanlara karşı azalmış kemotaksis gösterdiği bulunmuştur (Kantarıcı ve ark. 2003). Nötrofil kemotaksis ve/veya



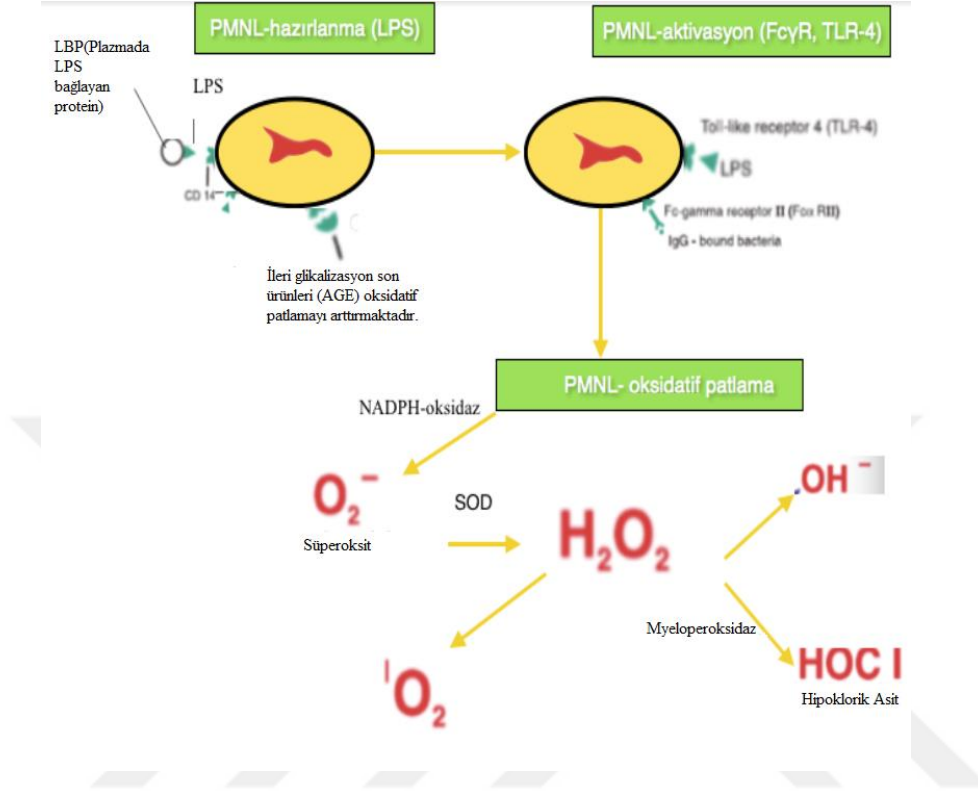
adezyonunda meydana gelen defektlerin konak yanıtında bozulmaya ve dental plakta bakteriyel çoğalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Van Dyke ve ark. 1990). Hızlı ilerleyen periodontitis hastalarında çeşitli kemotaktik defektlerin varlığı bu durumu desteklemektedir (Page ve ark. 1985, Astemborski ve ark. 1989). Hızlı ilerleyen periodontitise sahip sekiz hastadan izole edilen periferik nötrofillerde, bir adezyon molekülü olan L-selektin (CD62L) salınımının belirgin olarak azaldığı (Macey ve ark. 1998) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminin arttığı bulunmuştur (Gainet ve ark. 1999).

Nötrofillerin periodontal sağlığın korunmasında temel bir rolü olduğu net olarak söylenebilmektedir; ancak nötrofiller tarafından verilen kontrolsüz, artmış veya kalıcı enflamatuvar cevap kronik enflamatuvar hastalığı yönlendirmektedir (Preshaw ve ark.2015).

### **1.3.2. Nötrofiller ve ROT**

Nötrofillerin dişeti sulkusundaki önemli bir görevi periodontal patojenlerin ve hücre artıklarının fagositoz ile elimine edilmesidir. Nötrofillerde oksidatif patlama adı verilen reaksiyonlar zinciri ile ROT üretilmektedir (Şekil 1.3). Üretilen ROT'un direkt antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve fagositik vakuolde sindirim için elverişli çevre oluşturduğu bilinmektedir (Lee ve ark. 2003, Chapple ve Matthews 2007). Nötrofiller periodontal patojenleri hem oksijen bağımlı (oksidatif patlama) hem de oksijen bağımsız (litik ve proteolitik enzimler) mekanizmalar ile yok edebilmektedir. Kan dolaşımındaki nötrofiller sitokinler tarafından enfekte dokulara yönlendirildikten ve burada işgalci mikroorganizmalarla karşılaştıktan sonra, patojen mikroorganizma fagozom içine alınmaktadır. Fagozom içine alınan mikroorganizmanın yok edilebilmesi iki yolla mümkündür. İlk yol mikroorganizmanın oksijen bağımlı öldürülmesidir ve NADPH oksidaz tarafından ROT üretimi temeldir (Hampton 1998). Fonksiyonel NADPH oksidaz, ROT üretimi için gereklidir ve süperoksit anyonların üretimini katalizlemektedir (Scott ve Krauss 2012). Diğer yol, mikroorganizmanın oksijenden bağımsız öldürülmesidir. Nötrofilik granüller, fagozom ile kaynaşarak içeriğindeki antimikrobiyal peptit ve enzimleri boşaltmaktadır. Böylece

fagolizozom içindeki mikroorganizmalar yüksek konsantrasyonda ROT ve anti-mikrobiyal peptitler ile öldürülmektedir (Klebanoff1999).



Şekil 1.3. Nötrofillerde reseptör aracılı ROT üretimi (Chapple ve Matthews, 2007)

#### 1.4 Periodontal Hastalık ve ROT

Hipoksik periodontal ceplerde oksijenden bağımsız öldürme mekanizması oldukça kritik olsa da nötrofiller oksijen konsantrasyonunun %1-3 olduğu durumlarda dahi ROT üretebilme kapasitesine sahiptir (Scott ve Krauss 2012). Ancak yüksek reaktiviteye sahip ROT'un fazla miktarda üretilmesi ve/veya antioksidan mekanizmanın yetersiz kalması sonucu oluşan dengesizlik oksidatif stresi doğurmaktadır. Periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu ve fagositoz sırasında meydana gelen oksidatif patlamanın hastalık patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Chapple 1997). Periodontitiste meydana gelen doku hasarının, mikrobiyal dental plağa karşı cevap olarak üretilen nötrofilik enzimlerin ve ROT'un uzamış salınımindan kaynaklandığı düşünülmektedir (Chapple ve Mat-

thews 2007). Nötrofil hücre homeostazının sağlanması ile bu hücrelerin güçlü anti-mikrobiyal ve pro-enflamatuvar etkilerinden kaynaklanan konak doku hasarının önlenilebileceği öne sürülmüştür (Von Vietinghoff ve Ley 2008). Doku hasarı patogenezi üzerine yapılan çalışmalarda, periodontal doku hasarının olduğu alanlarda kronik veya artmış ROT üretimi saptanmıştır (Mettraux ve ark. 1984, Eggert ve ark. 1991). Yüksek reaktivite gösteren ROT protein ve DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımı gibi mekanizmalar yoluyla doku hasarına katkıda bulunmaktadır (Bartold ve ark. 1984, Chapple 1997, Özmeriç 2004). Ayrıca ROT, periodontal dokularda kollajen ve fibrinojen, fibronektin, laminin ve elastin gibi pek çok kollajen türevi peptidi yıkıma uğratabilmektedir (Scott ve Krauss 2012). Periodontal hastalıkta  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  gibi ROT'un osteoklastları aktive ettiği ve kemik rezorpsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Bax ve ark. 1992, Hall ve ark. 1995). ROT'un saptanmasındaki zorluklardan dolayı, pek çok çalışmada lipidler, DNA veya proteinler ile reaksiyonu sonucu oluşan ara ve/veya son ürünler değerlendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, DOS'ta ROT belirteci olan tiyobarbitürik asit ve pro-enflamatuvar bir sitokin olan IL-1 $\beta$  seviyelerinin periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ve cerrahi olmayan periodontal tedaviden sonra azaldığı bildirilmiştir (Tüter ve ark. 2001). Benzer olarak, cerrahi olmayan periodontal tedaviden sonra, malondialdehitin (MDA) hem tükürük, hem DOS seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Tsai ve ark. 2005). PMN tarafından NO üretimi enflame periodontal bölgelerde artmakta ve bu durum periodontitis ilerleyişine katkıda bulunmaktadır (Hirose ve ark. 2001). Kronik periodontitisli hastalarda farklı girişimlerin iNOS enzim düzeyi üzerine etkisini değerlendiren bir çalışmada, iNOS seviyesinin periodontal tedaviden sonra azaldığı gösterilmiştir (Güllü ve ark. 2005). Yapılan başka bir çalışmada, DNA üzerindeki oksidatif hasar 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) ile değerlendirilmiş ve 8-OHdG seviyesinin kronik periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Takane ve ark. 2001). Kronik periodontitiste tiyobarbitürik asit ve MDA seviyelerini araştıran bir çalışmada, sigara ile birlikte oksidatif türlerin arttığı bildirilmiştir (Pryor ve ark. 1990). Başka bir çalışmada, cerrahi olmayan periodontal tedavi gören sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli bireylerde 8-OHdG, 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi gibi ROT belirteçlerinin DOS, tükürük

ve serum seviyeleri araştırılmıştır. Önceki çalışmalara benzer olarak, 8-OHdG ve GSH-Px tükürük seviyelerinin periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre arttığı ve 4-HNE DOS seviyesinin sigara içen periodontitisli bireylerde en yüksek olduğu bulunmuştur. Periodontal tedaviden sonra periodontitisli bireylerde 8-OHdG'nin DOS seviyesi belirgin olarak azalmıştır (Hendek ve ark. 2015).

### 1.5. Sigaranın Nötrofiller Üzerine Etkisi

Sigara dumanı tar ve gaz olmak üzere iki ana faza sahiptir ve 7000 kimyasal içermektedir (Lu ve ark. 2003). Sigaranın pek çok zararlı etkisi bu kimyasalların akciğerlerden abzorbsiyonu yoluyla sigaraya sistemik maruziyet sonucu ortaya çıkmaktadır (Palmer ve ark. 2000).

Daha önce yapılan çalışmalarda, sigaranın sistemik dolaşımdaki nötrofil sayısını arttırdığı (Van Eeden ve Hogg 2000, Iho ve ark. 2003, Sorensen ve ark. 2004); ancak dişeti sulkusu ve ağız boşluğundaki nötrofil sayısını etkilemediği gösterilmiştir (Eichel ve Shahrik 1969). Sigaranın nötrofillerin kemotaksis yeteneğini doz bağımlı olarak etkileyebileceği öne sürülmüştür (Nowak ve ark. 1990). Bir çalışmada, yüksek doz nikotin (0.2 mg/kg) enjeksiyonundan sonra nötrofil kemotaksisinin azaldığı, daha düşük dozda (0.02 mg/kg) kemotaksisin arttığı gösterilmiştir (Gillespie ve ark. 1987). Başka bir çalışmada, sigara içen bireylerin periferik nötrofillerinde kemotaksis artmıştır (Sorensen ve ark. 2004). Yapılan bir çalışmada, sigara içen bireylerde nötrofillerin fagositoz fonksiyonunun hasar gördüğü gösterilmiştir (Zappacosta ve ark. 2001, Guntsch ve ark. 2006). Nötrofiller sigara dumanı içindeki nikotin ve kotonin gibi pek çok bileşen için fonksiyonel reseptör taşımaktadır (Benhammou ve ark. 2000). Sigara içenlerde nötrofiller tarafından eksprese edilen nikotinic reseptör sayılarının arttığı bildirilmiştir (Lebargy ve ark 1996). Nötrofiller periodontal doku hasarında elastaz ve MMP'lerin majör kaynağı olarak kabul edilmektedir (Soder ve ark. 2002, Persson ve ark. 2003). Sigaranın nötrofillerden NE ve MMP salınımını arttırdığı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (Seow ve ark. 1994, Seagrave ve ark. 2004). Sigara içen bireylerde de NE ve MMP seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Nakamura ve ark. 1998, Van Eeden ve Hogg 2000).

Sonuç olarak, sigara nötrofillerin pek çok fonksiyonunu etkilemekte ve dengenin daha yıkıcı yöne kaymasına neden olmaktadır (Palmer ve ark. 2005).

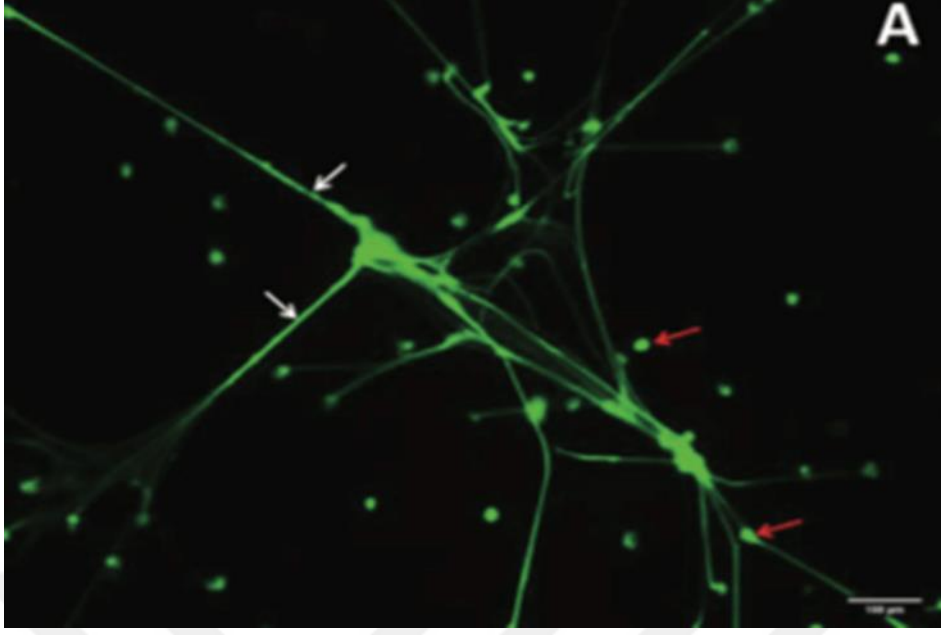
## 1.6. Sigara ve ROT

Sigara dumanı özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>- gibi ROT bakımından oldukça zengindir (Pryor ve Stone 1993, Valavanidis ve ark. 2009). Sigara içildiğinde bir nefeste tar fazda 10<sup>14</sup> ve gaz fazda 10<sup>15</sup> radikal içermektedir (Pryor ve ark. 1983). Sigara, içerdiği pek çok kimyasal yoluyla direkt veya indirekt olarak aşırı ROT üretimine neden olmakta ve bu durum oksidatif stresi doğurmaktadır (Pryor ve ark. 1990, Palmer ve ark. 2005, Garg ve ark. 2006). Sigaranın nötrofil kaynaklı IL-8 ve ROT üretimini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Gillespie ve ark. 1987, Iho ve ark. 2003). Sigara ile ilişkilendirilmiş kardiyovasküler hastalıklarda, sigaranın ROT üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (Burke ve Fitzgerald 2003, Yamaguchi ve ark. 2005). Periodontitisli bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada, periodontal hastalıkta oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasındaki dengenin bozulduğu ve enflamasyonlu bölgelerde ROT'un daha fazla olduğu gösterilmiştir (Tsai ve ark. 2005). Sigara, enflamasyon sırasında ROT üretimini uyarmaktadır (Anderson 2001, Palmer ve ark. 2005). Sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda, ROT seviyesinin periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu ve sigara içen kronik periodontitisli bireylerde sigara içmeyenlere göre ROT seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Guentsch ve ark. 2008, Aziz ve ark. 2013). Diğer yandan, sigaranın ROT üzerinde etkisini araştıran bir çalışmada, sigaranın gaz fazının nötrofil NADPH oksidazı baskıladığı gösterilmiştir (Nguyen ve ark. 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise, sigara dumanı ekstraktı (CSE)'ye maruz bırakılan nötrofillerde oksidatif patlamanın baskılandığı ve nötrofilin fagositoz kabiliyetinin azaldığı bildirilmiştir (Zappacosta ve ark. 2001).

Özet olarak, ROT üretiminin sigara ile arttığı ve artmış ROT üretiminin periodontal hastalık patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Gustafsson ve ark. 2000).

## 1.7 NET Oluşumu

2004 yılında Brinkmann tarafından, nötrofillerin hücre dışı savunma mekanizması olan NET keşfedilmiştir (Brinkmann ve ark. 2004). NET, IL-8, PMA veya lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan nötrofiller tarafından üretilmektedir. NET, majör yapısal komponenti DNA olan ve üzerinde histonlar, NE, MPO, katepsin G, lizozim gibi antimikrobiyal proteinler içeren ağısı yapıdır (Şekil 1.4). Bu yapılar, Gram (+) ve (-) bakterilere bağlanarak bakteriyi hapsetmekte ve üzerindeki antimikrobiyal proteinler ile öldürmektedir (Scott ve Kraus, 2012, Delgado-Rizo ve ark. 2017) (Şekil 1.5). Bu süreci başlatan, hücrenin NADPH oksidaz tarafından üretilen ROT ile aktivasyonudur (Fuchs ve ark. 2007, Wang ve ark. 2009, White ve ark. 2016). Fuchs ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, NADPH oksidaz aktivasyonu ve ROT üretiminin NET oluşumu (NETozis) için temel olduğu öne sürülmüş ve NADPH oksidaz, difenil iyodonyum (DPI) ile inhibe edildiğinde NET oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (Fuchs ve ark. 2007). ROT, NET oluşumu sırasında ikinci haberci gibi davranarak nükleer membranın kademeli olarak ayrılmasına ve tamamen kaybolmasına neden olmaktadır. Daha sonra kromatin, sitoplazmaya geçerek burada hücre içi proteinler ve granüler enzimler ile karışmakta ve son olarak hücre membranında oluşan deliklerden geçerek hücre dışına salınmaktadır (Delgado-Rizo ve ark. 2017). Nötrofillerin IL-8, LPS veya PMA ile uyarılması ile NET oluşumu meydana gelmektedir (Brinkmann ve ark. 2004). Fuchs ve ark. (2007), nötrofilleri PMA ile uyarılmış ve meydana gelen morfolojik değişimleri faz kontrast mikroskobu ile gözlemlemiştir. Bu değişiklikler, çekirdeğin karakteristik lobüler formunun kaybolmasıyla başlayan belirli bir süreci izlemektedir. Eş zamanlı olarak, ökromatin ve heterokromatin arasındaki ayırım ortadan kalkmaktadır. Bu noktada nükleer membranlar birbirinden ayrılmaya başlamakta; ancak sitoplazma ve organelerin morfolojisi bozulmamaktadır. Daha sonra, nükleer membran veziküller halinde parçalanmakta ve granüler membranlar kaybolmaktadır. Böylece nükleer, sitoplazmik ve granüler komponentler karışmaktadır. Bu süreç boyunca hücre membranı bozulmamakta ve yalnızca NET salınımına izin vermek için kırılmaktadır (Fuchs ve ark. 2007).



Şekil 1.4. Sytox Green DNA boyası ile boyanmış NET'in fluoresan görüntüsü (White ve ark. 2016)

Enflamasyonun rezolüsyonu aktif bir süreç olarak kabul edilmektedir. Dokularda sağlığın tekrar kazanılabilmesi için nötrofillerin apoptoza uğraması veya makrofajlar tarafından elimine edilmesi oldukça önem taşımaktadır. Yetersiz rezolüsyon kronik enflamasyona ve doku yıkımında artışa sebep olmaktadır (Van Dyke ve Serhan 2003, Çekici ve ark. 2014).

Nötrofil homeostazının sağlanması apoptoz ve NETozis arasındaki dengeye bağlıdır. Apoptozun anti-enflamatuvar etkileri vardır; ancak NET, oto-antijenlerin üretilmesi, IL-1 $\beta$  ve interferon  $\alpha/\beta$  (IFN  $\alpha/\beta$ )'nin uyarılması ve degrade edici enzimlerin varlığı gibi pro-enflamatuvar etkilere sahiptir (Cooper ve ark. 2013, Mayadas ve ark. 2014). Artmış NET oluşumunun birçok enflamatuvar hastalığın patogenezinde rol oynadığı ve patolojik durumlarda NET salınımının şiddetli doku hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Remijsen ve ark. 2011, Cooper ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada, alevlenme dönemindeki KOAH hastalarının balgamında büyük miktarda NET varlığı gösterilmiştir (Grabcanovic-Musija ve ark. 2015). Benzer olarak kronik enflamatuvar bir hastalık olan aterosklerozda, aterosklerotik lezyona sahip kan damarı sayısı ile NET belirteçlerinden MPO/DNA'nın korele olduğu bildirilmiştir (Borissoff ve ark. 2013). RA'lı bireylerin dolaşım ve sinovial sıvı

nötrofillerinde sağlıklı kontrollere kıyasla artmış NET oluşumu bildirilmiştir (Thomas ve ark. 2012, Khandpur ve ark. 2013).

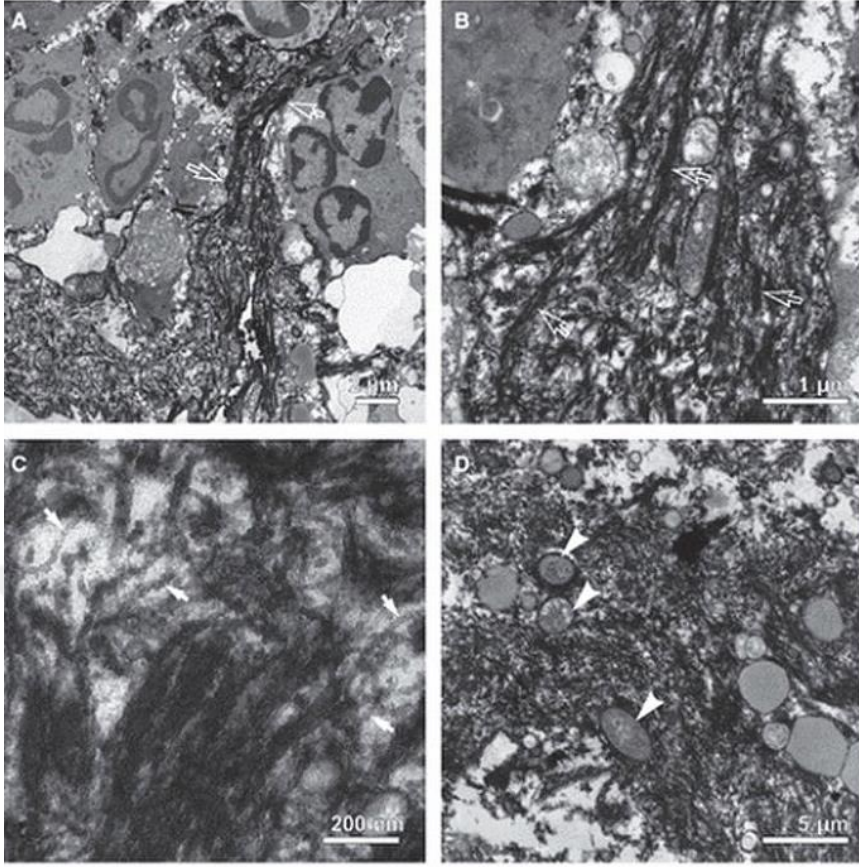
Diğer enflamatuvar hastalıklara benzer olarak periodontal hastalıkta, ROT bağımlı gerçekleşen NET üretiminin artabileceği öne sürülmüştür (Cooper ve ark. 2013). Kronik periodontitisli bireylerde NET üzerine yapılan bir çalışmada, dişetinin enflamasyonlu bölgelerinde NET varlığı gösterilmiştir (Vitkov ve ark. 2009). Bundan dolayı, periodontal doku hasarının artmış NET üretimi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Kolaparthi ve ark. 2014). Başka bir çalışmada, dental biyofilm içinde nötrofil ve NET saptanmıştır. Buna ek olarak, dental biyofilmdeki bakteri türlerinin hastalardan izole edilen nötrofillerde NET oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Hirschfeld ve ark. 2015).

Periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıklarda;

- Aşırı veya fonksiyonel olmayan NET üretiminin,
- Bakterilerin tuzaktan kaçabilme yeteneğinin,
- Enflamasyon sonrası ortadan kaldırılmamış NET varlığının doku hasarına sebep olabileceği öne sürülmüştür (Cooper ve ark. 2013, White ve ark. 2016).

Literatürde NET'lerin enflamatuvar hastalıkların patogenezinde oynadığı rol oldukça yenidir. Nötrofillerin bu savunma mekanizmasının, sigara içen periodontitisli bireylerde sigara tarafından nasıl etkilendiği daha önce araştırılmamıştır.





**Şekil 1.5.**Periodontitiste nötrofil hücre dışı tuzaklar. (A) Cep epitelinde NET görüntüsü(B) Detaylı görüntü (C) Büyütmede NET yapılarındaki yaklaşık 15-17 nm çapındaki kalın lifler görüntülenmiştir. (D) NET içinde hapsolmuş bakteriler (Scott ve Krauss 2012)

Çalışmamızın amacı;

- Sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli bireylerde NET oluşumunu ölçmek ve karşılaştırmak,
- Ölçülen NET miktarının klinik parametreler ile korelasyonunu ortaya koymaktır.

Çalışmamızın hipotezi;

- Sigara içen kronik periodontitisli bireylerde NET oluşumunun sigara içmeyen kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylere göre daha yüksek olacaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Çalışma Materyali

Katılımcılar Ekim 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji kliniğine başvuran hastalar arasından seçilmiştir. Çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgilendirilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden katılımcılardan yazılı olarak aydınlatılmış onamları alınmıştır. Çalışmamız için Kırıkkale Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilmiş etik ilkelere uygun olduğuna dair karar verilmiştir (Toplantı Tarihi: 24.10.2017; Karar No: 19/02)( Ek-1). Çalışma akış şeması Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

### 2.2. Katılımcıların Seçilmesi

Çalışmaya sistemik olarak sağlıklı, 30-60 yaş arasında 21 birey dahil edilmiştir. Sigara içen bireyler için en az 10 yıldır, günde 10 ve daha fazla sigara içen bireyler dahil edilirken, sigara içmeyen gruplar için hiç sigara içmemiş bireyler dahil edilmiştir (Wan ve ark. 2009).

#### Dahil etme kriterleri;

- 30-60 yaş arası
- Sistemik olarak sağlıklı bireyler

#### Periodontitisli bireyler için;

- Kökün apikal üçlüsüne ilerlemiş derin periodontal lezyonlar veya çoklu diş kayıpları
- İnterdental alanda 5 mm veya daha fazla KAK
- Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan radyografik kemik kaybı
- Periodontitis sebebiyle en az 5 diş kaybedilmiş olması

- Hastaların çiğneme fonksiyonunun kaybı, sekonder okluzal travma, şiddetli kret defekti gibi nedenlerden dolayı kapsamlı tedaviye ihtiyacı
- Sigara içen bireylerin en az 10 yıldır, günde 10 veya daha fazla sigara içmesi
- Sigara içmeyen bireylerin hiç sigara içmemiş olması

#### Hariç bırakma kriterleri:

- Periodontal sağlığı etkileyebilecek sistemik hastalığa sahip olması (diyabet, kantitatif ve/veya kalitatif polimorfonükleer nötrofil defektleri, diğer bağışıklık sistem bozuklukları)
- Son 3 ay içinde antibiyotik kullanmış olması
- Son 6 ay içinde periodontal tedavi görmüş olması
- Hamilelik ve laktasyon döneminde olması

Dahil etme kriterlerini sağlayan katılımcılar üç gruba ayrılmıştır:

1. Grup: Sigara içmeyen ve periodontal olarak sağlıklı bireyler (n=7) (S-P-) (Şekil 2.1)
2. Grup: Sigara içmeyen ve periodontitisli bireyler (n=7) (S-P+) (Şekil 2.2)
3. Grup: Sigara içen ve periodontitisli bireyler (n=7) (S+P+) (Şekil 2.3)

### **2.3. Periodontal Değerlendirme**

Çalışmaya katılan tüm bireylerin periodontal klinik muayeneleri yapılmıştır. Klinik muayene sırasında katılımcıların tüm ağız Pİ, Gİ, SD ve KAS ölçümleri yapılmıştır. Her dişin altı bölgesinden (bukkal ve palatinal bölgelerde mezial, median ve distal noktalar) SD ve KAS; her dişin dört bölgesinden (bukkal ve palatinal bölgelerde mezial ve distal noktalar) Pİ ve Gİ değerlendirilmiştir. Ölçümler sırasında Williams periodontal sondu (Hu-Friedy, Chicago, ABD) kullanılmıştır.

Plak değerlendirmesi amacıyla, Silness ve Loe'nin (1964) Pİ kullanılmıştır. Bu indekse göre;

0: Plak yok.

1: Dişeti kenarında sond yardımıyla tespit edilebilecek ince bir plak tabakası mevcut.

2: Dişeti kenarında göz ile tespit edilebilecek orta derecede plak mevcut.

3: Dişeti kenarında oldukça fazla miktarda plak mevcut.

$Pİ = \frac{\text{Tüm dişlerdeki plak indeksi değerlerinin toplamı}}{(\text{Ağızdaki mevcut diş sayısı} \times 4)}$

Dişetindeki enflamasyonu değerlendirmek amacıyla, Löe ve Silness'in (1963) Gİ kullanılmıştır. Bu indekse göre;

0: Dişeti normal; enflamasyon, renk değişimi ve kanama yok.

1: Hafif derecede enflamasyon, renk ve yüzey değişimleri mevcut ancak kanama yok.

2: Orta derecede enflamasyon, kızarıklık, ödem ve sondlamada kanama mevcut.

3: Şiddetli enflamasyon, ileri derecede kızarıklık ve ödemin yanı sıra spontan kanama eğilimi mevcut.

$Gİ = \frac{\text{Tüm dişlerdeki gingival indeks değerlerinin toplamı}}{(\text{Ağızdaki mevcut diş sayısı} \times 4)}$

Mine sement sınırından sulkus tabanına kadar olan mesafe klinik ataçman seviyesi olarak kaydedilmiştir.

$SD = \frac{\text{Tüm dişlerin sondlama derinliği toplamı}}{(\text{Ağızdaki mevcut diş sayısı} \times 6)}$

Sondlama derinliğine dişeti kenarı ve mine sement sınırına kadar olan mesafe eklenerek klinik ataçman seviyesi hesaplanmıştır.

$KAS = \frac{\text{Tüm dişlerin klinik ataçman seviyesi}}{(\text{Ağızdaki mevcut diş sayısı} \times 6)}$

Tüm periodontal klinik değerlendirmeler hazırlanan hasta formlarına kaydedilmiştir (Ek-2).



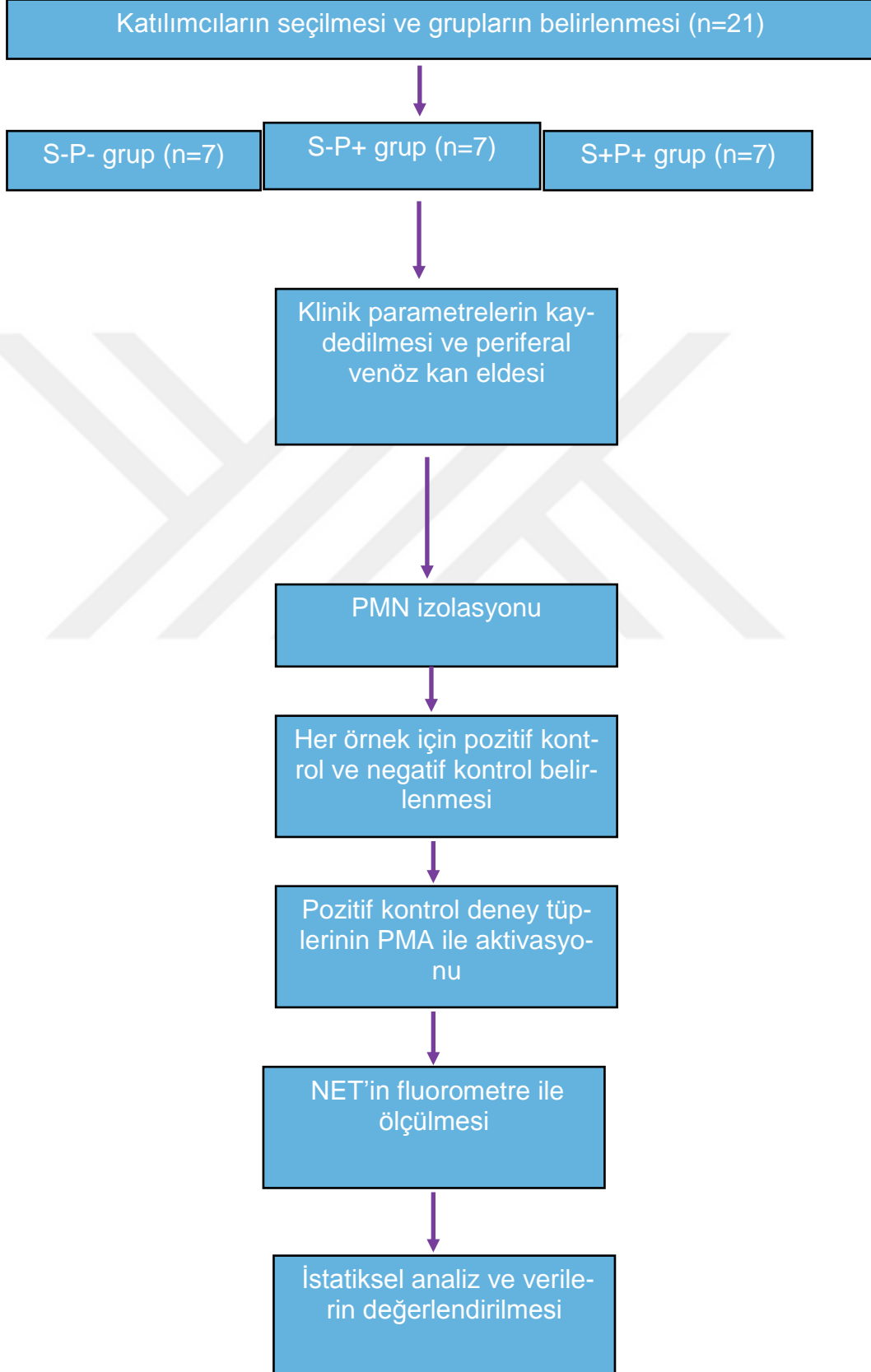
Şekil 2.1. Sigara içmeyen ve periodontal olarak sağlıklı bir bireyin ağız içi görüntüsü



Şekil 2.2. Sigara içmeyen ve evre IV periodontitisli bir bireyin ağız içi görüntüsü



Şekil 2.3. Sigara içen ve evre IV periodontitisli bir bireyin ağız içi görüntüsü



Şekil 2.4.Çalışma akış şeması

## **2.4. Katılımcılardan Periferal Venöz Kan Eldesi**

Periodontal muayenelerin tamamlanmasından sonra çalışmaya katılan tüm bireylerin antekubital fossalarından,etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tam kan tüpü ve steril enjektör ucu kullanılarak 5 ml periferal venöz kan örneği elde edilmiştir.

## **2.5. Laboratuvar Aşamaları**

Katılımcılara ait venöz kan örneklerinden PMN izolasyonu ve analizler Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan İmmunoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma için gerekli tüm solüsyonlar ve deneyler tip 2 biyogüvenlik kabini (Nüve MN120, Türkiye) içinde steril ortamda hazırlanmıştır (Şekil 2.5).

### **2.5.1.Çalışmada Kullanılacak Solüsyon ve Boyaların Hazırlanması**

#### **2.5.1.1. Percoll Solüsyonlarının Hazırlanması**

Çalışma kapsamında %72'lik, %63'lük, %54'lük ve % 45'lik Percoll (Sigma-Aldrich, ABD) dilüsyonları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:



Şekil 2.5. Tip 2 biyogüvenlik kabini (Nüve MN120, Türkiye)

Tablo 2.1. Percoll dilüsyonlarının hazırlanması

<p><u>%72'lik Percoll dilüsyonu:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> 5,04 ml Percoll stok solüsyonu</li><li><input type="checkbox"/> 1,4 ml 1x HBSS</li><li><input type="checkbox"/> 560 µl 10x HBSS</li></ul>	<p><u>%63'lük Percoll dilüsyonu:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> 4,41 ml Percoll stok solüsyonu</li><li><input type="checkbox"/> 2,1 ml 1x HBSS</li><li><input type="checkbox"/> 490 µl 10x HBSS</li></ul>
<p><u>%54'lük Percoll dilüsyonu:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> 3,78 ml Percoll stok solüsyonu,</li><li><input type="checkbox"/> 2,8 ml 1x HBSS</li><li><input type="checkbox"/> 420 µl 10x HBSS</li></ul>	<p><u>%45'lik Percoll dilüsyonu:</u></p> <ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> 3,15 ml Percoll stok solüsyonu,</li><li><input type="checkbox"/> 3,5 ml 1x HBSS</li><li><input type="checkbox"/> 350 µl 10x HBSS</li></ul>



### **2.5.1.2.PMA Hazırlanması**

1 vial (5 mg) PMA (Fluorochem, İngiltere) 806 µl dimetil sülfoksit (DMSO) içine alınarak konsantrasyonu 10 mM olan stok hazırlanmıştır. Çalışma yapılmadan bir saat önce stoktan 10 µl PMA alınarak 90 µl DMSO ile karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışımdan 10 µl alınarak üzerine 990 µl Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) eklenmiştir. Çalışma esnasında pleytin her bir gözüne konsantrasyonu 2 µl hacimde PMA eklenmiştir.

### **2.5.1.3. Mikrokokal Nükleaz (Mnaz) Hazırlanması**

Mnaz hazırlanması için toplam hacim 100 µl olacak şekilde; 88 µl steril ultra saf su (USS) içine kitin içinden çıkan (NEB, İngiltere) Buffer solüsyondan 10 µl, sığır serum albümin (BSA) solüsyonundan 1 µl ve Mnaz'dan 1 µl eklenmiş ve karıştırılmıştır. Her bir kuyucuk için enzimden 10 µl kullanılmıştır.

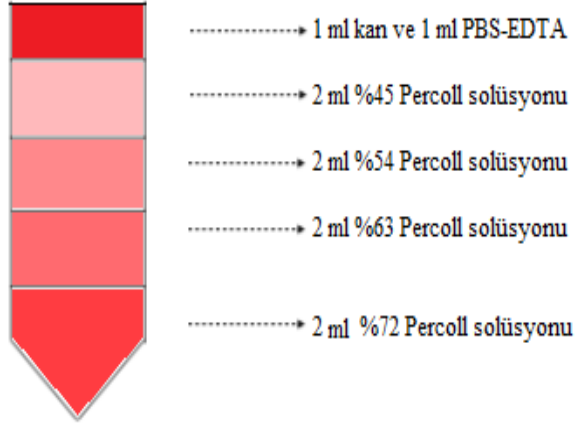
### **2.5.1.4. Sytox Orange Boyanın Hazırlanması**

Sytox orange stok solüsyonundan (Sigma-Aldrich, ABD) alınan 1 µl boya solüsyonu 9 µl steril USS ile karıştırılmıştır. Hazırlanmasını takiben ışıktan korunmuştur. Her bir kuyucuk için hazırlanan boya dilüsyonundan 1 µl kullanılmıştır.

## **2.6. Periferel Venöz Kandan PMN İzolasyonu**

Sürsal ve ark. (2018)'nin da belirttiği gibi katılımcılardan elde edilen venöz kan 1:1 oranında fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS)-EDTA ile sulandırılmıştır. Daha sonra % 72, 63, 54 ve 45'lik Percoll dilüsyonları kullanılarak 15 ml hacme sahip steril Falcon tüp içinde tabakalandırılmıştır. Bu tabakalandırma esnasında Percoll dilüsyonlarından alınan ikişer ml hacim (yoğundan başlayarak, sırasıyla %72,

63, 54 ve 45'lik) dikkatlice tüpe yerleştirilmiş ve en üste PBS-EDTA (Sigma-Aldrich, ABD) ile sulandırılmış kan örneği yerleştirilmiştir (Şekil 2.6).

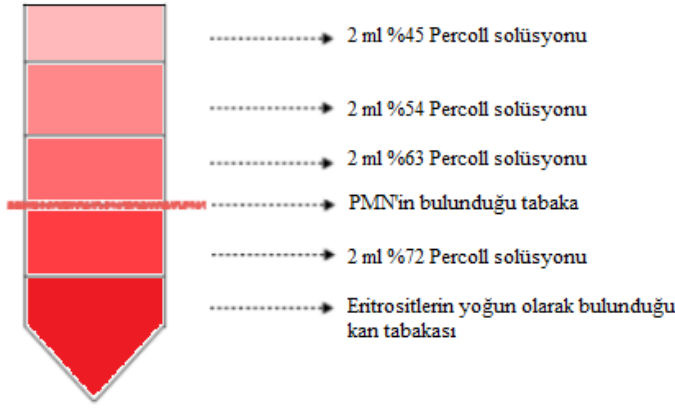


Şekil 2.6. Santrifüjden önce tüp içindeki tabakalar

Bu işlemi takiben tüpler 500xg, 22°C, 35 dk, frensiz şekilde santrifüj edilmiştir (Thermo Scientific, ABD) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Santrifüj cihazı (Thermo Scientific, ABD)



Şekil 2.8.Santrifüjden sonra tüp içindeki tabakalar

İnsan PMN'i santrifüj sonunda tüpte %72 ve 63'lük Percoll dilüsyonlarının arasında bulutumsu tabaka olarak izlenmiştir (Şekil 2.8). Bu tabaka steril Pasteur pipetleri ile dikkatlice çekilerek 15 ml steril Falcon tüplerine aktarıldıktan sonra tüplere 10 ml 1x HBSS (Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. Tüpler daha sonra 300xg, 4°C, 10 dk, frenli şekilde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücreler tüpün altında yoğunlaşmıştır; ancak tüpün altındaki hücrelerin bulunduğu tortu içinde PMN'in yanı sıra bir miktar eritrosit de gözlenmiştir. Eritrositleri yok etmek ve yalnızca çalışma yapacağımız PMN'leri bırakmak amacıyla tüpe 10 ml USS eklenmiş ve tüpe hafifçe vurulmuştur. 30 sn sonra 1 ml 10x HBSS (Sigma-Aldrich, ABD) eklenerek ozmotik molarite düzenlenmiştir. Daha sonra 300xg, 4°C, 10 dk, frenli şekilde santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası tüpün en altında hücrelerin oluşturduğu tortu izlenmiştir. Tüpün üstündeki tabakalar atılarak tüpün altında tortunun bulunduğu 1 ml'lik kısım bırakılmış ve üzerine hücrelerin beslenmesini sağlayan RPMI-1640 solüsyonundan 10 ml eklenmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

## 2.7. PMN'in Sayılması

PMN'nin büyük çoğunluğunu nötrofiller oluşturmaktadır. Nötrofillerin yanı sıra eozinofil ve bazofil de izole edilen bölümde az miktarda yer alabilmektedir. Bu sebeple PMN teriminden kasıt 'nötrofil' olmaktadır. PMN süspansiyonundaki hücre sayısını belirlemek için santrifüj sonrası hücre stoğundan otomatik pipet yardımıyla

10 µl örnek alınmış ve 90 µl RPMI-1640 ile sulandırılmıştır. Bu sulandırmadan 10 µl alınarak Neubauer hücre sayım kamarasında incelenmiştir. Her biri 16 karecikten ve toplam dört büyük kareden oluşan kamaradaki PMN'ler ışık mikroskobu (Leica DM 750, Almanya) kullanılarak sayılmış ve ortalaması alınmıştır. 1 ml insan kanından izole edilen toplam PMN sayısı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma oranı} \times 10^4 = \text{Toplam PMN sayısı /ml}$$

## **2.8. PMN'in Canlılık Oranının Tespiti**

Elde edilen PMN'in canlılık oranının belirlenmesinde Trypan blue solüsyonu (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Hücre stok solüsyonundan alınan 10 µl örnek 10 µl Trypan blue solüsyonu ile karıştırılmış ve daha sonra Neubauer hücre sayım kamarası içine alınmıştır. Işık mikroskobunda boya alan ve böylelikle mavi renkte görünen hücreler ölü, almayanlar canlı olarak değerlendirilmiştir. Tüm hücreler (canlı ve ölü) sayılarak toplam hücre sayısı içinde ölü hücrelerin oranı % olarak hesaplanmıştır.

## **2.9. İzole Edilen PMN'in İçinde Nötrofil Oranının Belirlenmesi**

Bu amaçla izole edilen hücre stoğundan alınan örnekler lam üzerine yayılarak hava ile kurutulmuş, daha sonra metil alkol kullanılarak tespit edilmiştir. Lam üzerindeki hücreler Diff-Quick boya (Bio Optica, İtalya) ile boyanmıştır. Boyalı örnekler immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskobunda sayılmıştır. Nötrofiller, soluk pembe sitoplazmaya ve koyu mavi renkte parçalı çekirdek yapısına sahip hücreler olarak mikroskopta gözlenmiştir. Bir mikroskop sahasında mevcut toplam hücrenin içinde ortalama nötrofil oranı % olarak tespit edilmiştir.

## 2.10. Nötrofillerin PMA ile Aktivasyonu

Her bir bireyin venöz kan örneğinden elde edilen PMN stok solüsyonu RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu kullanılarak  $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$  oranında sulandırılmıştır. Bu PMN sulandırmasından alınan  $100 \mu\text{l}$  örnek steril reaksiyon tüpleri içerisine yerleştirilmiştir. Her birey için bu şekilde iki reaksiyon tüpü hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak seçilen reaksiyon tüpüne NET aktivasyonunu sağlayan  $2 \mu\text{l}$  PMA (25 nM) (Fluorochem, İngiltere) eklenmiş, diğer tüp negatif kontrol olarak bırakılmıştır. Reaksiyon tüpleri %5'lik  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde (Nüve EC160, Türkiye)  $37^\circ\text{C}$ 'de 60 dk süre inkübe edilmiştir (Şekil 2.9). İnkübasyon sonunda reaksiyon tüplerine  $10 \mu\text{l}$  Mnaz (NEB, İngiltere) eklenerek aynı koşullarda 15 dk daha inkübasyona devam edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler  $300 \times g$ ,  $17^\circ\text{C}$ , 7 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar immunpleytin (Nunc Thermo Scientific, ABD) gözlerine aktarılmıştır.



Şekil 2.9. İnkübatör cihazı (Nüve EC160, Türkiye)

## 2.11. NET Oluşumunun Niceliksel Olarak Değerlendirilmesi

İmmunpleyitin gözlerine ekstrasellüler DNA boyası Sytox orange 1 µl eklenmiş ve hücreler 5 dk süre karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra immunpleyt fluorometre cihazına yerleştirilmiş (Fluorocan Ascent FL Thermo Scientific, ABD) ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan ekstrasellüler DNA'nın şekillendirdiği floresan düzeyi ölçülmüştür (355 nm excitasyon/460 nm emisyon) (Şekil 2.10). Deneyde hiçbir işleme tabi tutulmamış PMN, negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.10. Fluorometre cihazı (Fluorocan Ascent FL Thermo Scientific, ABD)

## 2.12. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler için sayısal değişkenlerde ortanca ve en küçük – en büyük değerleri, kategorik değişkenlerde ise sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. Bağımsız gruplar arasında fark olup olmadığını incelemeye Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli farklılık bulunduğu durumda, farklılık yaratan grubu belirlemek için ikili karşılaştırmalar testi kullanılmıştır. Bağımsız iki örneklem testi arasın-

da Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Bağımlı gruplar arasında fark olup olmadığı ise Wilcoxon testi ile incelenmiştir. Sayısal değişkenler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını incelemeye Pearson/Spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak alınmıştır. Analizler SPSS v.21 kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada örneklem sayısının yeterliliği güç (power) analizi ile belirlenmiştir. Yapılan hipotez testleri için testin anlam düzeyi  $\alpha = 0.05$ , güç = 0.90, etki büyüklüğü = 0.8 için her grupta 7 birey olmak üzere toplam 21 deneyin yeterli olduğu GPower bilgisayar programında görülmüştür.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çalışma Popülasyonu ve Demografik Veriler

Çalışmaya toplam 21 birey [(S-P-) 7 birey; (S-P+) 7 birey; (S+P+) 7 birey] katılmıştır. Katılımcıların 9'u kadın 12'si erkektir. Analizler sonucunda cinsiyetin gruplar arasında homojen olduğu görülmüştür ( $p=0,853$ ).

Gruplar arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p=0,045$ ). Farklılık yaratan gruplar incelendiğinde, S-P- ve S-P+ gruplarda bulunan bireylerin yaşları arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir ( $p=0,040$ ). Bireylere ait yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Bireylere ait yaş (ortanca, min-max) ve cinsiyet dağılımı (yüzde)

		S-P- (n=7)	S-P+ (n=7)	S+P+ (n=7)	p
Cinsiyet	Kadın	4 (57.1)	2 (28.6)	3 (42.9)	0,853
	Erkek	3 (42.9)	5 (71.4)	4 (57.1)	
Yaş		31 [30-53] <sup>a</sup>	43 [36-60] <sup>b</sup>	38 [30-54] <sup>a,b</sup>	0,040

<sup>a,b</sup>: harflerin farklı olması o iki grupta farklılığı göstermektedir.

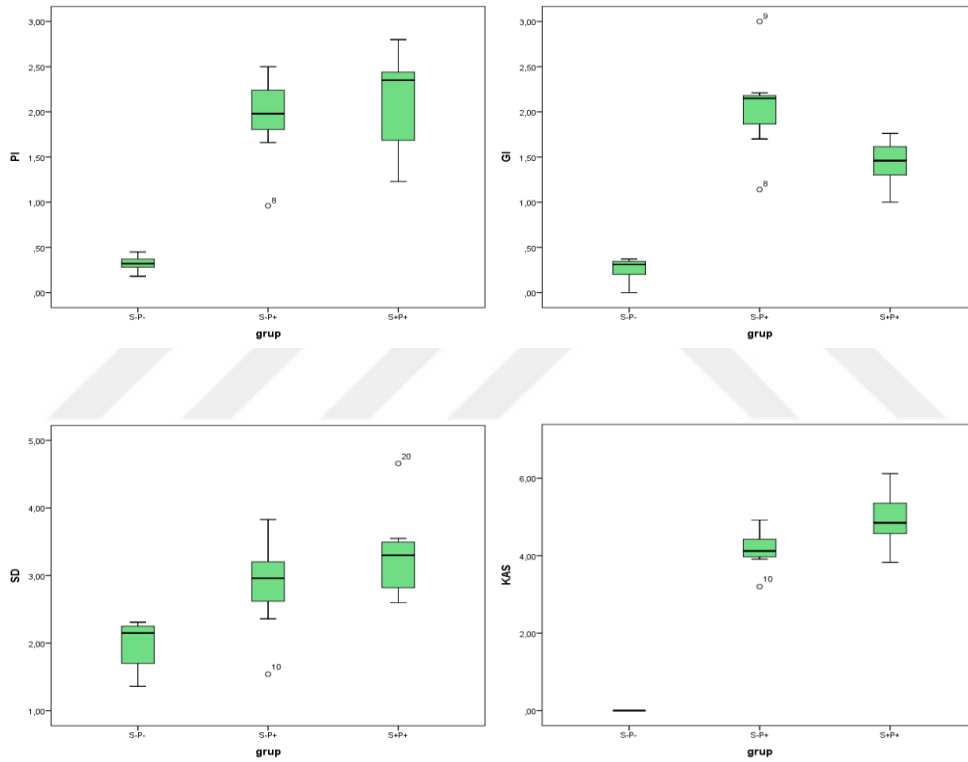
#### 3.2. Klinik Periodontal Parametreler

Gruplar arasında Pİ, Gİ, SD ve KAS değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p=0,001$ ;  $p<0,001$ ;  $p=0,003$ ;  $p<0,001$ ). Tüm değerler açısından farklılık yaratan grubun S-P- grup olduğu görülmektedir. Bu grupta Pİ, Gİ,



SD ve KAS değerleri diğer gruplara göre daha düşüktür. Bu farklılık sırasıyla S-P+ ve S+P+ grupları için;

- Pİ değerleri açısından  $p=0,012$  ve  $p=0,002$ ;
- Gİ değerleri açısından  $p= 0,000$  ve  $p=0,042$ ;
- SD değerleri açısından  $p=0,048$  ve  $p=0,003$ ;
- KAS değerleri açısından  $p= 0,025$  ve  $p=0,000$ 'dir (Grafik 3.1) (Tablo 3.2).



Şekil 3.1. Grupların klinik parametrelere göre kutu çizgi grafikleri

Tablo 3.2. Klinik değişkenlerin gruplarda karşılaştırılması (ortanca, min-max)

	S-P- (n=7)	S-P+ (n=7)	S+P+ (n=7)	p
--	---------------	---------------	---------------	---

<b>Pİ</b>	0.32 [0.18–0.45] <sup>a</sup>	1.98 [0.96–2.50] <sup>b</sup>	2.35 [1.23-2.80] <sup>b</sup>	0,001
<b>Gİ</b>	0.31 [0 – 0.37] <sup>a</sup>	2.15 [1.14-3] <sup>b</sup>	1.46 [1-1.76] <sup>b</sup>	<0,001
<b>SD</b>	2.15 [1.36-2.31] <sup>a</sup>	2.96 [1.54-3.83] <sup>b</sup>	3.3 [2.60- 4.66] <sup>b</sup>	0,003
<b>KAS</b>	0 [0 – 0] <sup>a</sup>	4.12 [3.20-4.92] <sup>b</sup>	4.85 [3.83-6.12] <sup>b</sup>	<0,001

<sup>a,b</sup>: harflerin farklı olması o iki grupta farklılığı göstermektedir.

Pİ: Plak İndeksi, Gİ: Gingival İndeks, SD: Sondlama Derinliği, KAS: Klinik Ataçman Seviyesi

### 3.3. PMN Hücre Sayıları

S-P- ve S+P+ gruplar arasında hücre sayısı açısından fark vardır; ancak bu fark istatistiksel olarak sınırda bulunmuştur (p=0,05) (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3.**PMN hücre sayılarının gruplarda karşılaştırılması (ortanca, min-max)

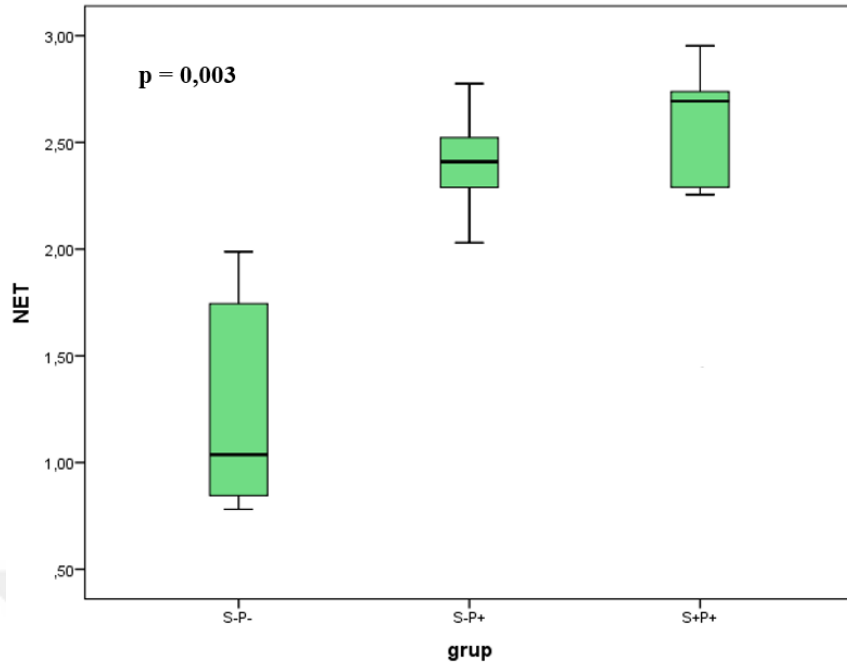
	<b>S-P-</b> <b>(n=7)</b>	<b>S-P+</b> <b>(n=7)</b>	<b>S+P+</b> <b>(n=7)</b>	<b>P</b>
<b>Hücre Sayısı</b> <b>(10<sup>3</sup>)</b>	1280 [700-1800] <sup>a</sup>	1400 [600-3000] <sup>a,b</sup>	2100 [1000-4000] <sup>b</sup>	0,050

<sup>a,b</sup>: harflerin farklı olması o iki grupta farklılığı göstermektedir.

### 3.4. NET'in Niceliksel Analizi

PMA ile aktive edilen (pozitif kontrol) ve edilmeyen (negatif kontrol) nötrofil-lerden elde edilen NET miktarları karşılaştırıldığında, negatif kontrol değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ( $p=0,009$ ). Farklılık yaratan grubun S-P- grup olduğu görülmektedir. S-P- grupta negatif kontrol değerleri daha düşüktür. Pozitif kontrol (NET) değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmaktadır ( $p=0,003$ ). Farklılık yaratan grubun S-P- grup olduğu görülmektedir. S-P- grupta NET miktarı daha düşük bulunmuştur. S-P- grup, hem S-P+ hem S+P+ gruplardan farklılık göstermiştir ( $p=0,013$  ve  $p=0,006$ ) (Grafik 3.2) (Tablo 3.4).

Periodontitisli bireyler (S-P+, S+P+) ve S-P- bireyler kıyaslandığında, periodontitisli ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0,001$ ) (Tablo 3.5).



Şekil 3.2.Gruplarda NET miktarlarını gösteren kutu çizgi grafiği

Tablo 3.4.Gruplarda NET miktarlarının sonuçları (ortanca, min-max)

	S-P- (n=7)	S-P+ (n=7)	S+P+ (n=7)	<b>p</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	1.742 [0-2.70] <sup>a</sup>	2.509 [2.13- 2.82] <sup>b</sup>	2.749 [2.10-2.78] <sup>b</sup>	0,009
<b>Pozitif Kontrol (NET)</b>	1.037 [0.78-1.99] <sup>a</sup>	2.409 [2.03-2.78] <sup>b</sup>	2.693 [1.43-2.95] <sup>b</sup>	0,003
<b>P</b>	0,866	0,310	0,271	

<sup>a,b</sup>: harflerin farklı olması o iki grupta farklılığı göstermektedir.

**Tablo 3.5.**Periodontitisli ve sağlıklı bireylerde NET miktarlarının sonuçları (ortanca, min-max)

	Sağlıklı bireyler (S-P-)	Periodontitisli bireyler [(S-P+) (S+P+)]	p
<b>NET</b>	1.037 [0.781-1.99] <sup>a</sup>	2.437 [1.43-2.95] <sup>b</sup>	0,001

<sup>a,b</sup>: harflerin farklı olması o iki grupta farklılığı göstermektedir.

### 3.5. NET Miktarı ile Klinik Parametrelerin Korelasyonu

NET miktarları ile;

- Pİ değeri arasında %67 (p=0,001) (Grafik 3.3),
- Gİ değeri arasında %69 (p=<0,001) (Grafik 3.4),
- SD değeri arasında %53.3 oranında pozitif yönde ve orta düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir (p=0,013) (Grafik 3.5).
- KAS değeri arasında %79.2 oranında pozitif yönde ve yüksek düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir (p=<0,001)(Grafik 3.6).

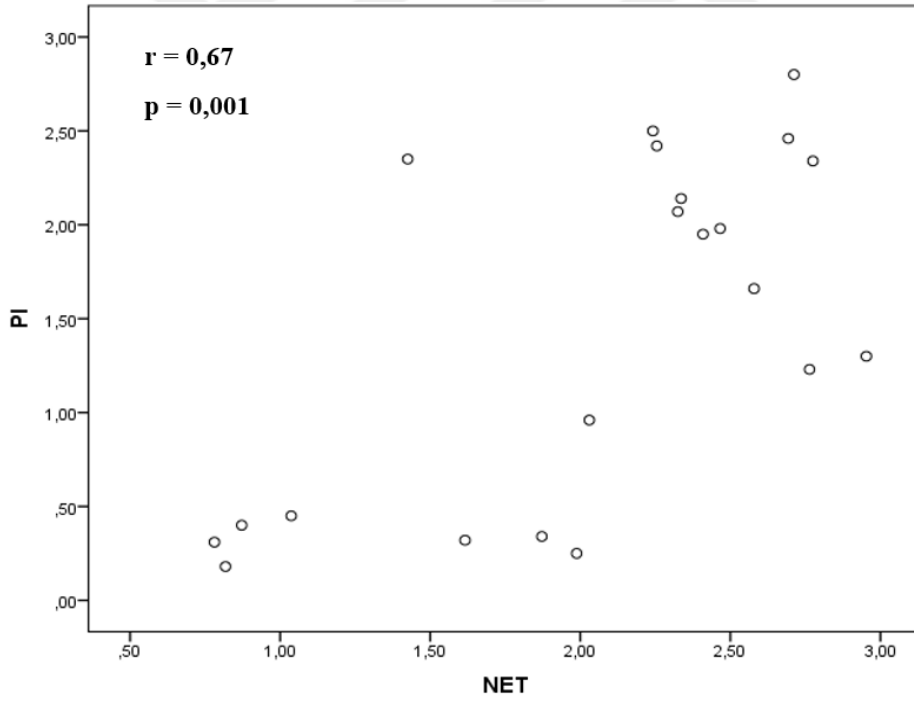
NET miktarının klinik parametreler ile korelasyonu Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

**Tablo 3.6.**NET miktarının klinik parametreler ile korelasyonu

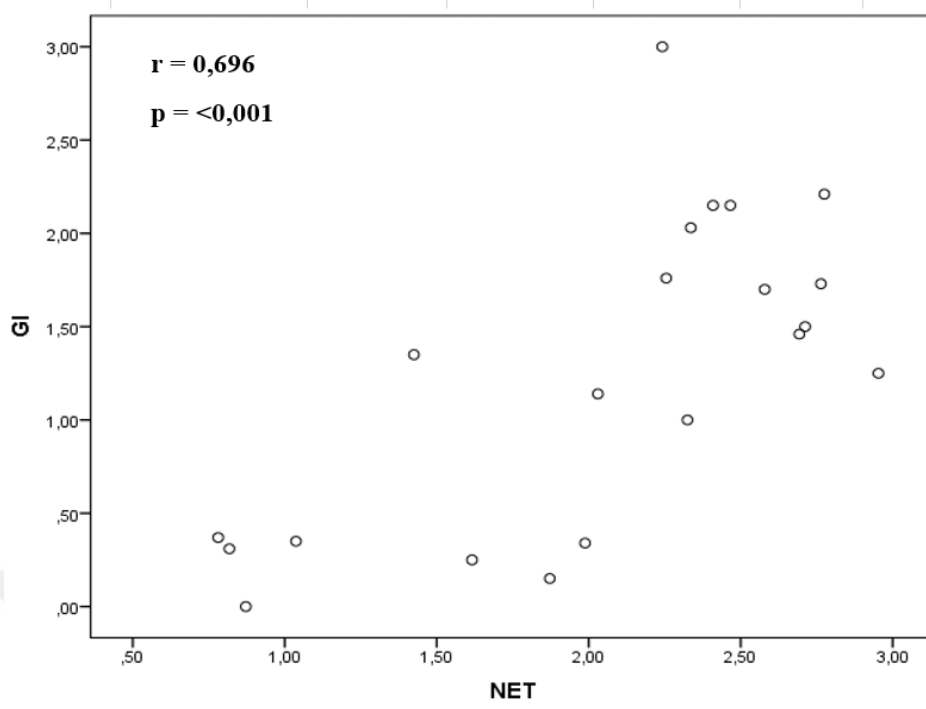
		Pearson Korelasyon Katsayısı	
		r	p
<b>NET</b>	<b>Pİ</b>	0,67	0,001
		0,696	<0,001

<b>Gİ</b>		
<b>SD</b>	0,533	0,013
<b>KAS</b>	0,792	<0,001

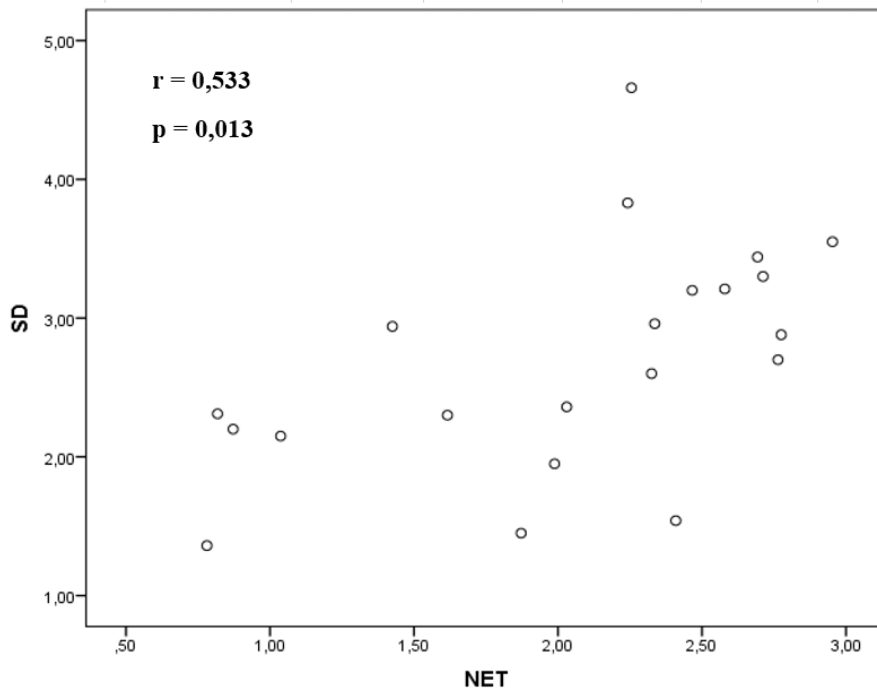
NET: Nötrofil Hücre Dışı Tuzak, Pİ: Plak İndeksi, Gİ: Gingival İndeks, SD: Sondlama Derinliği, KAS: Klinik Ataçman Seviyesi



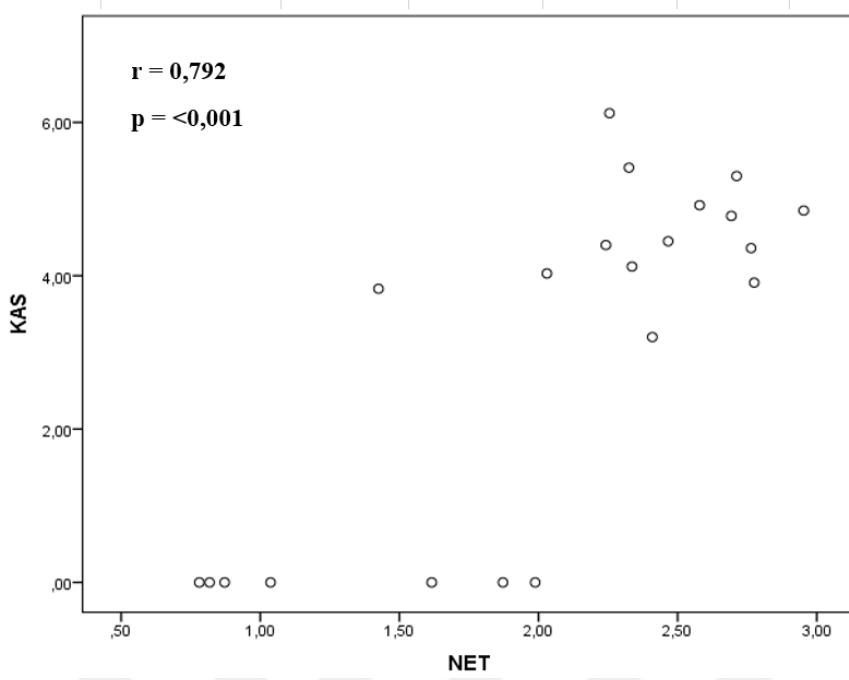
Şekil 3.3.NET miktarı ile Pİ korelasyonunu gösteren saçılım grafiği



Şekil 3.4.NET miktarı ile GI korelasyonunu gösteren saçılım grafiği



Şekil 3.5.NET miktarı ile SD korelasyonunu gösteren saçılım grafiği



Şekil 3.6.NET miktarı ile KAS korelasyonunu gösteren saçılım grafiği

### 3.6. Periferal Venöz Kandan PMN İzolasyonu

İzolasyon sonucunda elde edilen nötrofiller %72'lik ve 63'lük Percoll dilüsyonları arasında bulutumsu tabaka olarak izlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Percoll tabakaları arasında bulutumsu tabaka şeklinde PMN izlenmiştir



Santrifüj sonrası tüpün en alt kısmında eritrositlerin olduğu tortu izlenmiştir (Şekil 3.8).

Eritrositler patlatıldıktan ve tekrarlanan santrifüjden sonra nötrofiller tüpün en alt kısmında gözlenmiştir (Şekil 3.9).



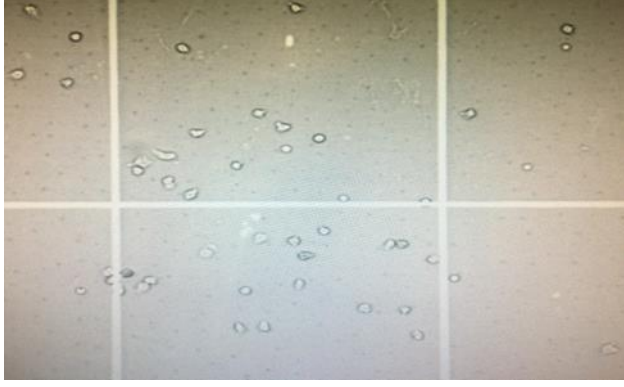
Şekil 3.8.Santrifüj sonrası içinde eritrositlerin de bulunduğu tortu izlenmiştir.



Şekil 3.9.Eritrositler patlatıldıktan ve tüp santrifüj edildikten sonra içinde nötrofillerin bulunduğu tortu tüpün altında izlenmiştir.

### 3.7. PMN'in Sayılması

PMN süspansiyonundaki hücre sayısını belirlemek için hücre stoğundan alınan 10 µl'lik hücre süspansiyonu Neubauer hücre sayım kamarasında incelenmiştir (Şekil 3.10). Toplam PMN sayısı hesaplanmıştır.



**Şekil 3.10.** Neubauer sayım kamarasına alınan PMN'in ışık mikroskobik görüntüsü (x10)

### **3.8. PMN'in Canlılık Oranının Tespiti**

Trypan blue boyası (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak ışık mikroskobunda incelenen kamarada boya alan ve böylelikle mavi renkte görünen hücreler ölü, almayanlar canlı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.11). Tüm hücreler (canlı ve ölü) sayılarak toplam hücre sayısı içinde ölü hücrelerin oranı % olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin %98'inin canlı olduğu tespit edilmiştir.

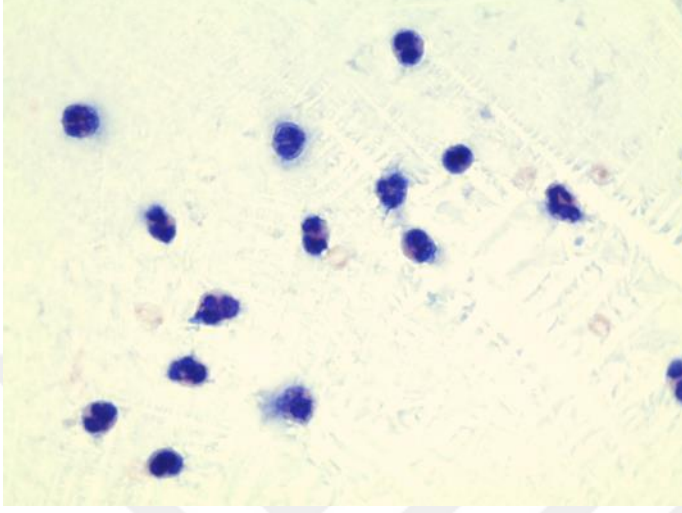


**Şekil 3.11.** Boya alan ölü PMN (mavi renkte) ve boya almayan canlı PMN (şeffaf) izlenmiştir (Trypan blue boyası) (x40).

### **3.9. İzole Edilen PMN'in İçinde Nötrofil Oranının Belirlenmesi**

Diff-Quick boya (Bio Optica, İtalya) ile boyanan hücreler ışık mikroskobunda sayılmıştır (Şekil 3.12). Nötrofiller, soluk pembe sitoplazma ve koyu mavi renkte parçalı

çekirdek yapısına sahip hücreler olarak mikroskopta gözlenmiştir. Bir mikroskop sahasında mevcut toplam hücrenin ortalama %97'sinin nötrofil olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.12.** Nötrofillerin soluk pembe sitoplazması ve koyu mavi parçalı çekirdeği izlenmiştir (Diff-Quick boya) (x40).

### 3.10. Nötrofillerin PMA ile Aktivasyonu

Çalışma kapsamında elde edilen PMN sayısı;

- S-P- grupta 700.000-1.800.000,
- S-P+ grupta 600.000-3.000.000,
- S+P+ grupta 1.000.000-4.000.000 arasında değişmiştir.

Her üç grupta da izole edilen PMN'nin bir kısmı PMA ile aktive edilmiş, bir kısmı ise muamele edilmeden negatif kontrol olarak bırakılmıştır. Bir saatlik inkübasyon sonucunda şekillenen reaksiyon fluorometre cihazı ile niceliksel olarak değerlendirilmiştir. PMA aktivasyonu açısından gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p=0,866$ ;  $p=0,310$ ;  $p=0,271$ ).

NET değerleri Grafik 3.2'de görülmektedir. NET miktarı açısından periodontitisli bireylerde (S-P+ ve S+P+) sağlıklı bireylerin yer aldığı gruba (S-P-) göre istatis-

tiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,001$ ). Periodontitisli bireylerde NET miktarı açısından sigaranın etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla S-P+ ve S+P+ gruplar karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Nötrofiller periodontal dokularda oldukça yaygın olarak bulunmaktadır ve periodontal patojenlere karşı ilk cevabı oluşturmaktadır (Kantarıcı ve ark. 2003). Yakın zamanda, nötrofillerin NET adı verilen ağsı yapılar oluşturarak bakterileri hücre dışı ortamda hapsediği ve öldürdüğü keşfedilmiştir (Brinkmann ve ark. 2004). Nötrofillerin pek çok fonksiyonunu etkilediği bilinen sigaranın, sigara içen ve içmeyen periodontitisli bireylerden izole edilen periferel nötrofillerde NET oluşumu üzerine etkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızın amacı, sigara içen ve içmeyen periodontitisli bireylerde ve sağlıklı kontrollerde, NET miktarlarını karşılaştırmak ve NET'lerin klinik parametreler ile korelasyonunu değerlendirmektir. Çalışmamızın hipotezi, sigara içen periodontitisli bireylerde NET miktarının, sigara içmeyen periodontitisli ve sağlıklı bireylere göre daha yüksek olacağıdır.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre, NET miktarı S+P+ grupta S-P+ gruba göre daha yüksektir; ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. S-P- grup ile karşılaştırıldığında her iki periodontitis grubunda NET miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Aynı zamanda NET miktarı ile Pİ, Gİ, SD gibi klinik parametreler arasında orta düzeyde; KAS ile arasında yüksek düzeyde pozitif ilişki tespit edilmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar artan yaş ile birlikte periodontal hastalığın prevalans ve şiddetinin arttığını bildirmiştir (Baelum ve ark. 1997a,b; Beck ve ark. 1997). Bu durum, doku yıkımının kümülatif doğasının ileri yaşlarda ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir (Hujoel ve ark. 2003, Chavarry ve ark. 2009). Sigara periodontal hastalık için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Genco ve Borgnakke 2013). Sigara içen bireylerde periodontal hastalığın daha erken başladığı bildirilmiştir (Haber 1994, Mullally 2004). Bu bilgiler ile uyumlu olarak, çalışmamızdaki gruplar yaş açısından incelendiğinde, S-P+ grupta yaş, S-P- ve S+P+ gruplar ile karşılaştırıldığında daha yüksektir; ancak yalnızca S-P- grup ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, S-P+ ve S+P+ gruplarda bütün klinik periodontal parametreler S-P- gruptan anlamlı düzeyde daha yüksektir. Bununla birlikte, S+P+ grupta Pİ, SD ve KAS değerleri S-P+ gruba göre daha yüksek gözlenirken; daha düşük Gİ değerleri tespit edilmiştir. Ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Genellikle, sigara içen bireylerde, yüksek Pİ'ne rağmen, daha düşük sondlamada kanama değerleri bildirilmektedir. Ayrıca SD ve KAS sigara içmeyenlere göre daha fazladır (Albandar ve ark. 2000, Luzzi ve ark. 2007).

Periodontitis, mikrobiyata ile ilişkili ve periodontal ataçmanın kaybıyla sonuçlanan konak aracılı enflamasyon olarak tanımlanmaktadır (Tonetti ve ark. 2018). Hastalık patogenezinde dental plak içinde yer alan bakterilere karşı gelişen enflamatuvar yanıt önemli rol oynamaktadır (Çekici ve ark. 2014). Meydana gelen enflamatuvar süreçte nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler gibi pek çok farklı immün hücre çeşidi görev almasına rağmen, enflamasyon durumunda dişeti sulkusunda yoğun olarak bulunan nötrofiller, patojenlere karşı ilk yanıtı oluşturmaktadır (Kantarci ve ark. 2003, Preshaw ve Taylor 2011).

Çeşitli sitokinler ile enfekte bölgeye yönlendirilen nötrofillerin, enfekte bölgede patojenle karşılaşması nötrofilin aktive olmasına ve patojenin fagozom içine alınmasına neden olmaktadır. Fagozomda iki antimikrobiyal olay gerçekleşmektedir. İlki NADPH oksidaz ile ROT sentezidir (Hampton 1998). Ancak ROT yüksek reaktiviteye sahiptir. Bu yüzden ROT, antimikrobiyal etkinliğinin yanında, dokuda protein, lipit ve DNA gibi önemli yapıları okside ederek doku hasarına sebep olmaktadır (Özmeriç ve ark. 2004, Chapple ve Matthews 2007). İkincisi ise, granüllerin fagozom ile kaynaşması ve içlerindeki antimikrobiyal peptid ve enzimlerin boşaltılmasıdır (Hampton1998). Nötrofiller MPO, elastaz, lizozim, katepsin G, iNOS içeren azurofilik ve laktoferrin, MMP-8 ve MMP-9 ve lizozim açısından zengin spesifik granüllere sahiptir. Bu antimikrobiyal peptid ve enzimler fagositoz, degranülasyon ve NET oluşumu gibi antimikrobiyal öldürme mekanizmalarında görev almaktadır (Rosales ve ark. 2016). Aynı zamanda, bu enzimler dokuyu degrade ederek hastalığın klinik belirtilerinin altında yatan doku hasarında etkili olmaktadır (Preshaw ve Taylor 2011). NE, MMP'ler ve ROT gibi nötrofil ürünlerinin doku hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (Liou ve Campbell 1996, Chapple ve Matthews 2007).

Enflamasyonun rezolüsyonu doku sağlığının yeniden oluşturulması için oldukça önemlidir. Enflamatuvar bölgedeki nötrofillerin elimine edilememesi sonucu enflamasyonun kronikleştiği ve periodontal dokularda nötrofil-aracılı yıkımın arttığı gösterilmiştir (Van Dyke ve Serhan 2003, Çekici ve ark. 2014).

Nötrofillerin sayı ve fonksiyonunda defekt ile beraber seyreden birçok durumda periodontitisin şiddetli formlarının görülmesi bize nötrofillerin periodontal sağlık için taşıdığı önemi göstermektedir. Nötrofilleri sayı bakımından etkileyen iki durum mevcuttur. Bu durumlardan ilki nötrofil sayısının azalması (<1,500 hücre/ $\mu$ L) olarak tanımlanan 'nötropeni'dir. Nötropeni durumunda enfeksiyona duyarlılık artmaktadır. İkincisi ise nötrofil sayısının artması olarak tanımlanan 'nötrofil'i'dir. Nötrofil'i durumunda ise immün yanıt şiddetlenmekte ve kronik enflamasyona yatkınlık ortaya çıkmaktadır (Lalwani ve ark. 2016). Yapılan çalışmalarda, periodontitisli bireylerde periferal nötrofil sayısının sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu (Kweider ve ark. 1993) ve sayının hastalık şiddeti ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir (Loos ve ark. 2000). Benzer şekilde, generalize agresif periodontitisli bireylerde periferal nötrofil sayısının sağlıklı kontrollere göre arttığı bildirilmiştir (Shi ve ark. 2008). Nötrofiller üzerinde pek çok etkisi bulunan sigaranın nötrofil sayısını arttırdığı ortaya konmuştur (Schwartz ve Weiss 1994). Sigara içen bireylerde nötrofil sayısı sigara içmeyen bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (Fröhlich ve ark. 2003, Smith ve ark. 2003, Higuchi ve ark. 2016). Mevcut literatüre uyumlu olarak, çalışmamızda PMN sayısının S+P+ grupta en yüksek, S-P- grupta ise en az olduğu tespit edilmiştir. PMN sayısı açısından bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak sınırda anlamlıdır. Ancak S-P+ ve S+P+ gruplar arasında PMN sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Literatürde periodontitis ve sigara dışında PMN sayısını etkileyen pek çok faktör bildirilmiştir. Bunlardan erkek cinsiyet, yüksek vücut kitle indeksi, yüksek kan basıncı, hiperlipidemi ve diyabet artmış PMN sayıları ile ilişkili bulunmuştur (Higuchi ve ark. 2016). Çalışmamızda her ne kadar sistemik olarak sağlıklı bireyler dahil edilmiş olsa da bireylerin vücut kitle indeksi veya hiperlipidemi gibi durumları hakkında bilgi alınmamıştır. Elde edilen bulgulara bu faktörlerin etkili olabileceği düşünülebilir.

Sayısal anomalilere ek olarak bazı durumlarda nötrofillerin adezyon, kemotaksis ve fagositoz gibi fonksiyonları etkilenebilmektedir. Bu durumlar: Chediak-Higashi sendromu, lökosit adezyon defekti, Papillon Lefèvre sendromu, Felty's sendromu, Down sendromu ve tembel lökosit sendromudur. Bu sendromlarda görülen nötrofil fonksiyon anomalileri periodontitisin erken başlayan ve şiddetli ilerleyen formlarına sebep olmaktadır (Lalwani ve ark. 2016). Lokalize agresif periodontitisli bireylerden alınan periferik nötrofillerde artmış ROT üretimi tespit edilmiş ve bu durumun doku hasarında rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Topham ve Prescott 1999, Gronert ve ark. 2004). Toplam 38 bireyde yapılan bir çalışmada, kronik periodontitisli bireylerden elde edilen periferik nötrofillerin *in vitro* Fcγ-reseptör stimülasyonu sonrası sağlıklı kontrollere göre daha yüksek miktarda ROT ürettiği tespit edilmiştir (Chapple ve Matthews 2007).

Periodontitiste nötrofillerin hangi mekanizmayla doku hasarına katkıda bulunduğu pek çok çalışmaya konu olmuş ve çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Nötrofillerin sebep olduğu doku hasarında değişmiş diaçilgliserol kinaz (DAGK) ekspresyonu (Gronert ve ark. 2004), adezyon molekülleri (Gustafsson ve Asman 1996), fox genleri (Matthews ve ark. 2007), Fcγ polimorfizmleri (Kobayashi ve ark. 1997, Fredriksson ve ark. 2003) gibi konular üzerinde durulmuştur.

Yakın zamanda, Brinkmann ve ark. (2004) tarafından nötrofillerin farklı bir antimikrobiyal fonksiyonu keşfedilmiştir. Bu çalışmada, nötrofillerin ağı yapılar oluşturarak hücre dışı ortamda bakterileri hapsedtikleri gösterilmiş ve bu yapılar NET olarak adlandırılmıştır. NET, majör yapısal komponenti DNA olan ve üzerinde histonlar, NE, MPO, katepsin G, lizozim, jelatinaz gibi antimikrobiyal proteinler içeren ağı yapıdır. DNA liflerinin çapı yaklaşık 15-17 nm'dir. Liflerin üzerindeki granüler proteinlerin çapı ise yaklaşık 50 nm'dir. NET'in yalnızca aktive olmuş nötrofillerden üretildiği ve IL-8, LPS ve PMA'nın nötrofilleri aktive ederek NET oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. NET oluşumunun aktivasyondan 10 dk sonra gerçekleştiği, transmisyon elektron mikroskobu (TEM), tarama elektron mikroskobu (SEM) ve immünfloresan yöntemler ile görüntülenebileceği ve fluorometre cihazında niceliksel olarak ölçülebileceği bildirilmiştir (Brinkmann ve ark. 2004). Çalışmamızda sigar-



anın NET oluşumu üzerine olan etkisini gözlemlemek istediğimiz için NET miktarı fluorometre cihazı ile ölçülmüş ve NET niceliksel olarak değerlendirilmiştir.

Fuchs ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, NET oluşumu boyunca meydana gelen morfolojik değişikliklerin görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada nötrofiller PMA ile uyarılmış ve meydana gelen değişimler faz kontrast mikroskobu ile kaydedilmiştir. Aktivasyon 45. dk'dan sonra gözlenmiştir. Morfolojik değişiklikler, çekirdeğin karakteristik lobüler formunun kaybolmasıyla başlayan belirli bir süreci izlemiştir. Eş zamanlı olarak, ökromatin ve heterokromatin arasındaki ayrım ortadan kalkmıştır. Bu noktada nükleer membranlar birbirinden ayrılmaya başlamış; ancak sitoplazma ve organellerin morfolojisi bozulmamıştır. Süreç boyunca granüller çekirdeğe yaklaşmış ve böylece DNA hücre dışı ortama çıkmadan önce granüler komponentler ile birleşmiştir. Hücre membranı bozulmamış yalnızca NET salınımına izin vermek için kırılmıştır. 10 ve 25 nM konsantrasyonda PMA ile 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub> ortam şartlarında aktive edilen 10x10<sup>5</sup> PMN/ml sayıda nötrofilde oluşan NET miktarı 45, 90, 135, 180 ve 240 dk sonra fluorometre ile niceliksel olarak ölçülmüştür (Fuchs ve ark. 2007).

PMA, DAG'ın yapısal analogudur ve protein kinaz C (PKC)'nin potent bir aktivatörüdür. PMA tarafından PKC'nin aktivasyonu lökositlerde IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi pro-enflamatuvar sitokin salınımını arttırmaktadır (Dzietko ve ark. 2015). Ayrıca PMA tarafından PKC aktivasyonu NADPH oksidazın aktive olmasına ve ROT üretimine sebep olmaktadır (Karisson ve ark. 2000). PMA'nın nötrofillerde NET oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (Brinkmann ve ark. 2004, Fuchs ve ark. 2007). Bu yüzden NET oluşumunu değerlendiren birçok çalışmada, 0-100 nM konsantrasyonlara sahip PMA, NET aktivatörü olarak kullanılmıştır (Brinkmann ve ark. 2004, Fuchs ve ark. 2007, Jayaprakash ve ark. 2015, Masuda ve ark. 2017).

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, Fuchs ve ark. (2007)'nin çalışmasına benzer şekilde, NET oluşumunu uyarmak amacıyla 10x10<sup>5</sup> PMN/ml sayıda nötrofil 25 nM konsantrasyonda PMA ile 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub> ortam şartlarında aktive edilmiş ve 60 dk sonra NET niceliksel olarak ölçülmüştür.

Fuchs ve ark. (2007) tarafından NET üzerine yapılan çalışmada, NETozis boyunca sitoplazma ve organellerin sağlam kaldığı, hücre membranının sadece NET'in hücre dışı ortama çıkabilmesi için kırıldığı ve apoptozda görev alan kaspaz proteinlerinin bu süreçte görev almadığı izlenmiştir. Annexin V ile işaretlenen apoptik hücrelerde NET oluşmamıştır. Bu yüzden NET oluşumunun apoptozdan farklı bir mekanizma ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca NET oluşumunun hücrenin nekrozu sonucu oluşmadığı, bu sürecin NADPH oksidaz aktivasyonu gibi belirli hücrel aktivite gerektirdiği gösterilmiştir. NADPH oksidaz, DPI ile inhibe edildiğinde *Staphylococcus aureus* ve PMA ile uyarılan hücrelerde ROT üretimi durmuş ve NET oluşumu gerçekleşmemiştir. Katalaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi, H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüştürerek ROT seviyesini azaltmaktadır. ROT üretiminin NET üzerine etkisini göstermek için, katalaz kullanılmış ve NET üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Katalaz inhibe edildiğinde NET seviyesi de artış göstermiştir. Kronik granülomatöz hastalığa sahip bireylerde, NADPH oksidazdaki mutasyondan dolayı ROT üretilememektedir. Bu bireylerden elde edilen nötrofillerde NET oluşumu gerçekleşmemiştir. Dolayısıyla, NADPH oksidaz aktivasyonu ve ROT üretiminin NET oluşumunu başlatan anahtar olay olduğu öne sürülmüştür (Fuchs ve ark. 2007, Wang ve ark. 2009, White ve ark. 2016).

NET, Gram (+) ve (-) bakterilere bağlanarak bakteriyi hapsetmekte ve üzerindeki antimikrobiyal proteinler ile öldürmektedir. Mikroorganizmaların etkin bir şekilde öldürülmesi gerektiğinde lokal konsantrasyonları artmaktadır (Delgado-Rizo ve ark. 2017).

Çeşitli hastalıklarda NET oluşumunu değerlendiren çalışmalarda, apandisit (Brinkmann ve ark. 2004), preeklampsi (Gupta ve ark.2005), streptokokal enfeksiyonlar (Molloy, 2006), nekrotizan fasiit (Buchanan ve ark. 2006) ve pnömoni (Beiter ve ark. 2006) gibi hastalıklarda NET tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, alevlenme dönemindeki KOAH hastalarının balgamında büyük miktarda NET varlığı gösterilmiştir (Grabcanovic-Musija ve ark. 2015). Benzer olarak kronik enflamatuvar bir hastalık olan aterosklerozda, aterosklerotik lezyona sahip kan damarı sayısı ile NET belirteçlerinden MPO/DNA'nın korele olduğu bildirilmiştir (Borissoff ve ark. 2013). RA'lı bireylerin dolaşım ve sinovial sıvı nötrofillerinde sağlıklı kontrollere

kıyasla artmış NET oluşumu bildirilmiştir (Thomas ve ark. 2012, Khandpur ve ark. 2013). Bu çalışmaların ışığında, artmış NET oluşumunun birçok enflamatuvar hastalığın patogeneğinde rol oynadığı ve patolojik durumlarda NET salınımının şiddetli doku hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Cooper ve ark. 2013).

Diğer enflamatuvar hastalıklara benzer olarak periodontal hastalıkta, ROT bağımlı gerçekleşen NET üretiminin artabileceği (Cooper ve ark. 2013) ve artmış NET üretiminin doku hasarı ile ilişkili olabileceği (Kolaparthi ve ark. 2014) belirtilmiştir. Dişeti biyopsilerinde, pürülan eksudada, supragingival plak ve DOS'ta NET bulunmuştur (Vitkov ve ark. 2009, Hirschfeld ve ark. 2015). Kronik periodontitisli 12 bireyden alınan biyopsi örneklerinde dişetin enflamasyonlu bölgelerinde NET, TEM ile görüntülenmiş ve 22 gingivitisli bireyden alınan pürülan eksudada saptanmıştır (Vitkov ve ark. 2009). Diğer çalışmada, dental biyofilm ve DOS içinde nötrofil ve NET varlığı gösterilmiştir. Dental biyofilmdeki bakteri türlerinin nötrofil-lerde NET oluşumuna neden olduğu ortaya konmuştur. Ancak dental plaktaki NET miktarı ve klinik parametreler arasında bir ilişki bulunamamıştır (Hirschfeld ve ark. 2015). Çalışmamızda, periodontitisli bireylerde periferik nötrofillerin PMA aktivasyonu sonucu oluşan NET miktarı ile klinik parametreler arasında pozitif ilişki bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre; NET miktarı ile Pİ, Gİ ve SD arasında orta düzeyde; KAS ile arasında yüksek düzeyde pozitif ilişki saptanmıştır. KAS periodontal hastalık tanısı için kullanılan ve hastalık şiddetini yansıtan oldukça önemli bir klinik parametredir (Rheu ve ark. 2011). Periodontitisli bireylerde periferik nötrofiller tarafından üretilen NET miktarı ile KAS arasında yüksek düzeyde pozitif ilişki saptanması, periodontal doku yıkımında NET'in potansiyel rolüne ışık tutmaktadır. Önceki çalışmada, dental biyofilm içinde saptanan NET ile klinik parametreler arasında ilişki tespit edilememesinin nedeni olarak NET'in deoksiribonükleaz (Dnaz) oluşturma yeteneğine sahip *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia* (Palmer ve ark. 2012, Cooper ve ark. 2013) gibi bazı bakteriler tarafından degrade edilebileceği düşünülmüştür. Kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerde NET üretimi ve degradasyonunu araştıran bir çalışmada, toplam 40 bireydeki plazma NET üretiminde periodontitisli ve sağlıklı bireyler arasında fark gözlenmemiştir.

Ancak periodontitisli bireylerdeki NET üretimini periodontal tedavi sonrası azaldığı bildirilmiştir. Plazma NET degradasyonu periodontitisli bireylerde belirgin olarak düşük bulunmuş ve bu durum azalmış Dnaz-1 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu yüzden, tedavi sonrası NET degradasyonunun karşılaştırılabilir bir parametre olduğu düşünülmüştür (White ve ark. 2016).

Periodontitiste periferal nötrofillerin dental plaktaki bakterilere karşı hiperreaktif ve ROT üretimi açısından hiperaktif olduğu önceden bildirilmiştir (Matthews ve ark. 2007). Bu iki durum, aşırı NET üretimi ile sonuçlanmaktadır (Cooper ve ark. 2013).

NET'in doku hasarı patogenezindeki rolü şu etkileri ile ilişkilendirilmiştir;

-NETozis boyunca nötrofillerin yarı ömürleri uzamaktadır. Enflamatuvar bölgede daha uzun süre yer alan nötrofiller, degrade edici enzimleri ile nötrofil- aracılı doku hasarına yol açmaktadır.

-Hücre dışı ortamda bulunan proteinaz-3, MPO, peptidil arjinin deaminaz (PAD) gibi hücrel komponentler immünojenik etki oluşturmaktadır.

-NET oluşumu süresince üretilen ROT, IL-1 $\beta$  gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırmaktadır (Cooper ve ark. 2013).

Bu bilgilerin ışığında, S-P+ ve S+P+ gruplar ile S-P- grup karşılaştırıldığında her iki grupta da NET miktarı S-P- gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Gözlenen farkın, enflamatuvar hastalıklarda artmış ROT üretiminin bir sonucu olduğu düşünülmüştür. Bu bulgu literatürdeki bilgileri desteklemektedir (Fuchs ve ark. 2007, Cooper ve ark. 2013).

Sigara dumanı özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>- gibi ROT bakımından oldukça zengindir (Pryor ve Stone 1993, Valavanidis ve ark. 2009). Sigara içildiğinde bir nefeste tar fazda 10<sup>14</sup> ve gaz fazda 10<sup>15</sup> radikal içermektedir (Pryor ve ark. 1983). Sigara, içerdiği pek çok kimyasalla direkt veya indirekt olarak ROT üretimi ile oksidatif stresi doğurmaktadır (Pryor ve ark. 1990, Palmer ve ark. 2005, Garg ve ark. 2006).

Sigaranın nötrofil kaynaklı ROT üretimini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Gillespie ve ark. 1987, Gustafsson ve ark. 2000). Sigara ile ilişkilendirilmiş kardiyovasküler hastalıklarda sigaranın ROT üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (Burke ve Fitzgerald 2003, Yamaguchi ve ark. 2005). RA'lı bireylerde sigara içilmesi ile oksidatif stresin arttığı ve hastalık patogenezinin bu yolla katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Chang ve ark. 2014). Periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre ve sigara içen kronik periodontitisli bireylerde ise içmeyenlere göre ROT seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Guentsch ve ark. 2008, Aziz ve ark. 2013).

Sigara nedeniyle NET oluşumunun artabileceği, bunun bir sonucu olarak ise sigara ile ilişkili hastalıklarda doku hasarı ve immün bozukluğun ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Feldman ve Anderson 2013). KOAH hastalarında sigaranın NET oluşumu üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, sigara dumanına maruz bırakılan farelerden izole edilen PMN'lerde PMA aktivasyonu sonucu gelişen NET miktarının kontrole göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Qui ve ark. 2017). Buna ek olarak, nikotinin NET oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Hossein-zadeh ve ark. 2016).

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, S+P+ grupta NET miktarı, S-P+ grup ve S-P- grup ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. S+P+ grup ile S-P- grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmasına rağmen, S-P+ grup ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Periodontitisli gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamaması, sigara kullanım durumlarının sözel olarak elde edilmesi ve farklı dozlarda sigara içen bireylerin çalışmaya dahil edilmemesine bağlı olabilir. Ayrıca literatürde, sigaranın, nötrofil NADPH oksidazı (Nyugen ve ark. 2001) ve CSE'ye maruz bırakılan nötrofillerde oksidatif patlamayı baskıladığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Zappacosta ve ark. 2001). Sigara dumanı içindeki CSE ve tiyosiyanat (SCN<sup>-</sup>)'ye maruz bırakılan nötrofillerde PMA ile aktive edilen NET üretiminin inhibe edildiği bulunmuştur (White ve ark. 2018). Bu bilgilere ek olarak, sigara içen bireylerde sigara dumanı kondensatı (CSC)'ye maruz bırakılan periferik nötrofillerde NET oluşumu doz bağımlı olarak azalmıştır. Bu durum CSC tarafından potansiyel NADPH oksidaz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Bokaba ve ark. 2017). Tüm bu

çalışmalara rağmen, sigaranın NET miktarı üzerine etkisi tam olarak açıklanabilmiş değildir (Rajendran ve Uppoor 2018).

NET oluşumu ve sigaranın bu oluşumları nasıl etkilediği oldukça güncel bir konudur ve bilindiği kadarıyla bu çalışma, sigara ićen periodontitisli bireylerde, sigaranın NET miktarı üzerine etkisini değerlendiren ilk çalışmadır.

Çalışmamızın limitasyonları;

- Sigara kullanımının sözel olarak değerlendirilmesi ve doz sınıflaması yapılmaması,
- NET oluşumu değerlendirilirken eş zamanlı olarak ROT belirteçlerinin bakılmamasıdır.

Sonuç olarak;

- Her iki periodontitis grubunda da NET miktarı sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir.
- Sigara ićen periodontitisli bireylerde NET miktarı sigara içmeyen periodontitisli bireylere göre yüksektir; ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıřtır.
- NET miktarı ile klinik parametreler arasında pozitif ilişki bulunmuştur ve bu ilişki KAS ile yüksek düzeyde pozitifdir.
- Artmış NET miktarının periodontitiste doku hasarında rol oynadığı düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

ABOODI GM, GOLDBERG MB, GLOGAUER M (2011) Refractory periodontitis population characterized by a hyperactive oral neutrophil phenotype. *J Periodontol*, 82(5), 726–33.

ACTOR JK (2012) Cells and organs of the immune system. In: Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. Eds: HYDE M, HALL A. 2nd Elsevier Saunders, p:40-44.

AH MK, JOHNSON GK, KALDAHL WB, PATIL KD, KALKWARF KL (1994) The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 21(2), 91-7.

ALBANDAR JM, STRECKFUS CF, ADESANYA MR, WINN DM (2000) Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol*, 71(12), 1874–1881.

ALMEIDA RP, VANET A, WITKO-SARSAT V, MELCHIOR M, MCCABE D, GABAY JE (1996) Azurocidin, a natural antibiotic from human neutrophils: expression, antimicrobial activity, and secretion. *Protein Expr Purif*, 7(4), 355-66.

AMULIC B, CAZALET C, HAYES GL, METZLER KD, ZYCHLINSKY A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 30, 459–89.

ANDERSON R (2001) Antioxidant nutrients and prevention of oxidant-mediated, smoking-related diseases. In: Preventive Nutrition. Eds. BENDICH A, DECKELBAUM RJ, Humana Press, Totowa, 293-306.

APATZIDOU DA, RIGGIO MP, KINANE DF (2005) Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(9), 973-83.

ARMITAGE GC (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4(1), 1-6.

ARORA M, SCHWARZ E, SIVANESWARAN S, BANKS E (2010) Cigarette smoking and tooth loss in a cohort of older Australians. The 45 and up study. *J Am Dent Assoc*, 141(10), 1242–9.

ASTEMBORSKI JA, BOUGHMAN JA, MYRICK PO, GOODMAN SB, WOOTEN RK, AGARWAL S, VINCENT JW, SUZUKI JB (1989) Clinical and laboratory characterization of early onset periodontitis. *J Periodontol*, 60(10), 557-63.

AXELSSON P, PAULANDER J, LINDHE J (1998) Relationship between smoking and dental status in 35, 50, 65, and 75 year old individuals. *J Clin Periodontol*, 25(4), 297-305.

- AZIZ AS, KALEKAR MG, SURYAKAR AN, BENJAMIN T, PRAKASHAN MJ, AHMED BM, SAYYAD M (2013) Assessment of some biochemical oxidative stress markers in male smokers with chronic periodontitis. *Indian J Clin Biochem*, 28(4), 374-80.
- BAELUM V, LUAN WM, CHEN X, FEJERSKOV O (1997a) A 10-year study of the progression of destructive periodontal disease in adult and elderly Chinese. *J Periodontol*, 68(11), 1033-42.
- BAELUM V, LUAN WM, CHEN X, FEJERSKOV O (1997b) Predictors of destructive periodontal disease incidence and progression in adult and elderly Chinese. *Community Dent Oral Epidemiol*, 25(4), 265-72.
- BALJOON M (2005) Tobacco smoking and vertical periodontal bone loss. *Swed Dent J*, Suppl 174, 1-62.
- BARTOLD PM, WIEBKIN OW, THONARD JC (1984) The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontol Res*, 19, 390-400.
- BAX BE, ALAM AS, BANERJI B, BAX CM, BEVIS PJ, STEVENS CR, MOONGA BS, BLAKE DR, ZAIDI M (1992) Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 183, 1153-8.
- BECK JD, SHARP T, KOCH GG, OFFENBACHER S (1997) A 5-year study of attachment loss and tooth loss in community-Dwelling older adults. *J Periodontol Res*, 32(6), 516-23.
- BEITER K, WARTHA F, ALBIGER B, NORMARK S, ZYCHLINSKY A, HENRIQUESS-NORMARK B (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, 16(4), 401-7.
- BENHAMMOU K, LEE M, STROOK M, SULLIVAN B, LOGEL J, RASCHEN K, GOTTI C, LEONARD S (2000) [<sup>3</sup>H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology*, 39(13), 2818-29.
- BERGSTROM J (1990) Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scand J Dent Res*, 98(6), 497-503.
- BERGSTROM J (2003) Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 30(2), 107-13.
- BERGSTROM J (2004) Influence of tobacco smoking on periodontal bone height. Long-term observations and a hypothesis. *J Clin Periodontol*, 31(4), 260-6.
- BERGSTROM J, ELIASSON S (1987a) Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. *J Clin Periodontol*, 14(8), 466-9.



BERGSTROM J, ELIASSON S (1987b) Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res*, 22(6), 513-7.

BHAGYAJYOTHI CS, PUSHPANJALI K (2011) Assessment and comparison of periodontal status among young smokers and nonsmokers of Bangalore, India—a cross sectional study. *Community Dent Health*, 28(1), 89–94.

BOKABA RP, ANDERSON R, THERON AJ, TINTINGER GR (2017) Cigarette smoke condensate attenuates phorbol ester-mediated neutrophil extracellular trap formation. *Afr Health Sci*, 17, 896-904.

BORISSOFF JI, JOOSEN IA, VERSTEYLEN MO, BRILL A, FUCHS TA, SAVCHENKO AS, GALLANT M, MARTINOD K, TEN CATE H, HOFSTRA L, CRIJNS HJ, WAGNER DD, KIETSELAER BLJH (2013) Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(8), 2032-40.

BOROJEVIC T (2012) Smoking and periodontal disease. *Mater Sociomed*, 24(4), 274-6.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-5.

BUCHANAN JT, SIMPSON AJ, AZIZ RK, LIU GY, KRISTIAN SA, KOTB M, FERAMISCO J, NIZET V (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*, 16(4), 396-400.

BUDUNELI N, LARSSON L, BIYIKOGLU B, RENAUD DE, BAGAITKAR J, SCOTT DA (2011) Fatty acid profiles in smokers with chronic periodontitis. *J Dent Res*, 90(1), 47-52.

BUNAES DF, LIE SA, ENERSEN M, AASTRØM AN, MUSTAFA K, LEKNES KN (2015) Site-specific treatment outcome in smokers following non-surgical and surgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 42(10), 933-42.

BURKE A, FITZGERALD GA (2003) Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis*, 46(1), 79-90.

CALSINA G, RAMON JM, ECHEVERRIA JJ (2002) Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol*, 29(8), 771-76.

CEKICI A, KANTARCI A, HASTURK H, VAN DYKE TE (2014) Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 64(1), 57–80.

CHANG K, YANG SM, KİM SH, HAN KH, PARK SJ, SHIN JI (2014) Smoking and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*, 15(12), 22279-95.

CHANG YC, HUANG FM, TAI KW, YANG LC, CHOU MY (2002) Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontol Res*, 37(4), 279-85.

CHAPPLE IL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*, 24(5), 287-96.

CHAPPLE IL, MATTHEWS JB (2007) The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*, 43, 160-232.

CHAVARY NG, VETTORE MV, SANSONE C, SHEIHAM A (2009) The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral Health Prev Dent*, 7(2), 107-27.

CHEN F, WU W, MILLMAN A, CRAFT JF, CHEN E, PATEL N, BOUCHER JL, URBAN JF JR, KIM CC, GAUSE WC (2014) Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat Immunol*, 15(10), 938-46.

COOPER PR, PALMER LJ, CHAPPLE IL (2013) Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontology 2000*, 63, 165-197.

DEAS DE, MACKEY SA, MCDONNELL HT (2003) Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000*, 32(1), 82-104.

DELGADO-RIZO V, MARTÍNEZ-GUZMÁN MA, IÑIGUEZ-GUTIERREZ L, GARCÍA-OROZCO A, ALVARADO-NAVARRO A, FAFUTIS-MORRIS M (2017) Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. *Front Immunol*, 8, 81.

DO LG, SLADE GD, ROBERTS-THOMSON KF, SANDERS AE (2008) Smoking-attributable periodontal disease in the Australian adult population. *J Clin Periodontol*, 35(5), 398-404.

DOMMISCH H, KEBSCHULL M (2015) Chronic periodontitis. In: Carranza's Clinical Periodontology. Eds: NEWMAN MG, TAKEI HH, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA. 12th, Elsevier Saunders, Missouri, p:309-19.

DZIETKO M, HAHNEMANN M, POLLEY O, SIFRINGER M, FELDERHOFF-MUESER U, BUHRER C (2015) Effects of PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) on the developing rodent brain. *Biomed Res Int*, 2015:318306.

EBERSOLE JL, STEFFEN MJ, THOMAS MV, AL-SABBAGH M (2014) Smoking related cotinine levels and host responses in chronic periodontitis. *J Periodontol Res*, 49(5), 642-651.

EGGERT FM, DREWELL L, BIGELOW JA, SPECK JE, GOLDNER M (1991) The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch Oral Biol*, 36(3), 233-8.

EICHEL B, SHAHRIK HA (1969) Tobacco smoke toxicity: loss of human oral leukocyte function and fluid-cell metabolism. *Science*, 12, 166(3911), 1424-8.

ERDEMIR EO, DURAN I, HALILOGLU S (2004) Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31, 99-104.

ERICSON JA, DUFFAU P, YASUDA K, ORTIZ-LOPEZ A, ROTHAMEL K, RIFKIN IR, MONACH PA (2014) Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. *ImmGen Consortium*, 3, 9(10), e108553.

FAGARD RH (2009) Smoking amplifies cardiovascular risk in patients with hypertension and diabetes. *Diabetes Care*, 32(2), 429-31.

FELDMAN C, ANDERSON R (2013) Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. *J Infect*, 67(3), 196-84.

FISHER S, KELLS L, PICARD JP, GELSKEY SC, SINGER DL, LIX L, SCOTT DA (2008) Progression of periodontal disease in a maintenance population of smokers and non-smokers: a three-year longitudinal study. *J Periodontol*, 79(3), 461-8.

FREDRIKSSON MI, GUSTAFSSON AK, BERGSTROM KG, ASMAN BE (2003) Constitutionally hyper-reactive neutrophils in periodontitis. *J Periodontol*, 74(2), 219-24.

FROHLICH M, SUND M, LOWEL H, IMHOF A, HOFFMEISTER A, KOENIG W (2003) Independent association of various smoking characteristic with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augrburg survey 1994/95). *Eur Heart J*, 24, 1365-72.

FUCHS TA, ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V, WEINRAUCH Y, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2), 231-41.

GAINET J, DANG PM, CHOLLET-MARTIN S, BRION M, SIXOU M, HAKIM J, GOUGEROT-POCIDALO MA, ELBIM C (1999) Neutrophil dysfunctions, IL-8, and soluble L-selectin plasma levels in rapidly progressive versus adult and localized juvenile periodontitis: variations according to disease severity and microbial flora. *J Immunol*, 63(9), 5013-9.

GARG N, SINGH R, DIXIT J, JAIN A, TEWARI V (2006) Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers. *J Periodontal Res*, 41, 405-10.

GENCO RJ, BORGNACKE WS (2013) Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 62(1), 59-94.

GENCO RJ, VAN DYKE TE, LEVINE MJ, NELSON RD, WILSON ME (1986) 1985 Kreshover lecture. Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J Dent Res*, 65(12),1379-91.

GILLESPIE MN, OWASOYO JO, KOJIMA S, JAY M (1987) Enhanced chemotaxis and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from nicotine-treated and smoke-exposed rats. *Toxicology*, 45(1), 45-52.

GONCALVES RB, COLETTA RD, SILVERIO KG, BENEVIDES L, CASATI MZ, DA SILVA JS, NOCITI FH JR (2011) Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*, 60(5), 409-24.

GRABCANOVIC-MUSIJA F, OBERMAYER A, STOIBER W, KRAUTGARTNER WD, STEINBACHER P, WINTERBERG N (2015) Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respire Res*, 16(1), 59.

GREENLEE-WACKER MC (2016) Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*, 273(1), 357-70.

GRONERT K, KANTARCI A, LEVY BD, CLISH CB, ODPARLIK S, HASTURK H, BADWEY JA, COLGAN SP, VAN DYKE TE, SERHAN CN (2004) A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *J Immunol*, 172(3), 1856-61.

GROSSI SG, ZAMBON JJ, HO AW, KOCH G, DUNFORD RG, MACHTEI EE, NORDERYD OM, GENCO RJ (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*, 65(3), 260-7.

GROSSI SG, ZAMBON JJ, MACHTEI E (1997) Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *J Am Dent Assoc*, 128(5), 599-607.

GUENTSCH A, PRESHAW PM, BREMER-STRECK S, KLINGER G, GLOCKMANN E, SIGUSCH BW (2008) Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig*, 12, 345-352.

GULLU C, OZMERIC N, TOKMAN B, ELGUN S, BALOS K (2005) Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, 40(2), 168-75.

GUNSOLLEY JC, QUINN SM, TEW J, GOOSS CM, BROOKS CN, SCHENKEIN HA (1998) The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. *J Periodontol*, 69(2), 165-70.

GUNTSCH A, ERLER M, PRESHAW PM, SIGUSCH BW, KLINGER G, GLOCKMANN E (2006) Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res*, 41(3), 184-8.

GUPTA AK, HASLER P, HOLZGREVE W, GEBHARDT S, HAHN S (2005) Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol*, 66(11), 1146-54.

GUSTAFSSON A, ASMAN B (1996). Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fcγ-receptor stimulation. *J Clin Periodontol* 23(1), 38-44.

GUSTAFSSON A, ASMAN B, BERGSTROM K (2000) Cigarette smoking as an aggravating factor in inflammatory tissue-destructive diseases. Increase in tumor necrosis Factor-α priming of peripheral neutrophils measured as generation of oxygen radicals. *Int J Clin Lab Res*, 30(4),187-90.

HAAS AN, GAIO EJ, OPPERMAN RV, ROSING CK, ALBANDAR JM, SUSIN C (2012) Pattern and rate of progression of periodontal attachment loss in an urban population of South Brazil: a 5-years population-based prospective study. *J Clin Periodontol*, 39(1), 1–9.

HABER J (1994) Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 12-8.

HABER J, KENT R (1992) Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol*, 63(2), 100-6.

HAFFAJEE AD, CUGINI MA, DIBART S, SMITH C, KENT RL JR, SOCRANSKY SS (1997) The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 24(5), 324-34.

HALL TJ, SCHAEUBLIN M, JEKER H, FULLER K, CHAMBERS TJ (1995) The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*, 207, 280-7.

HAMPTON MB, KETTLE AJ, WINTERBOURN CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007–17.

HANNA S, ETZIONI A (2012) Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann NY Acad Sci*, 1250(1),50–55.

HEASMAN L, STACEY F, PRESHAW PM, MCCRACKEN GI, HEPBURN S, HEASMAN PA (2006) The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol*, 33(4), 241–53.

HENDEK MK, ERDEMIR EO, KISA U, OZCAN G (2015) Effect of initial periodontal therapy on the oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva and serum in smokers and non- smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 86(2), 273-82.

HIGUCHI T, OMATA F, TSUCHIHASI K, HIGASHIOKA K, KOYAMADA R, OKADA S (2016) Current cigarette smoking is a reversible cause of elevated white blood cell count: Cross-sectional and longitudinal studies. *Prev Med Rep*, 417-22.

HINRICH JE, KOTSAKIS G (2015) Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. *Carranza's Clinical Periodontology Twelfth Edition*, 45-67.

HIROSE M, ISHIHARA K, SAITO A, NAKAGAWA T, YAMADA S, OKUDA K (2001) Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol*, 72, 590-7.

HIRSCHFELD J, DOMMISCH H, SKORA P, HORVATH G, LATZ E, HOERAUF A, WALLER T, KAWAI T, JEPSEN S, DESCHNER J, BEKEREDJIAN-DING I (2015) Neutrophil extracellular traps in supragingival biofilms. *Int J Med Microbiol*, 305(4-5), 453-63.

HOSSEINZADEH A, THOMPSON PR, SEGAL BH, URBAN CF (2016) Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol*, 100, 1105-12.

HUJOEL PP, DEL AGUILA MA, DEROUEN TA, BERGSTROM J (2003) A hidden periodontitis epidemic during the 20th century? *Community Dent Oral Epidemiol*, 31(1), 1-6.

HYMAN JJ, REID BC (2003) Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol*, 30(3), 230-7.

IHO S, TANAKA Y, TAKAUJI R, KOBAYASHI C, MURAMATSU I, IWASAKI H, NAKAMURA K, SASAKI Y, NAKAO K, TAKAHASHI T (2003) Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF- $\kappa$ B. *J Leukoc Biol*, 74(5), 942-51.

ILHAN D, OKTAY I, NUR B, FISEKCIOGLU E, LIM S, LEPKOWSKI JM, ISMAIL AI (2017) Percentage and severity of periodontal diseases in Turkish adults aged 35+ years, 2009-10. *J Public Health Dent*, 77(4), 325-33.

JEMAL A, THUN MJ, RIES LA, HOWE HL, WEIR HK, CENTER MM, WARD E, WU XC, EHEMAN C, ANDERSON R, AJANI UA, KOHLER B, EDWARDS BK. (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst*, 100(23), 1672-94.

KANTARCI A, OYAIZU K, VAN DYKE TE (2003) Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 74(1), 66-75.

KARLSSON A, NIXON JB, MCPHAIL LC (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol*, 67(3), 396-404.

KASAT V, LADDA R (2012) Smoking and dental implants. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2(2), 38–41.

KASSEBAUM NJ, BERNABE E, DAHIYA M, BHANDARI B, MURRAY CJL, MARCENES W (2014) Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, 93(11), 1045-53.

KEBSCHULL M, KINANE DF, KIRKWOOD KL, KOCHER T, KORNMAN KS, KUMAR PS, LOOS BG, MACHTEI E, MENG H, MOMBELLI A, NEEDLEMAN I, OFFENBACHER S, SEYMOUR GJ, TELES R, TONETTI MS (2018) Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45(2), 162-70.

KHANDPUR R, CARMONA-RIVERA C, VIVEKANANDAN-GIRI A, GIZINSKI A, YALAVARTHI S, KNIGHT JS, FRIDAY S, LI S, PATEL RM, SUBRAMANIAN V, THOMPSON P, CHEN P, FOX DA, PENNATHUR S, KAPLAN MJ (2013) NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 5(178), 178-40.

KINANE DF, CHESTNUTT IG (2000) Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(3), 356-65.

KLEBANOFF SJ (1999) Oxygen metabolites from phagocytes. In: Inflammation: basic principles and clinical correlates. Eds: GALLIN JI, SNYDERMAN R. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p: 721–68.

KOBAYASHI SD, DELEO FR (2009) Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1(3), 309-33.

KOBAYASHI T, WESTERDAAL NA, MIYAZAKI A, VAN DER POL WL, SUZUKI T, YOSHIE H, VAN DE WINKEL JG, HARA K (1997) Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun*, 65(9), 3556-60.

KOLAPARTHY LK, SANIVARAPU S, SWARNA C, DEVULAPALLI NS (2015) Neutrophil extracellular traps: their role in periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*, 19(2), 128.

KWEIDER M, LOWE G, MURRAY G, KINANE D, MCGOWAN D. (1993) Dental disease, fibrinogen and white cell count; links with myocardial infarction. *Scottish Med J*, 38, 73–74.

LALWANI M, SUCHETHA A, MUNDINAMANE DB, SAPNA N, BHAT D, JAYACHANDRAN C (2016) Neutrophil associated syndromes and periodontitis. *J Chem and Pharma Res*, 8(2), 421-7.

LANDZBERG M, DOERING H, ABOODI GM, TENENBAUM HC, GLOGAUER M (2015) Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease. *J Periodontol Res*, 50(3), 330–36.

LEE J, TANEJA V, VASSALLO R (2012) Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*, 91(2), 142-49.

LEE WL, HARRISON RE, GRINSTEIN S (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*, 5(14), 1299-306.

LIN HH, MURRAY M, COHEN T, COLIJN C, EZZATI M (2008) Effects of smoking and solid-fuel use on COPD, lung cancer, and tuberculosis in China: a time-based, multiple risk factor, modelling study. *Lancet*, 372(9648), 1473-83.

LIOU TG, CAMPBELL EJ (1996) Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. *J Immunol*, 157, 2624-31

LOE H, SILNESS J (1963) Periodontal Disease In Pregnancy. I. Prevalence And Severity. *Acta Odontol Scand*, 21, 533-51.

LOOS BG (2005) Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*, 76(11), 2106-15.

LOOS BG, CRAANDIJK J, HOEK FJ, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER VELDEN U. (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*, 71(10), 1528-34.

LU X, CAI J, KONG H, WU M, HUA R, ZHAO M, LIU J, XU G (2003) Analysis of cigarette smoke condensates by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry I acidic fraction. *Anal Chem*, 75(17), 4441-51.

LUZZI LI, GREGHI SL, PASSANEZI E, SANTANA AC, LAURIS JR, CESTARI TM (2007) Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers. *J Appl Oral Sci*, 15(6), 512-7.

MACEY MG, MCCARTHY DA, HOWELLS GL, CURTIS MA, KING G, NEWLAND AC (1998) Multiparameter flow cytometric analysis of polymorphonuclear leucocytes in whole blood from patients with adult rapidly progressive periodontitis reveals low expression of the adhesion molecule L-selectin (Cd62L). *Cytometry*, 34(3), 152-8.

MARTINEZ-CANUT P, LORCA A, MAGAN R (1995) Smoking and periodontal disease severity. *J Clin Periodontol*, 22(10), 743-9.

MASUDA S, SHIMIZU S, MATSUO J, NISHIBATA Y, KUSUNOKI Y, HATTANDA F, SHIDA H, NAKAZAW D, TOMARU U, ATSUMI T, ISHIZU A (2017) Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*, 91(8), 822-9.



- MATTHEWS JB, WRIGHT HJ, ROBERTS A, COOPER PR, CHAPPLE IL (2007) Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol*, 147(2), 255-64.
- MATTHEWS JB, WRIGHT HJ, ROBERTS A, LING-MOUNTFORD N, COOPER PR, CHAPPLE IL (2007) Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *J Dent Res*, 86(8), 718-22.
- MAYADAS TN, CULLERE X, LOWELL CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9, 181–218.
- METTRAUX GR, GUSBERTI FA, GRAF H (1984) Oxygen tension (pO<sub>2</sub>) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol*, 55(9), 516–21.
- MISHALIAN I, GRANOT Z, FRIDLENDER ZG (2017) The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 222(1), 82-88.
- MOLLOY S (2006) Bacterial pathogenesis: escaping the net. *Nat Rev Microbiol*, 10(7), 242-3.
- MOMBELLI A, MULLER N, CIONCA N (2012) The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*, 23(6), 67–76.
- MULLALLY BH (2004) The influence of tobacco smoking on the onset of periodontitis in young persons. *Tob Induc Dis*, 2(2), 53-65.
- MURPHY KM, TRAVERS P, WALPORT M (2007) Chapter 2: Innate immunity. Janeway's immunobiology 7th Edition, Eds: AUSTIN P, LAWRENCE E, GIBBS S, HUNT EMMA, MORALES M. p: 48-49.
- NAKAMURA T, EBIHARA I, SHIMADA N, KOIDE H (1998) Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clinica Chimica Acta*, 276, 173–177.
- NAUSEEF WM, BORREGAARD N (2014) Neutrophils at work. *Nat Immunol*, 15(7), 602-11.
- NEEDLEMAN I, GARCIA R, GKRIANAS N, KIRKWOOD KL, KOCHER T, IORIO AD, MORENO F, PETRIE A (2018) Mean annual attachment, bone level and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol*, 45(20), 112-9.
- NETEA MG, JOOSTEN LA, LATZ E, MILLS KH, NATOLI G, STUNNENBERG HG, O'NEILL LA, XAVIER RJ (2016) Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 22, 352(6284):aaf1098.
- NGUYEN H, FINKELSTEIN E, REZNICK A, CROSS C, VAN DER VLIET A (2001) Cigarette smoke impairs neutrophil respiratory burst activation by aldehyde-induced thiol modifications. *Toxicology*, 160, 207–17.

NICU EA, VAN DER VELDEN U, EVERTS V, VAN WINKELHOFF AJ, ROOS D, LOOS BG (2007) Hyper-reactive PMNs in FcγRIIIa 131 H/H genotype periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 34(11), 938-45.

NOVAK KF, NOVAK MJ (2015) Clinical risk assessment. In: Carranza's Clinical Periodontology. Ed. NEWMAN MG, TAKEI HH, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA. 12th, Elsevier Saunders, Missouri, p:391-393.

NOWAK D, RUTA U, PIASECKA G (1990) Nicotine increases human polymorphonuclear leukocytes chemotactic response--a possible additional mechanism of lung injury in cigarette smokers. *Exp Pathol*, 39(1), 37-43.

OZMERIC N (2004) Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta*, 343, (1-2), 1-16.

PAGE RC, KORNMAN KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14, 9-11.

PAGE RC, SCHROEDER HE (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 34(3), 235-49.

PAGE RC, SIMS TJ, GEISLER F, ALTMAN LC, BAAB DA (1985) Defective neutrophil and monocyte motility in patients with early onset periodontitis. *Infect Immun*, 47(1), 169-75.

PALMER LJ, CHAPPLE IL, WRIGHT HJ, ROBERTS A, COOPER PR. (2012) Extracellular deoxyribonuclease production by periodontal bacteria. *J Periodontal Res*, 47(4), 439-45.

PALMER RM, SCOTT DA, MEEKIN TN, WILSON RF, POSTON RN, ODELL EW (2000) Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. *J Periodontal Res*, 34, 363-9.

PALMER RM, WILSON RF, HASAN AS, SCOTT DA (2005) Mechanisms of action of environmental factors—tobacco smoking. *J Clin Periodontol*, 32(6), 180-95.

PAPAPANOU PN, SANZ M, BUDUNELI N, DEITRICH T, FERES M, FINE DH, FLEMMIG TF, GARCIA R, GIANNOBILE WV, GRAZIANI F, GREENWELL H, HERRERA D, KAO RT, PERRICONE C, VERSINI M, BEN-AMI D, GERTEL S, WATAD A, SEGEL MJ, CECCARELLI F, CONTI F, CANTARINI L, BOGDANOS DP, ANTONELLI A, AMITAL H, VALESINI G, SHOENFELD Y (2016) Smoke and autoimmunity: The fire behind the disease. *Autoimmun Rev*, 15(4), 354-74.

PAYNE JB, JOHNSON GK, REINHARDT RA, DYER JK, MAZE CA, DUNNING DG (1996) Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. *J Periodontal Res*, 31(2), 99-104.

PERSSON L, BERGSTROM J, GUSTAFSSON A (2003) Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *J Periodontol*, 74(10), 1475-82.

PETERSEN PE, OGAWA H (2005) Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*, 76(12), 2187-93.

PREBER H, BERGSROM J (1985) Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontol Scand*, 43(5), 315-20.

PREBER H, BERGSTROM J (1986) The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*, 13(4), 319-323.

PRESHAW PM (2015) Periodontal pathogenesis. In: Carranza's Clinical Periodontology. Ed. NEWMAN MG, TAKEI HH, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA. 12th, Elseviers Saunders, Missouri, p:76-100.

PRESHAW PM, CHAMBRONE L, NOVAK KF (2015) Smoking and periodonal disease. In: Carranza's Clinical Periodontology. Ed. NEWMAN MG, TAKEI HH, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA. 12th, Elseviers Saunders, Missouri, p:178-85.

PRESHAW PM, TAYLOR JJ (2011) How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, 38(11), 60-84.

PRYOR WA, CHURCH DF, EVANS MD, RICE WY, HAYES JR (1990) A comparison of the free radical chemistry of tobacco-burning cigarettes and cigarettes that only heat tobacco. *Free Radic Res*, 8(3), 275-79.

PRYOR WA, STONE K (1993) Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci*, 28, 686, 12-27.

QUI SL, ZHANG H, TANG QY, BAI J, HE ZY, ZHANG JQ, LI MH, DENG JM, LIU GN, ZHONG XN (2017) Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*, 72(12), 1084-93.

QUINN MT, DELEO FR, BOKOCH GM (2007) The role of neutrophils in the immune system. In: Neutrophil methods and protocols. Ed: QUINN MT, DELEO FR, BOKOCH GM. 1st, Humana Press. *Methods Mol Bil*, p:3-11.

RAJENDRAN V, UPPOOR A (2018) A perspective on NETosis in diabetes and periodontal diseases. *J Indian Soc Periodontol*, 22(4), 290-3.

REINO DM, MAIA LP, NOVAES AB, SOUZA SL (2015) Comparative study of two surgical techniques for root coverage of large recessions in heavy smokers. *Int J Esthet Dent*, 10 (3), 456-67.

- REMIJSEN Q, KUIJPERS W, WIRAWAN E, LIPPENS S, VANDENABEELE P, VANDEN BERGHE T (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*, 18(4), 581–8.
- RENNARD SI (2004) Cigarette smoke in research. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31(5), 479-80.
- RHEU GB, JI S, RYU JJ, LEE JB, SHIN C, LEE JY, HUH JB, SHIN SW (211) Risk assessment for clinical attachment loss of periodontal tissue in Korean adults. *J Adv Prosthodont*, 3(1), 25-32.
- ROSALES C (2018) Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*, 20 (9), 113.
- ROSALES C, DEMAUREX N, LOWELL CA, URIBE-QUEROL E (2016) Neutrophils: their role in innate and adaptive immunity. *J Immunol Res*, 1469780.
- RYDER MI (2010) Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontol 2000*, 53(1), 124–37.
- SATSANGI J, SILVERBERG MS, VERMEIRE S, COLOMBEL JF (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749–53.
- SCABBIA A, CHO KS, SIGURDSSON TJ, KIM CK, TROMBELLI L (2001) Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. *J Periodontol*, 72(1), 43-9.
- SCHWARTZ J, WEISS ST (1994) Cigarette smoking and peripheral blood leukocyte differentials. *Ann Epidemiol*, 4(3), 236-42.
- SCOTT DA, KRAUSS JL (2012) Neutrophils in periodontal inflammation. *Front Oral Biol*, 15, 56-83.
- SEAGRAVE J, BARR EB, MARCH TH, NIKULA KJ (2004) Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice. *Exp Lung Res*, 30(1), 1-15.
- SEOW WK, THONG YH, NELSON RD, MACFARLANE GD, HERZBERG MC (1994) Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation*, 18(2), 119-27.
- SHI D, MENG H, XU L, ZHANG L, CHEN Z, FENG X, LU R, SUN X, REN X (2008) Systemic inflammation markers in patients with aggressive periodontitis: a pilot study. *J Periodontol*, 79, 2340–6.

SILNESS J, LOE H (1964) Periodontal Disease In Pregnancy. II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand*, 22, 121-3.

SMITH MR, KINMONTH AL, LUBEN RN (2003) Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis*, 169, 331-7.

SODER B, JIN LJ, WICKHOLM S (2002) Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29(5), 384-91.

SOEHNLEIN O (2009) Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)*, 87(12), 1157-64.

SØRENSEN LT, NIELSEN HB, KHARAZMI A, GOTTRUP F (2004) Effect of smoking and abstinence on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. *Surgery*, 136(5), 1047-53.

SURSAL N, YILDIZ K (2017) Farklı yönleriyle NETosis. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 74(4), 351-60.

TAKANE M, SUGANO N, IWASAKI H, IWANO Y, SHIMIZU N, ITO K (2002) New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *J Periodontol*, 73(5), 551-4.

TECCHIO C, CASSATELLA MA (2016) Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol*, 28(2), 119-28.

THOMAS GM, CARBO C, CURTIS BR, MARTINOD K, MAZO IB, SCHATZBERG D, CIFUNI SM, FUCHS TA, VON ANDRIAN UH, HARTWIG JH, ASTER RH, WAGNER DD (2012) Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*, 119, 6335-43.

TOMAR SL, ASTHMA S (2000) Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*, 71(5), 743-51.

TONETTI MS, GREENWELL H, KORNMAN KS (2018) Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*, 45(20), 149-61.

TOPHAM MK, PRESCOTT SM (1999) Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem*, 274, 11447-50.

TORRUNGRUANG K, GONGSAKDI V, LAOHAVIRAPHAB L, LIKITTANASOMBAT K, RATANACHAIWONG W (2012) Association between cigarette smoking and the intraoral distribution of periodontal disease in Thai men over 50 years of age. *J Investing Clin Dent*, 3(2), 135-41.

TROMBELLI L, CHO KS, KIM CK, SCAPOLI C, SCABBIA A (2003) Impaired healing response of periodontal furcation defects following flap debridement surgery in smokers. A controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 30(1), 81–87.

TSAI CC, CHEN HS, CHEN SL, HO YP, HO KY, WU YM, HUNG CC (2005) Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontol Res*, 40(5), 378–84.

TUTER G, KURTIS B, SERDAR M (2001) Interleukin-1b and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 72(7), 883–88.

TYMKIW KD, THUNELL DH, JOHNSON GK, JOLY S, BURNELL KK, CAVANAUGH JE, BROGDEN KA, GUTHMILLER JM (2011) Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38(3), 219–28.

URBAN CF, REICHARD U, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8(4), 668-76.

URIBE-QUEROL E, ROSALES C (2015) Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res*, 2015:983698.

VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS K (2009) Tobacco smoke: Involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*, 6(2), 445–62.

VAN DYKE T, SERHAN C (2003) Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 82, 82-90.

VAN DYKE TE, WARBINGTON M, GARDNER M, OFFENBACHER S (1990) Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in LJP. *J Periodontol*, 61(3), 180-4.

VAN EEDEN SF, HOGG JC (2000) The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J*, 15, 915–21.

VITKOV L, KLAPPACHER M, HANNIG M, KRAUTGARTNER WD (2009) Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodont Res*, 44(5), 664-72.

VON VIETINGHOFF S, LEY K (2008) Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol*, 181(8), 5183–88.

WAN CP, LEUNG WK, WONG MC, WONG RM, WAN P, LO EC, CORBET EF (2009) Effects of smoking on healing response to non-surgical periodontal therapy: a multilevel modelling analysis. *J Clin Periodontol*, 36(3), 229-39.

WANG Y, LI M, STADLER S, CORELL S, LI P, WANG D, HAYAMA R, LEONELLI L, HAN H, GRIGORYEV SA, ALLIS CD, COONROD SA (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 184(2), 205-13.

WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 2, 115(5), 1111-9.

WHITE PC, CHICCA IJ, COOPER PR, MILWARD MR, CHAPPLE IL (2016) Neutrophil extracellular traps in periodontitis: a web of intrigue. *J Dent Res*, 95(1), 26-34

WHITE PC, HIRSCHFELD J, MILWARD MR, COOPER PR, WRIGHT HJ, MATTHEWS JB, CHAPPLE ILC (2018) Cigarette smoke modifies neutrophil chemotaxis, neutrophil extracellular trap formation and inflammatory response-related gene expression. *J Periodontol Res*, 53(4), 525-35.

WHITE P, SAKELLARI D, ROBERTS H, RISAFI I, LING M, COOPER P, MILWARD M, CHAPPLE I (2016) Peripheral blood neutrophil extracellular trap production and degradation in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 43(12), 1041-49.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015) WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/156262/1/9789241564922\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/156262/1/9789241564922_eng.pdf?ua=1).

YAMAGUCHI Y, HAGINAKA J, MORIMOTO S, FUJIOKA Y, KUNITOMO M (2005) Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest*, 35(3), 186-93.

YILDIZ K, GOKPINAR S, GAZYAGCI AN, BABUR C, SURSAL N, AZKUR AK (2017) Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 189, 1-10.

ZAPPACOSTA B, PERSICILLI S, MINUCCI A, STASIO ED, CARLINO P, PAGLIARI G, GIARDINA B, SOLE PD (2001) Effect of aqueous cigarette smoke extract on the chemiluminescence kinetics of polymorphonuclear leukocytes and on their glycolytic and phagocytic activity. *Luminescence*, 16(5), 315-9.

ZHANG W, FANG M, SONG F, WINDSOR LJ (2011) Effects of cigarette smoke condensate and nicotine on human gingival fibroblast-mediated collagen degradation. *J Periodontol*, 82(7), 1071-9

## EKLER

### EK 1. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

#### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisli Bireylerde Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun Değerlendirilmesi,
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	Yenişehir Mahallesi Tahsin Duru Caddesi No:14 YAŞİHAN/KIRIKKALE
	TELEFON	0 318 333 50 10/5733
	FAKS	0 318 224 07 86
	E-POSTA	ketik@kku.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hatice Ebru OLGUN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Periodontoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	TUBİTAK			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	TUBİTAK			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.





KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisi Bireylerde Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun Değerlendirilmesi,
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Eylül 2017	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Eylül 2017	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Eylül 2017	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
	DİĞER	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	<b>Karar No:19/02</b>		<b>Tarih: 24.10.2017</b>			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki			Katılım *	İmza
Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ	Göğüs Hastalıkları	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Figen ÇOŞKUN	Acil Tıp	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Hakan BOYUNAĞA	Tıbbi Biyokimya	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. H. Ebru OLGUN	Periodontoloji	Kırıkkale Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. M. Faik ÖZVEREN	Beyin ve Sinir Cerrahisi	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Meral SAYGUN	Halk Sağlığı	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Gülten KARACA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Aslı Fahriye CEYLAN IŞIK	Tıbbi Farmakoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ  
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisi Bireylerde Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun Değerlendirilmesi,
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Doç. Dr. Gökçe ŞİMŞEK	KBB	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd.Doç. Dr. Faruk Metin ÇOMU	Fizyoloji	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLIVANLI	Genel Cerrahi	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Ecz. Burhan BİRİCİ	Serbest Eczacı	Kırıkkale- Merkez	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Av. Halil MUTLU	Hukuk	Kırıkkale-Merkez	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yakup DOĞAN	Fakülte Sekreteri	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Mehmet Savaş EKİCİ  
İmza:

*[Signature]*

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.




29.12.2017

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne

KIRIKKALE

“Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisli Bireylerde Nötrofil Hücre Dışı Tuzak Oluşumunun Değerlendirilmesi” isimli projede üç örnekte insan PMN’inde gelişen nötrofil hücre dışı tuzak yapılarında histon, nötrofil elastaz ve myeloperoksidazın görüntülenmesi amacıyla fotoğraf ataçmanlı floresans mikroskop kullanımı için hizmet alımı yapmayı istiyoruz.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

  
Prof. Dr. Ebru OLGUN  
Kırıkkale Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Periodontoloji AD  
Öğretim Üyesi



## ÖZGEÇMİŞ

10.12.1991 tarihinde Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Toplu Konut İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimimi Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2009 yılında başladığım Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2014 yılında mezun oldum. 2015 yılında Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda başladığım uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim.

