

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DİŞETİ OLUĞU SIVISI (DOS) LL-37 VE SERUM VİTAMİN D_3 SEVİYELERİNİN SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KRONİK PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

ELİFCAN KIVRAK

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

EYLÜL 2015


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

DİŞETİ OLUĞU SIVISI (DOS) LL-37 VE SERUM VİTAMİN D_3 SEVİYELERİNİN SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KRONİK PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

ELİFCAN KIVRAK

DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EYLÜL 2015

Elifcan KIVRAK tarafından hazırlanan "Dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37 ve serum vitamin D_3 seviyelerinin sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda değerlendirilmesi'" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUGU ile Gazi Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr.Gülay TÜTER
Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Başkan: Prof.Dr.Gönen ÖZCAN
Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. .....

Üye: Prof.Dr.Feriha ÇAĞLAYAN
Periodontoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/ .....

Üye: Prof.Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL
İmmunoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/ .....

Üye: Prof.Dr.Nilgün Özlem ALPTEKİN
Periodontoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. .....

Tez Savunma Tarihi: 09.09.2015
Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.....

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Elifcan KIVRAK

09.09.2015

DİŞETİ OLUĞU SIVISI (DOS) LL-37 VE SERUM VİTAMİN D_3 SEVİYELERİNİN SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN KRONİK PERİODONTİTİSLİ HASTALARDA DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Elifcan KIVRAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2015

ÖZET

Çalışmamızın amacı sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastaların dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin değerlendirilmesi ve klinik parametreler arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Sigara içen ve sigara içmeyen kronik periodontitisli ve periodontal sağlıklı bireyin plak indeks (PI), gingival indeks (GI), cep derinliği (CD), klinik ataşman seviyesi (KAS) ölçümleri ile DOS ve serum örnekleri başlangıç seansında elde edildi. DOS LL-37 seviyeleri ELISA analizi ile, serum vitamin D3 seviyeleri ise Yüksek Performans Sıvı Kromotografisi (HPLC) ile saptandı. Sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildi. DOS LL-37 değerleri, sigara içen ve içmeyen kronik periodontitis gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek bulundu, ancak sigara içen ve içmeyen periodontitis gruplari arasinda farklılık saptanmadı ($p<0,005$). DOS LL-37 ile PI, GI, CD, KAS ölçümleri arasında anlamlı korelasyon bulundu. Sigara içen periodontitis grubunda DOS LL-37 ile serum vitamin D seviyeleri arasında anlamlı korelasyon gözlendi ($r=0,510$). Vitamin D ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmedi. Periodontitis gruplarında tüm klinik parametreler kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulundu ($p<0.001$). PI, CD ve KAS ölçümleri sigara içen grupta içmeyen gruba oranla daha yüksekti. Verilerimize göre sigara içen kronik periodontitisli hastalarda DOS LL-37 seviyesi artış eğilimindedir.DOS LL-37 seviyelerinin kronik periodontitis varlığında yüksek oluşu katelisidinin periodontal inflamasyon esnasında konak immün yanıtında rol oynayabildiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1048
Anahtar kelimeler : Kronik periodontitis, Katelisidin LL-37, Vitamin D, Sigara
Sayfa adedi : 141
Danışman : Prof.Dr.Gülay TÜTER

EVALUATION OF GINGIVAL CREVICULAR FLUID (GCF) LEVELS OF LL-37 AND SERUM VITAMIN D_3 LEVELS IN SMOKER AND NONSMOKER PATIENTS WITH CHRONIC PERIODONTITIS

(Ph.D. Thesis)

Elifcan KIVRAK

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2015

ABSTRACT

Cathelicidin LL-37, an antimicrobial peptide, is part of the host innate immune response in the oral cavity. The aims of this study are to evaluate; gingival crevicular fluid (GCF) levels of LL-37 and serum vitamin D3 levels and clinical parameters in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis. Plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD) and clincal attachment level (CAL) measurements, GCF and blood serum samples were collected from smoker (n:20) and non-smoker (n:20) patients with chronic periodontitis and periodontally healthy (n:20) control subjects at baseline. GCF levels of LL-37 were measured by ELISA and serum levels of vitamin D_3 were analysed by High-performance liquid chromatography (HPLC). Statistical analysis were performed. GCF levels of LL-37 have been found significantly higher in chronic periodontitis groups than control subjects but no significant difference was found between smoking and non-smoking periodontitis groups ($p<0.05$). There was a positive correlation between GCF LL-37 and vitamin D levels in smoker chronic periodontitis group ($p<0.01$). All clinical parameters were found correlated with GCF LL-37 levels. PI,GI,PD,CAL measurements were significantly higher in both chronic periodontitis groups than controls ($p<0.05$). Vitamin D can act as a potent stimulater of LL-37 in DOS. Elevated levels of GCF cathelicidin LL-37 in chronic periodontitis suggest that it may play a role in the host innate immune response during periodontal inflammation.

Science Code : 1048
Key Words : Chronic periodontitis, Cathelicidin LL-37, Vitamin D, Smoking
Page :141
Supervisior : Prof.Dr. Gülay TÜTER

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimizden bu yana, tüm öğrencilerinden desteğini esirgemeyerek, derin bilgi ve tecrübeleri sayesinde donanımlı ve özverili iyi bir hekim olabilmenin yolunu sabırla çizen, doktora eğitimim süresince her anlamda yanımda olan, anlayışı ve hoşgörüsü ile hayatın her alanında iletişimimizi güzel kılabilen, haksızlığa boyun eğmeyen yapısı ve adaletli bakış açısı ile yaşamımda her zaman örnek alacağım, üzerimdeki emeklerinin hakkını ödeyemeyeceğim ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam ve danışmanım sayın Prof.Dr.Gülay TÜTER'e;

Doktora eğitimine başladığım ilk günden itibaren desteğini, samimiyetini ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen hocam sayın Prof.Dr.Gönen ÖZCAN'a;

Gerek klinik, gerekse akademik anlamda bilgi ve tecrübelerini her zaman paylaşmaktan çekinmeyen ve yol gösteren sayın Prof.Dr.Bülent KURTİŞ'e;

Doktora eğitimime başladığım günden beri desteğini ve güvenini hissettiğim, bilgi ve birikimlerini hoş sohbeti ile bizden esirgemeyen sayın Prof.Dr.Kaya EREN'e;

Doktora tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen ve büyük emekleri olan sayın Prof. Dr. Muhittin SERDAR'a;

Doktora eğitimim süresince her zaman gösterdiği samimiyeti, güler yüzü ve desteği ile birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sayın Yrd.Doç.Dr.Adil BAŞMAN'a;

Tez çalışmamın şekillenmesinde önemli safhalarda yer alan ve oldukça emek harcayan Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı akademik personeline ve Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı personeline;

Yoğun klinik çalışma temposu ile birlikte doktora tez çalışması sürecinde manevi destek olarak her zaman yüzümü güldüren ve motivasyonumu sağlayan tüm hikayelere, şiirlere, şarkılara, filmlere, Amelie Poulain'e ve Mabel'e;

Sadece eğitim ve öğretim hayatım boyunca değil, hayatın her alanında kendimi güvende hissetmemi sağlayan, zorlu doktora sürecinde de anlayışları ve destekleri ile hep yanımda olan, sonsuz emek ve sevgisiyle beni bugünlere getiren, üzerimdeki emeklerini ve haklarını asla ödeyemeyeceğim annem Nezihe KIVRAK'a, babam Atilla KIVRAK'a ve varlığı ile yaşamımıza renk katan sevgili kardeşim Alper KIVRAK'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 03/2011-27 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Gingivitis 7

2.2. Periodontitis 8

2.2.1. Kronik periodontitis 9

2.2.2. Kronik periodontitisin klinik, radyolojik ve histolojik bulguları 9

2.3. Periodontal Hastalık Patogenezi 10

2.4 Antimikrobiyal Peptitler 14

2.4.1. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin etki mekanizmaları 16

2.5. Katelisidinler 17

2.5.1. İnsan katyonik antimikrobiyal peptidi – (hCAP18/LL-37) 17

2.5.2. Katelisidin LL-37 Moleküler Yapısı 18

2.5.3. Katelisidin LL-37 gen düzenlenmesi 19

2.5.4. Katelisidin LL-37'nin sentezlenmesi 20

2.5.5 Katelisidin LL-37'nin antimikrobiyal etki mekanizması 21

2.5.6. Katelisidin LL-37'nin immün sistemdeki antimikrobiyal fonksiyonları 22

Sayfa

2.5.7. Katelisidin LL-37 ve periodontal hastalıklar 26
2.5.8. Katelisidin LL-37 salınımının düzenlenmesi 30
2.6. Vitamin D 31
2.6.1. Vitamin D3 ve periodontitis ilişkisi 34
2.6.2. Vitamin D3 ve katelisidin LL-37 ilişkisi 36
2.7. Sigara ve Periodontitis İlişkisi 38
2.8. Dişeti Oluğu Sıvısı ve Periodontitis İlişkisi 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 43
3.1.Hasta Seçimi 43
3.2. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri 43
3.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri 45
3.4. Çalışma Gruplarının Oluşturulması 45
3.5. Çalışma Dizaynı 46
3.6. Klinik Periodontal Kayıtlar 47
3.6.1. Plak İndeksi (PI) (Silness ve Löe 1964) 47
3.6.2. Gingival indeks (GI, Löe ve Silness 1963) 48
3.6.3. Sondlanabilen Cep Derinliği (SCD) 49
3.6.4. Klinik Ataşman Seviyesi (KAS) 49
3.7. Radyografik Değerlendirme 50
3.8. Biyokimyasal Analizler için Örneklerin Toplanması 50
3.8.1 Dişeti Oluğu Sıvısı Toplanması ve DOS Hacim Ölçümü 50
3.8.2. Kan Örneklerinin Toplanması 51
3.9. Oral Hijyen Eğitimi ve Periodontal Tedavi 51
3.10. Laboratuvar İşlemleri 52
3.10.1. DOS Örneklerinin ELISA İçin Hazırlanması 52
3.10.2. Örneklerden ELISA ile Katelisidin LL-37 Tayin Protokolü 53

Sayfa

3.10.3. Serum Örneklerinden HPLC ile Vitamin D Tayini 54
3.11 İstatistiksel Analiz 54
4. BULGULAR 57
4.1. Klinik Bulgular 57
4.2. Laboratuvar Bulguları 60
4.3. Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri 63
4.3.1. KP-1 Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri 65
4.3.2. KP-2 Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri 66
4.3.3. K Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri 67
5. TARTIŞMA 69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 89
KAYNAKLAR 93
EKLER 131
EK-1. Etik Kurul Raporu 132
Ek-2. Hasta anamnez formu 133
Ek-3. Periodontal Klinik İndeks Formu 135
Ek-4. Hasta onam formu 136
ÖZGEÇMİŞ 138

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1.1999 Uluslararası Periodontoloji Workshop'unda kabul edilen şekliyle periodontal hastalıkların ve durumların sınıflandırılması... 6

Çizelge 2.2. Katelisidin LL-37 salınımını uyaran faktörler..... 31

Çizelge 3.1. Çalışma Grupları 46

Çizelge 3.2. Sillness ve Löe ' nün plak indeksi skorları ve kriterleri..... 47

Çizelge 3.3. Löe ve Sillness' in gingival indeks skorları ve kriterleri 48

Çizelge 4.1. Gruplara göre olguların demografik verileri..... 57

Çizelge 4.2. Tüm gruplara ait tüm ağız periodontal klinik kayıtlar..... 58

Çizelge 4.3. Tüm gruplara ait örnek bölgesi periodontal klinik kayıtlar ve DOS hacmi..... 59

Çizelge 4.4.Tüm Gruplara ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri..... 64

Çizelge 4.5. KP-1 Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri..... 65

Çizelge 4.6. KP-2 Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri..... 67

Çizelge 4.7. K Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri..... 68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. hCAP18/LL-37 peptit yapısı 18

Şekil 2.2. Katelisidin LL-37'nin 3 boyutlu yapısı A) Peptidin N ve C terminal uçları B) Hidrofobik yüzeyler (altın rengi) 19

Şekil 2.3. Katelisidinlerin gen ve protein yapısının şematik olarak görünümü. Olgun katelisidin peptitleri: a) α-helezonlu b) sisteinden zengin c) triptofandan zengin d) prolinden zengin peptitler] 20

Şekil 2.4. İnsan katelisidinin (LL-37) antimikrobiyal etki mekanizması 22

Şekil 2.5. Katelisidin LL-37'nin immün sistemdeki anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar fonksiyonları 24

Şekil 2.6. Vitamin D sentezi 33

Şekil 4.1. Tüm gruplara ait DOS LL-37 konsantrasyon ölçümleri 60

Şekil 4.2. Tüm gruplara ait DOS LL-37 Total Ölçümleri 61

Şekil 4.3. Sigara içen ve içmeyen Kronik Periodontitis ve Kontrol Gruplarının serum vitamin D3 Ölçümleri 62

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Morbus Kostman Sendromlu hastanın farklı yaşlarda kaydedilen ve ağız içi fotoğrafları ve radyografileri..... 27

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
bp	Baz çifti
kDA	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
ml	mililitre
µl	mikrolitre
ng	nanogram
pg	pikogram

Kısaltmalar	Açıklama
AAP	American Academy of Periodontology
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
APD	Antimicrobial Peptide Database
BMD	Bone mineral density
BMI	Body mass index
DOS	Dişeti oluğu sıvısı
DVBP	D vitamini bağlayıcı protein
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FPRL	Formyl peptide receptor-like
HIV	Human Immunodeficiency Virus

Kısaltmalar	Açıklama
HPLC	High-performance liquid chromatography
Ig	İmmünglobülin
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkarit
MIK	Minimum İnhibitör konsantrasyon
NK	Natural Killer
PGE2	Prostagandin E2
PLS	Papillon Le-Fevre Sendromu
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
TLR	Toll like reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
UVB	Ulltraviyole B
VDR	Vitamin D reseptörü
VDRE	Vitamin D cevap elementi
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ

Periodontitis, mikroorganizmalara karşı inflamatuvar hücreler ve çeşitli sitokinler aracılığıyla geliştirilen konak cevabı sonucu oluşan bağ dokusu yıkımı, ataşman kaybı ve alveoler kemik rezorpsiyonu ile karakterize multifaktöriyel ve kronik seyir gösteren bir hastalık özelliği taşımaktadır. Periodontal hastalıklarda primer etiyolojik faktör bakteriyel dental plaktır ve dental plak bir biyofilm tabakası halinde bulunur. Etiyolojide, mikrobiyal dental plağın yanısıra çevresel ve genetik faktörler de rol oynamaktadır. Biofilm tabakasında yer alan bakteriler immün yanıtın ilk basamağı olan doğal immün sistemi harekete geçirirler. Doğal immün mekanizma ile gelişen enflamatuvar yanıt, bakterilerin konak dokusuna geçişini önlemeye çalışır [1].

Doğal immün sistemin temel yapılarından bir tanesi de epitel hücreleri olup, diğer savunma hücreleri ile birlikte periodontal yıkıma yol açan olayları başlatan mikrobiyal irritasyonu azaltma doğrultusunda rol oynar. Yapılan araştırmalarda bu epitel örtüsünün enfeksiyona karşı fiziksel bir bariyer sağladığı ve doğal konak savunmasında aktif rol oynadığı anlaşılmıştır [2]. Epitel hücreleri, istilacı mikroorganizmaları kontrol altında tutan ve sağlıklı mukozanın mikrobiyal ekolojisini devam ettiren doğal antimikrobiyal peptidleri de üretirler. Bu nedenle epitel, doğal ve kazanılmış immün yanıtlarda rol alır. Epitelde yer alan antimikrobiyal peptidler, bu karmaşık çevre içerisinde hastalık ve sağlık arasındaki dengeyi devam ettirmede kritik rol oynarlar. Bakteriyel flora başlangıç olarak oral epitel, tükrük ve dişeti oluğu sıvısında (DOS) doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilir ve bu bölgeler antimikrobiyal protein ve peptitlerden (AMP) zengindir [3-5].

Bu peptitler kalıtımsal immün sistemin önemli molekülleridir. AMP'ler fagositozu artırabilir, prostaglandin (PG) salınımını stimüle eder, lipopolisakkarit (LPS)'lerin septik etkisini nötralize eder, inflamatuar bölgelerde çeşitli immün hücrelerin akümülasyonunu ve olaya katılımını geliştirir, anjiogenezisi artırır ve yara iyileşmesini indükler. AMP'ler boyut, aminoasit dizisi ve belli yapısal özellikler açısından farklılık gösterirler. Çoğu AMP, ayrı hidrofobik ve yüklü bölgeleri olan katyonik moleküllerdir. *İn vivo* ortamda son derece aktif olan antimikrobiyel

peptidlerin *in vitro* ortamda da bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde etkili olabileceği düşünülmektedir ve bu doğrultuda çalışmalar sürdürülmektedir [6].

AMP'ler içinde en fazla öne çıkan grup doğal bağışıklıkta konak savunmasının önemli unsurlarından biri olan antimikrobik etkili katyonik peptitlerdir. Katyonik peptitler özellikle, kullanımda olan pek çok antibiyotiğe karşı yüksek düzeyde dirençli bulunan bakteri suşları üzerine olan etkileri ve antibiyotiklerle meydana getirdikleri sinerjist etkileri ile oldukça ümit vaad etmektedirler [7]. Katyonik antimikrobiyal peptidler doğal immun yanıtın anahtar bileşenleridir ve tipik olarak bakterisid ve/veya bakteriyostatiklerdir. Katyonik peptitler katelisidinler, defensinler, adrenomedulin, histatin 1 ve 3, staterin, C-C motif kemokin 28, azurosidin şeklinde sıralanabilir [3].

Katelisidinler, yapısal olarak belirgin farklılılar taşıyan ve çeşitli memeli türlerinde tespit edilmiş olan bir katyonik antimikrobiyal peptit ailesi üyesidir [8]. Farklı vücut sıvılarında da bulunan katelisidinler DOS'da, serumda, solunum yolu yüzey sıvısında, enfeksiyon ve enflamasyon sırasında yara sıvısında yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir. Katelisidinler, konak savunmasının başlangıç safhasında önemli rol oynar. İnsan solunum yollarında bulunan katelisidinler, bu bölgedeki epitel hücreleri, lenfositler, nötrofiller ve makrofajlardan kaynaklanır [9].

Moleküler ağırlığı 18 kilodalton (kDA) olan ve insan katyonik antibakteriyel proteini olarak bilinen tek insan katelisidin proteini (hCAP-18) aktif hale geldiğinde katelisidin LL-37 olarak adlandırılır ve bu şekilde antimikrobiyal ve immun modülatör etkiden sorumludur. Katelisidin tipi antimikrobiyal peptid için sadece bir tane gen (CAMP) mevcuttur ve bu gen bakterisidal peptidi kodlar. LL-37 çeşitli dokularda geniş bir antimikrobiyal spektrum ile antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparazit ve antikanser özellikler taşımaktadır. LL-37; endojen antibiyotik etkisinin yanı sıra LPS'lere yüksek afinite gösterir ve LPS'lerin biyoaktivitesini nötralize eder [9]. Gram pozitif ve gram negatif birçok periodontopatojene karşı savunmada görevli olan LL-37 seviyelerinin, inflame olmuş dokularda ve periodontitiste DOS'da artış gösterdiği belirtilmektedir [10, 11]. Katelisidin LL-37'nin doku-spesifik biyosentezi, mikrobiyal, enflamatuvar ve gelişimsel birçok uyaran tarafından düzenlenmektedir [12].

Vitamin D, ultraviyole B (UVB) ışığına maruz kaldığında ya da gıdayla ve dışarıdan destek olarak alındığında deride bulunan 7-dehidrokolesterolden üretilen sekosteroid bir hormondur. Daha sonra karaciğerde hidroksi vitamin D (25(OH)D)'ye dönüşür ve böbreklere gelerek, bağırsakta kalsiyum emilimi ile ilişkili aktif hormon olan 1,25 dihidroksivitamin D3 'e ($1,25(OH)_2D_3$) hidroksilize edilir. Vitamin D3'ün hormonal formu olan aktif 1,25-dihidroksi vitamin D3 bir immün sistem modülatörüdür [13]. Yapılan çalışmalarda, $1,25(OH)_2D_3$'ün antimikrobiyal doğal immün cevapların direkt düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir [14, 15]. İnsan katelisidin antimikrobiyal peptit (CAMP) ve defensin β2 (hBD2) genleri $1,25(OH)_2D_3$ bağımlı gen salınımını yönlendiren vitamin D cevap elementlerini (VDRE) içerir. $1,25(OH)_2D_3$ izole edilmiş insan keratinositi, monosit ve nötrofillerde antimikrobiyal peptit gen salınımını indükler ve LPS'ler ile sinerjist olarak nötrofillerde CAMP salınımını uyarır. 1,25 dihidroksi vitamin D3 konak savunmasının epitelde gerçekleştirdiği fiziksel bariyer fonksiyonunda görevlidir. Hücreler arası bağlantı tiplerini güçlendirerek ve hücreler arası iletişimi ilerleterek fiziksel bariyer fonksiyonu sağlar [16]. 1,25 dihidroksi vitamin D3 LL-37 aracılığı ile endotoksinlerin nötralizasyonunu sağlar [17, 18].

Yapılan çalışmalarda sigaranın da periodontal hastalıklarda çevresel bir risk faktörü olarak kabul edildiği belirtilmektedir [19-21]. Sigara oral çevre ekolojisini gingival dokuları ve vaskülariteyi, beraberinde de konak immün cevabını etkilemektedir. Sigara içimi periodontal ataşman ve kemik kaybı riski için 2-7 kat artmış risk ile ilişkilendirilmiştir [22]. Sigaraya bağlı olarak periodontal yıkımın prevelans ve şiddetinin artması normal olarak kronik periodontitiste görülen konak-bakteri ilişkisini değiştirmekte ve daha agresif bir yıkıma neden olmaktadır. Bakteriyel durum ve konak yanıtı arasındaki dengenin bozulması; subgingival plağın kompozisyonunda meydana gelen değişiklikler sonucunda patojenik mikroorganizmaların sayı ve virulans olarak artmasına ve bakteriyel değişime karşı konak yanıtındaki değişikliklere veya her ikisine birden bağlı olabilir. Sigara içen bireylerin tükürük veya periferal kanlarından izole edilen nötrofillerin, kemotaksis, fagositoz ve oksidatif mekanizma gibi fonksiyonel özelliklerinde değişimler meydana geldiği belirtilmiştir [23, 24].

Günümüzde birçok antimikrobiyal peptit ve proteinler insanlarda çeşitli hastalıkların tanı ve teşhisindeki potansiyel uygulamaları ve konak savunmasındaki fonksiyonel rolleri sebebiyle araştırmaya değer bulunmaktadır. AMP'lerin salınım seviyelerindeki belirgin varyasyonların, bakteriyel enfeksiyonların dışında, egzema ve kanser gibi önemli hastalıkların derecesini tespite etmede de biomarker olarak görev yapabildikleri gösterilmiştir [25-29].

Literatür incelendiğinde günümüze değin çeşitli periodontal hastalık tiplerinde, farklı enflamasyon derecelerine sahip dişeti dokularında katelisidin LL-37 salınımını inceleyen sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir [10, 29-34]. Çeşitli insan doku örneklerinde katelisidin LL-37 salınımının vitamin D3 tarafından yönlendirilebildiği gösterilmiş olmasına karşın [35-40] sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli bireylerde serum vitamin D3 ile DOS LL-37 seviyelerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışmamızın bir ilk olacağı ve periodontal hastalık patogenezinde antimikrobiyal peptitlerin, sigaranın ve vitamin D'nin etkilerinin daha iyi anlaşılması adına bilime katkı sağlayacağı inancındayız.

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığında planlanan çalışmamızda sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda DOS LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin değerlendirilmesi ve klinik parametreler ile biyokimyasal veriler arasındaki olası korelasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Periodonsiyum; dişeti, alveol kemiği, periodontal ligament ve sementten oluşan ve dişi destekleyen yapılar bütünüdür. Bu yapıları etkileyen hastalıklar ise "periodontal hastalıklar" olarak adlandırılmaktadır [41, 42]. Dişeti oluğuna komşu diş yüzeyine tutunan mikobiyal dental plak içerisindeki mikroorganizmalar, periodontal hastalıkların gelişiminde etkin bir rol oynar. Dental plak içerisindeki organizmaların metabolik fonksiyonu ve ürünlerinin yanı sıra konak dokuda bakteriyel ürünlere karşı gelişen iltihabi cevabın karakteri ve şiddeti de periodontal hastalık gelişimine katkı sağlayan temel faktörlerdendir [43].

Dişeti cebi içerisine yerleşen bakterilerin burada çoğalmasının ardından birleşim epitelinde enflamatuvar cevap oluşur ve vazodilatasyon, permeabilite artışı ile birlikte enflamatuvar hücrelerin bu bölgedeki sayısında artış görülmeye başlar [44]. Bu durum klinikte dişetlerinde kanama, ödem, renk değişikliği ile kendini gösterir ve "gingivitis" olarak adlandırılır [45]. İnflamasyon şiddetinin artışı ile birlikte, periodontal ligament ve alveol kemiği gibi dişi destekleyen dokularda kayıplar ve periodontal cep gelişimi ile karakterize "periodontitis" tablosu gelişir [46].

Periodontal hastalıklar, sürekli aynı şekilde ve aynı şiddetle ilerleyen yapıda değildir; birbirini izleyen, bağ dokusu ve alveoler kemik yıkımının olduğu aktif dönem ve kısmen bir miktar tamirin olduğu pasif dönemlerden oluşan epizodik tarzda bir ilerleme göstermektedir [47]. Periodontal hastalıkların epizodik ve kronik tabiatının yanı sıra bireyler arasında farklı ilerleme gösterebileceği gibi; aynı bireyde, farklı dişlerde hastalığın şiddeti ve yaygınlığı farklı olabilir. Hastalığın teşhisinde kullanılan; sondlanabilen cep derinliği ölçümü, ataşman kaybı miktarı, dişeti kanamasının olup olmaması, alveol kemiğinin seviyesinin radyografik olarak değerlendirilmesi gibi ölçümler geçmişte oluşan yıkım hakkında bilgi verirken; hastalığın aktif ve inaktif evrelerinin kesin ayrımı hakkında sınırlı düzeyde bilgi sağlayabilir [48, 49].

Gingival dokular, sürekli olarak mekanik ve bakteriyel irritasyona maruz kalmaktadır. Bu etkilere karşı dişeti cebini çevreleyen epitelyal bariyer, bağlantı epiteli, tükürük, dişeti oluğu sıvısı ve polimorfonükleer lökositler (PMNL) gibi

enflamatuvar hücreler ile oluşturulan iltihabi yanıt gibi pek çok direnç mekanizması vardır [4, 50]. Bu mekanizmalar ile konak doku yıkıcı etkilerden korunmuş olur. Periodontal hastalıkların ortaya çıkışında ve seyrinde bakteri ve/veya ürünleri kadar konak dokunun bunlara karşı verdiği immün yanıt ve bunlar arasındaki denge de önemli rol oynamaktadır [51, 52].

Periodontal hastalıklar günümüze kadar çeşitli şekilerde sınıflandırılmıştır. Bugün kabul edilen son sınıflama 1999 Uluslararası Periodontoloji Workshop'unda Amerikan Periodontoloji Akademisi (AAP) tarafından kabul edilen sınıflamadır [53]. Bu sınıflama çizelge 2.1'de açıklanmıştır:

Çizelge 2.1.1999 Uluslararası Periodontoloji Workshop'unda kabul edilen şekliyle periodontal hastalıkların ve durumların sınıflandırılması [53]

I. Dişeti Hastalıkları	*IV. Sistemik hastalıkların göstergesi olan periodontitis*
A. Dental plağa bağlı dişeti hastalıkları	A. Hematolojik bozukluklarla ilişkili
1. Sadece dental plağa bağlı gingivitis	B. Genetik bozukluklarla ilişkili
2. Sistemik hastalıklar ile ilişkili dişeti hastalıkları	C. Tanımlanamamış durumlar
3. İlaçlar ile ilişkili dişeti hastalıkları	*V. Nekrotizan periodontal hastalıklar*
4. Beslenme bozukluğu ile ilişkili dişeti hastalıkları	A. Nekrotizan ülseratif gingivitis
B. Plağa bağlı olmayan dişeti hastalıkları	B. Nekrotizan ülseratif periodontitis
1. Belirli bir bakteriyel kökeni olan dişeti hastalıkları	*VI. Periodonsiyumun apseleri*
2. Viral kökenli dişeti hastalıkları	A. Dişeti apseleri
3. Mantar kökenli dişeti hastalıkları	B. Periodontal apseler
4. Genetik kökenli dişeti hastalıkları	C. Perikoronal apseler
5. Sistemik durumların dişeti bulguları	*VII. Endodontik lezyonlarla ilişkili*
6. Travmatik lezyonlar	A. Kombine periodontik-endodontik lezyonlar
7. Yabancı madde reaksiyonları	*VIII. Gelişimsel veya kazanılmış deformite ve durumlar*
8. Tanımlanamamış lezyonlar	A. Plağa bağlı dişeti hastalıklarına/ periodontitise yatkınlığı arttıran veya değiştiren lokalize dişe bağlı faktörler
II. Kronik Periodontitis	B. Dişin etrafındaki mukogingival bozukluklar ve durumlar
A. Lokalize	C. Dişsiz kretlerdeki mukogingival bozukluklar ve durumlar
B. Generalize	D. Oklüzal travma
III. Agresif Periodontitis	
A. Lokalize	
B. Generalize	

2.1. Gingivitis

Gingivitis, öncelikle dişeti kenarında kolonize olan mikrobiyal dental plak birikimine karşı konak tarafından geliştirilen immün cevap sonucunda oluşan enflamatuvar bir durumdur [54-57]. Epidemiyolojik çalışmalarda gingivitisin her yaş grubunda görülebildiği ve periodontal hastalıkların toplumda en çok görülen türü olduğu bildirilmiştir [58-60].

Gingivitisin klinik özellikleri; dişeti kenarında plak varlığı, inflamasyona bağlı olarak damarlanmanın artmasıyla dişetlerinin kırmızıya doğru renk değişimi göstermesi, bıçak sırtı formunun bozulmasıyla birlikte görülen dişetlerindeki kontur değişikliği, ödem, sondlamada kanama, hassasiyet, DOS artışı, ataşman ve kemik kaybı olmaması ve plağın uzaklaştırılması ile hastalığın geri dönüşü olarak sayılabilir. Radyografik incelemelerde periodontal destek dokularda kayıp olmadığı görülür [61-64].

1976 yılında Page ve Schroeder periodontal hastalıkların histolojik gelişimini tarif ederek gingivitiste görülen histopatolojik değişimi; başlangıç, erken, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyon olarak ayırmış ve periodontitisten farklılığını vurgulamışlardır [65]. Buna göre;

Sağlıklı Dişeti: Sağlıklı dişetinde birleşim epiteli ve bağ dokusunda çok az miktarda lökosit izlenir. Gingival sulkus son derece sığ ve birleşim epiteli düzgün yapıdadır. Düzenli kollajen fibril demetleri izlenir. Rete peg oluşumu gözlenmez. Plak miktarı çok azdır ve çoğunlukla gram (+) aerob mikroorganizmalar mevcuttur. Dişeti klinik olarak sağlıklı izlense bile bölgede her zaman az miktarda enflamatuvar hücre infiltrasyonu görülebilir [65, 66].

Başlangıç Lezyonu: Subklinik gingivitis de denilen bu aşamada dental plak bakterilerine karşı gelişen cevap klinik olarak belirgin değildir [67, 68]. Ancak plak birikiminin ilk 4 günlük sürecinde gelişen başlangıç lezyonunda bakterilerin enzimleri ve metabolik ürünlerine karşı konağın immün sistemi aktif hale gelirken, vazodilatasyon ve vasküler permeabilite artışına bağlı olarak dişetlerinde ödem meydana gelir [65, 69].

Erken Lezyon : Başlangıç lezyonunun gelişimini takiben 4-7 gün içinde gelişen bu safhada birleşim epitelinin altında enflamasyon polimorfonükleer lökosit (PMNL) migrasyonu yanı sıra, T-hücre infiltrasyonu da izlenir ve bu aşamada artık erken gingivitisten söz edilir [44]. Fibroblastlarda sitopatolojik değişikliklere ilaveten kollajen fibrillerde (%70'e kadar) kayıp saptanır [70-72]. Kan damarlarındaki morfolojik değişiklikler ve kapiller proliferasyona bağlı olarak gelişen eritem klinik olarak ta izlenir [73, 74]. Bu aşamada klinik olarak sondlamada kanama görülmesi de önemli bir bulgudur [75]. İlaveten birleşim epitelinin koronalinde ilk değişiklikler ve laterale proliferasyon başlar. Erken lezyonun süresi tam olarak saptanamazken uzun süre stabil durumda kalabilir [68].

Yerleşmiş Lezyon: Plak akümülasyonundan 2-3 hafta sonra başlayan bu kronik gingivitis aşamasında plazma hücreleri ve B lenfositler bağ doku içerisindeki baskın hücre tipidir [66, 76]. Dişetinde klinik olarak daha fazla ödem ve mavimsi kırmızı renk değişikliği ile gingivitis tüm özelliklerini sergiler [42, 77]. Kemik kaybı ve epitelyal ataşmanın kök yüzeyi boyunca apikale göçüne rastlanmayan bu evre ya aylarca ilerlemez, değişmeden kalır, ya da artan yıkımla birlikte ilerlemiş lezyon evresine geçer [78, 79].

İlerlemiş Lezyon: Bu evre yerleşmiş lezyonun periodontal ligament ve alveoler kemiği etkilemesiyle karakterizedir [70, 78]. Birleşim epitelinin apikal yönde göçü ile cep epiteli yer yer ülsere ve bağ dokusu içine uzantılar yapan periodontal cep oluşmuştur [68, 80, 81]. Mikrobiyal dental plak içindeki bakteri ve toksinlerinin osteoklastları aktive etmesi ve konak kaynaklı mediatörlerin ortama salınmasını uyarması sonucu alveoler kemik rezorbsiyonu meydana gelir [82].

2.2. Periodontitis

Periodontitis, dişeti, alveolar kemik, sement ve periodontal ligamenti içeren dişi destekleyen ve çevreleyen dokularda yıkımla karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır [83]. Periodontitis daha öncede bahsedildiği gibi AAP tarafından yapılan sınıflamaya göre agresif ve kronik periodontitis olmak üzere ikiye ayrılır.

2.2.1. Kronik periodontitis

En sık görülen periodontitis formu olan kronik periodontitis Genellikle 35 yaş ve üzeri bireylerde yaygın olarak görülmektedir. Sıklıkla plak birikimi nedeniyle gelişen hastalığın ilerleyişi bazı lokal, sistemik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ilerleyiş hızı artabilmesine karşın genelde yavaş ve orta hızda gerçekleşir [44, 84]. Epidemiyolojik çalışmalarda kronik periodontitisin görülme sıklığı farklı popülasyonlarda değişik oranlarda bulunmuştur [61, 85, 86]. Orta dereceli formu yetişkin populasyonu büyük oranda etkilerken, şiddetli periodontitis vakaları populasyonun yaklaşık %10-15'ini etkilemektedir [87, 88].

Yapılan çalışmalar periodontal hastalık ve periodontal destek doku kaybının erkeklerde kadınlara oranla daha yaygın olduğunu göstermektedir [79]. Periodontal hastalığın prevalansının, hastalıktan etkilenen bölge miktarının ve periodontal ataşman kaybı şiddetinin yaşla doğru orantılı olarak arttığı bilinmektedir [89, 90]. Kronik periodontitis genelde erişkinlerde görülmesine karşın, dental plak ve diştaşı birikimine bağlı olarak çocuklarda ve adolesan döneminde bulunan gençlerde de görülebilir [91, 92].

2.2.2. Kronik periodontitisin klinik, radyolojik ve histolojik bulguları

Klinik bulgular arasında; supra ve subgingival plak birikimi ile başlayan dişetindeki inflamasyon bulgularına ek olarak periodontal cep oluşumu, periodontal ataşman kaybı, alveoler kemik kaybı ve sondlamada kanama yanında dişetinde büyüme veya çekilme, dişte mobilite artışı, furkasyon defektleri de görülebilir [65, 93, 94].

Radyografik olarak kret tepesinde lamina dura devamlılığı bozulur, kronik periodontitisin erken dönemlerinde septal kemiğin dişe komşu mesial veya distal yüzeyinde kama seklinde radyolüsent alanlar (triangulasyon) meydana gelir. İnterdental septum yüksekliğinde azalma, vertikal ve horizontal kemik kayıpları gözlenir [95, 96].

Hastalığın histopatolojik bulguları ise periodontal cep oluşumu, birleşim epitelinin mine-sement sınırının apikaline doğru yer değiştirmesi, cep epitelinde yoğun PMNL birikimi, makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin iltihabi hücre topluluğunun oluşumu olarak özetlenebilir [50, 67, 69].

Kronik periodontitis etkilenen diş sayısına göre lokal ve generalize olarak iki gruba ayrılır. Ağızdaki dişlerin %30'undan azında ataşman ve kemik kaybı varsa lokalize periodontitis, ağızdaki dişlerin %30'undan fazlasında ataşman ve kemik kaybı varsa generalize periodontitis teşhisi konulmaktadır [53, 97]. Hastalık genellikle generalize seyirlidir. Ayrıca, bir yılda görülen ataşman kaybına göre hastalığın ilerleme hızı yavaş (1-2 mm ataşman kaybı), orta (3-4 mm ataşman kaybı) ve hızlı (5 mm den fazla ataşman kaybı) olarak gruplanabilmektedir [97].

Günümüze kadar yapılan araştırmalar sonucunda, *P.gingivalis, P. intermedia, F. nucleatum, C. rectus, E.corrodens, A. actinomycetemcomitans, T. forsythia* ve *T. denticola* gibi anaerob fakültatif bakterilerin kronik periodontitis ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiş ve bu mikroorganizmalar potansiyel periodontopatojenler olarak tanımlanmışlardır [87, 98, 99].

2.3. Periodontal Hastalık Patogenezi

Periodontal hastalık patogenezini açıklamaya yönelik olarak yapılan çalışmalara göre periodontal hastalık gelişimi; konağın hastalığa yatkınlığı ve direnci, patojenik türlerin varlığı, mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme kapasiteleri (virulansı) ve periodontal cep içindeki yoğunlukları, yararlı türlerin yokluğu veya az miktarda bulunması gibi faktörlerin bir araya gelmesine dayanmaktadır [51, 100]. Kritik konsantrasyonlara ulaştıklarında periodontopatik potansiyel kazanan dental plak içerisindeki bakteriler ile konak doku savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması ile olay periodontal hastalık lehinde gelişir [52, 101].

Periodontal mikroorganizmaların patojenite gösterebilmeleri için en az üç özelliğinin bulunması gerekir. Bunlar; mikroorganizmaların periodontal dokularda koloni oluşturabilmesi, konağın antibakteriyel savunma mekanizmalarını aşabilmesi ve direkt olarak doku yıkımına neden virülans faktörleri olarak bilinmektedir [93, 102].

Mikroorganizmalara bağlı gelişen periodontal doku yıkımı ikiye ayrılır: 1- Konak doku hücrelerinin metabolizmalarına etki eden veya büyümesini engelleyici amonyak, uçucu sülfür bileşikleri, yağ asiti, peptitler, bakteriyel enzimler ve toksinler gibi bakteriye bağlı virulans faktörlerinin salınımıyla oluşturulan direkt

mekanizmaya bağlı doku yıkımı, 2- Periodontopatik bakterilerin yerleştikleri doku içerisinde elastaz ve matriks metalloproteinazlar gibi konak dokuya ait proteinazların salgılanmasını uyarmasıyla gelişen, akut iltihabi hücreler (nötrofil) ile adaptif hücrelerin (monosit/makrofaj ve lenfosit) aktiviteleri ile yönlendirilen, konak cevabına bağlı meydana gelen indirekt mekanizmalı doku yıkımıdır [48, 103-108].

Periodontal hastalıklardaki enflamatuvar immün yanıt ile biyofilme karşı gelişen konak cevabındaki süreklilik ve dengenin kaybolmasının hastalığı başlatmada önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir [48].

Nötrofiller adaptif immün cevabı düzenleyen akut iltihabi hücrelerdir. Fagositoz yoluyla antimikrobiyal fonsiyonlarını yerine getirirler, doku yıkıcı enzimleri ortama salarak da lokal doku değişikliklerine neden olurlar. Kronik iltihabi hücreler (monosit/makrofaj ve lenfosit) hem periodontal enfeksiyona bağlı hem de periodontal tamir ve iyileşmeye bağlı doku değişikliklerini düzenlerler. Aynı zamanda antijenlere karşı spesifik opsonik antikorlar üreterek nötrofillerin periodontal enfeksiyonu kontrol altında tutmasına yardımcı olurlar [109].

Monosit, makrofaj ve nötrofil gibi non-spesifik immün yanıt hücreleri bakteriler tarafından meydana getirilen enfeksiyona karşı konağı korurlar. Non-spesifik immün yanıt bakterilere ve yabancı cisimlere dokunun verdiği ilk cevaptır. Spesifik (kazanılmış) immün yanıt ise lenfoid hücrelerin antijeni tanıması ve bu antijene özel cevabın oluşmasıdır [110].

Nonspesifik immün yanıt konağın patojenlerle tekrarlayan karşılaşmalarında adapte olmaz. Tek bir patojene karşı değil farklı patojenlere karşı reaksiyon geliştiren kalıtımsal olarak antimikrobiyal protein ve peptidleri işleme koyan monosit makrofaj ve nötrofillerin de içinde yer aldığı doğuştan immünitenin bir parçasıdır. Doğuştan immünite, enfeksiyon ajanlarına karşı savunmanın ilk önemli hattını oluşturmaktadır. Bu tip immünite doğuştan itibaren mevcuttur, daha önceden karşılaşılan patojenler sonucunda gelişmez ve hafızaya sahip değildir. Doğal bağışıklık hızlı olma avantajına karşın özgünlükten yoksundur ve konağın zararına işleyebilir [111].

Spesifik immün yanıt etken patojenlere karşı konakta gelişen spesifik bir cevap olduğu için daha etkilidir. T ve B lenfositler kazanılmış immün yanıtta önemli bir

role sahiptir. T ve B lenfositlerin bu rollerinin; patojen üzerindeki spesifik oligometrik yapıları fark etmeleri ve aynı patojenle tekrar karşılaşıldığında immün sistemin daha hızlı ve etkin bir cevap vermesini sağlayan reseptörler (CD4-CD8) geliştirmeleri şeklinde olduğu görülmektedir [112].

İltihabın başlaması ile damarsal değişiklikler ve kompleman sistem aktivasyonu gerçekleşir ve aktive olan kompleman sistem birer anaflatoksin olan C3a ve C5a'yı üretir. Anaflatoksinler lökositlerin ve mast hücrelerinin degranule olmasını sağlayarak vasküler değişiklikleri dolaylı yoldan tetiklerler. İltihap ilerledikçe dişeti bağ dokusundaki degranüle mast hücresi sayısı artar. Mast hücreleri uyarıldıkları zaman tümör nekroz faktör (TNF) α, transforming growth factor (TGF) β, interlökin (IL)-4 ve IL-6'yı yapısal olarak kopyalarlar [113]. IL-1, IL-6, interferon ve diğer sitokinlerin kopyalanmasını indüklerler. C5a, IL-1 β, TNF-α ve bakteriyel LPS tarafından uyarılan endotelyal hücrelerden ortama selektinler ve kemokinler salınır. Bu işlem, lökositler ve endotel hücreleri arasında selektif bir etkileşim olan ve lökositlerin kandan dokuya geçişlerini sağlayan transendotelyal migrasyonu için önemlidir. Transendotelyal migrasyondaki defektlerin agresif periodontitis ile ilişkilendirilmesi periodontal hastalıklarda bu sürecin önemini işaret etmektedir [114].

Gingivitis ve periodontitiste meydana gelen doku yıkımı konağın mikroorganizmalara, mikroroganizmaların yapısal ve metabolik ürünlerine ve konağın kendi hasarlı dokularına verdiği inflamatuar cevaba bağlı gelişir. Bu duruma çoğunlukla kompleman sistemi arabuluculuk eder. Kompleman sistemi gerek antijen-antikor kompleksleriyle klasik yoldan, gerekse humoral cevabın yokluğunda LPS, lipoteikoik asit (LTA) ve peptidoglikan gibi mikrobiyal yapısal materyallere karşı alternatif yoldan aktive olur. Kompleman sisteminin aktive olması vazoaktif ve kemotaktik yapıların oluşumuyla sonuçlanır. Fagositlerin ortama gelmesiyle fagolizozom oluşumu, oksijen redüksiyonu, lizozomal komponentlerin ortama salınımı gibi çeşitli mekanizmalarla doku yıkımı gerçekleşir [115].

Bakterilerce veya kompleman sistemi tarafından sitümüle edilen makrofajlar IL-1, TNF ve nötrofil kemotaktik faktör'ü (IL-8) ortama salarlar. Bu kombine etki nötrofillerin damarlardan bölgeye migre olmasını sağlar. Nötrofil migrasyonunun; makrofaj kaynaklı IL-8, kompleman sisteminin ürünü olan C5a ve bakteriyel kaynaklı peptidlere bağlı geliştiği düşünülmektedir. Nötrofillerden salınan kolajenaz, elastaz, katepsin G, reaktif oksijen türleri ve plazmin gibi lizozomal granül içeriği lokal doku yıkımlarına neden olur [115]. Makrofajların antijenlere ve mikroorganizmalarla ilişkili diğer ajanlara karşı salgıladıkları sitokinler (IL-1, TNFα) spesifik immün cevabı ve iltihabi yanıtı güçlendirerek doku yıkımını stimüle ederler. Doku yıkımı makrofajlardan salgılanan sitokinlerce direk olarak meydana gelebileceği gibi, dolaylı yoldan fibroblast gibi hücrelerden doku yıkıcı enzimlerin (kollajenaz, elastaz, MMP) salgılanmasını tetikleyerek de meydana gelir. Buna ek olarak makrofajlar IL-1β ve PGE-2 gibi sitokinleri salgılar ve osteoklastları uyararak kemik yıkımınında rol oynarlar [110].

Nötrofiller periodontal lezyonlarda savunma görevinde olsalar da bu hücreler aynı zamanda immünopatolojinin önemli hücrelerindendir. Nötrofillerin bakteriler ile karşılaşması fibroblast, endotel hücreleri ve keratinosit gibi çok önemli hücrelere zarar verir. Nötrofiller doku yıkım proteazlarını da içeren lizozomal enzimleri sentezlerler ve ortama salarlar. Doku yıkıcı enzimlerin, kemik rezorbe eden lipidlerin ve diğer iltihabi mediyatörlerin varlığı iltihabi cevabın oluşumuna ve ataşman kaybına neden olur [116].

Konağın doğal immünitesi içinde mikrobiyal enfeksiyonu ortadan kaldırma ve periodontitis gelişimini önlemede birçok mekanizma birlikte rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, gingival epitel, sulkuler epitel ve birleşim epitel bariyerlerinin bütünlüğü periodontal dokulara bakteri invazyonunu önleyerek bakteriyel ürünlere karşı bir koruyucu, mekanik bir bariyer görevi üstlenirken aynı zamanda konak çevresindeki mikrobiyal patojenleri tanıma ve bunlara cevap vermedeki iletişim ağında dinamik bir rolü olduğu bildirilmiştir [117]. Tükrük üretimi ve dişeti oluğu sıvısı da sırasıyla ağız boşluğu ve dişeti cebinin düzenli olarak yıkanmasını sağlar. Ayrıca içeriklerinde bulunan antibakteriyel enzimler, antimikrobiyal peptitler, kompleman proteinleri ve spesifik antikorlar sayesinde subgingival plak bakterilerine karşı konağı koruyucu etkileri vardır [118-120].

2.4 Antimikrobiyal Peptitler

Periodontal hastalıklarda biyofilm tabakasında yer alan bakterilerin konak savunmasının ilk basamağı olan doğal immün sistemi harekete geçirmesiyle oluşan enflamatuvar yanıt ile bakterilerin konak dokusuna geçişi önlenmeye çalışılır [121]. Yapılan araştırmalarda dişeti epitel örtüsünün enfeksiyona karşı fiziksel bir bariyer sağladığı ve doğal ve kazanılmış immün sistemin temel yapılarından biri olarak konak savunmasında aktif rol oynadığı anlaşılmıştır. Epitel hücreleri sürekli olarak diş yüzeyindeki supra ve sub-gingival bakteriyel ürünler ve mukozal yüzeylere tutunmuş bakteriler ile devamlı kontak halindedir. Bu hücreler IL-8, diğer kemokinleri ve sitokinleri salgılayarak çeşitli hücre tiplerini uyararak ve nötrofilleri bölgeye çekerek interaktif biçimde bakteri yoğunluğuna yanıt verir. Epitelyal hücreler bakteriyel akümülasyona cevap olarak aynı zamanda doğal antimikrobiyal peptit ve proteinleri de üretirler. Bu antimikrobiyal peptitler; periodontopatik mikroorganizmaları kontrol altında tutan ve sağlıklı mukozanın mikrobiyal ekolojisini devam ettirerek denge sağlayan kompleks yanıtlardan oluşan doğal immun sistemin bileşenleridir. Bu yolla epitel doku, aktif olarak çevre dokuya cevapta fonksiyon görür, enfeksiyona karşı oluşan yanıta ve ilerde oluşacak konak cevabına katılır ve doğal ve kazanılmış (adaptif) immün yanıtları birbirine entegre ederek köprü görevi görmektedir [5, 122]. AMP'ler bakteriler ve diğer mikroorganizmalar tarafından oluşturulan invazyon ve enfeksiyona karşı erken savunmayı gerçekleştiren, konak savunma cevabını başlatan moleküller içerisinde yer alırlar. Bu peptitler çoğunlukla ayrı hidrofobik ve yüklü bölgeleri olan katyonik (polar) moleküllerdir ve genelde 50 aminoasitten daha az uzunluktadır. Bu tip özellikler negatif yüklü bakteri yüzeylerini hedef almaları için idealdir. AMP'ler gen kodludurlar ve bir peptidi bir gen kodlar [123-125].

Antimikrobiyal peptit moleküllerinin mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlara karşı konak savunmasında doğal bağışıklığın önemli unsurlarından biri olduğu bilinmektedir. Güncellenmiş verilere göre AMP'lerin omurgalı-omurgasiz birçok canlıdan izole edildiği ve bu sayının Antimikrobiyal Peptit Veritabanı (Antimicrobial Peptide Database (APD)) verilerine göre 2500'ün üzerinde olduğu rapor edilmiştir [126-129]. Bunların; 257 tanesi bakterilerde, 7

tanesi tek hücrelilerde, 13 tanesi mantarlarda, 319 tanesi bitkilerde ve 1942 tanesi de konak savunma peptitleri olarak hayvanlarda tespit edilmiştir [18].

Güncellenen APD verilerine göre; insanlarda küçük katyonik peptitlerden, enzimlere ve geniş aglütine edici proteinlere kadar sıralanan farklı fonksiyonel sınıflara ait en az 110 adet farklı antimikrobiyal peptit tespit edilmiştir. Antimikrobiyal peptit molekülleri insanlarda, oral kavite, deri, göz, kulak, solunum yollları, akciğer, bağırsak, mide, üriner sistem ve sinir sistemi gibi çeşitli doku veya yüzeylerde açığa çıkarlar [4, 18]. Oral kavitede tükrük bezleri, oral epitelyal hücreler ve nötrofillerden salınan, tükrük ve dişeti oluğu sıvısında tespit edilebilen konak savunma cevabında aktif rol oynayan 45'i aşkın sayıda antimikrobiyal protein ve peptit bulunmaktadır [120, 130]. Doğal immünite efektörleri olan antimikrobiyal peptitler boyut, aminoasit dizilişi, belirgin yapısal özellikler ve mikroorganizmaların gelişimini inhibe etme kapasiteleri açısından çeşitlilik gösterirler [121, 123-125, 128, 131, 132].

AMP'ler; konak dokuya invaze olan bakterilere karşı direkt antimikrobiyal aktivite haricinde, farklı biyolojik fonksiyonlara da sahiptirler;

- ✓ fagositozu artırabilir,
- ✓ prostaglandin salınımını stimule eder,
- ✓ lipopolisakkaritlerin septik etkisini nötralize eder,
- ✓ inflamatuar bölgede çeşitli immün hücrelerin akümülasyonunu, katılımını sağlar,
- ✓ anjiogenezisi artırır,[133]
- ✓ yara iyileşmesini indükler,
- ✓ apoptozisi etkiler.[18]

Memelilerde oral kavite içerisinde aktif rol oynadığı bilinen antimikrobiyal peptitler 6 fonksiyonel sınıfa ayrılabilir:

1- Katyonik Peptitler
2- Bakteriyel aglünitasyon ve adhezyon
3- Metal iyon şelatorleri
4- Peroksidazlar
5- Proteaz inhibitörleri
6- Bakteri hücre duvarına karşın aktivite gösterenler [3, 120]

Katyonik yapıdaki antimikrobiyal peptit ailesi;

- ✓ Katelisidinler
- ✓ Alfa ve beta defensinler
- ✓ Adrenomedulin
- ✓ Histatin 1 ve 3
- ✓ Staterin
- ✓ C-C motif kemokin 28
- ✓ Azurosidin şeklinde sıralanabilir [3].

2.4.1. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin etki mekanizmaları

Antimikrobik etkili katyonik peptitler, pozitif yüklü ve hidrofobik olma özelliklerinden dolayı herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın direkt olarak negatif yüklü olan bakteri membranıyla etkileşime girerek etki gösterebilirler. Ayrıca bakterilerin fosfolipit yapısındaki iç membranının da negatif yüklü oluşu antimikrobik etkiyi kolaylaştırmaktadır [134].

Memelilerin ökaryot hücrelerindeki dış membranı, bakteri hücresinden farklı olarak fosfatidilkolin ve sfingomiyelin gibi elektriksel olarak nötral, zwitter iyonik fosfolipitlerden yapılmış olup kolesterol içermektedir. Bakteri dış membranı ise negatif yüklü fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşur ve kolesterol içermez. Bu yapısal farklılıklar, antimikrobik etkili katyonik peptitlerin insan hücreleri üzerine önemli bir toksik etkileri olmaksızın, bakteriler üzerindeki seçici öldürücü etkilerini açıklamaktadır [135].

Katyonik peptitlerin fosfolipit yapısındaki negatif yüklü sitoplâzma membranına bağlanması ve bakteriye nüfuz etmesi sonucunda bakteri hücresinin membranında, hücre içi ile dış ortam arasında iyonlar ve sıvılar için bir geçiş yolu meydana gelir. Katyonik peptitler sitoplâzma membranına ulaşabilmek için Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonlar ile yarışmalı olarak yer değiştirir ve hücre yüzeyinde birikerek LPS'leri kısmen nötralize eder ve dış membranın normal bariyer bütünlüğünü bozarlar. Bütünlüğünü yitirmiş dış membran bu şekilde hidrofobik yapılar, küçük peptitler için geçirgen hale gelir ve katyonik peptitler kendi destekledikleri yolla dış

membrandan geçerek fosfolipit yapıdaki sitoplazma membranına ulaşmış olurlar [136].

Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için asıl öldürücü olan katyonik peptitlerin negatif yüklü sitoplâzma membranı ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Bu olay sırasında katyonik peptitlerin hidrofilik grupları ile membran fosfolipitlerinin hidrofobik zincirleri karşı karşıya gelir, peptitler membrana paralel bir konum alarak membranın bütünlüğünü bozan kanalların oluşmasına yol açarlar [137]. Katyonik antimikrobiyal peptitlerin bu etki mekanizmalarını açıklamak amacıyla geliştirilen mekanizmalar fıçı tahtası modeli, kilim modeli, miçel agregat modeli ve toroidal model olarak isimlendirilmektedir [138-140].

2.5. Katelisidinler

Katelisidinler; antimikrobiyal ve immunostimulatör peptit ailesinin insan [8, 141], maymun [142], at [143] ,sığır [144], koyun [145], keçi [146], domuz [147], tavşan [148], ve fare[149] gibi memeli dokularında tespit edilmiş belirgin yapısal farklılıklar sergileyen katyonik yapıda üyeleridir [150]. İlk katelisidin peptiti 18kDa ağırlığında bir prekürsör protein olarak tavşan granulositlerinde tespit edilmiş ve bakteriyel endotoksin olan LPS bağlama yeteneği olduğu bildirilmiştir [148]. 1995 yılında Larrick ve diğerlerinin yaptığı çalışmada insan katelisidin proteini tespit edilmiş ve hCAP18 (human cationic antimicrobial peptide 18) olarak adlandırılmıştır [151].

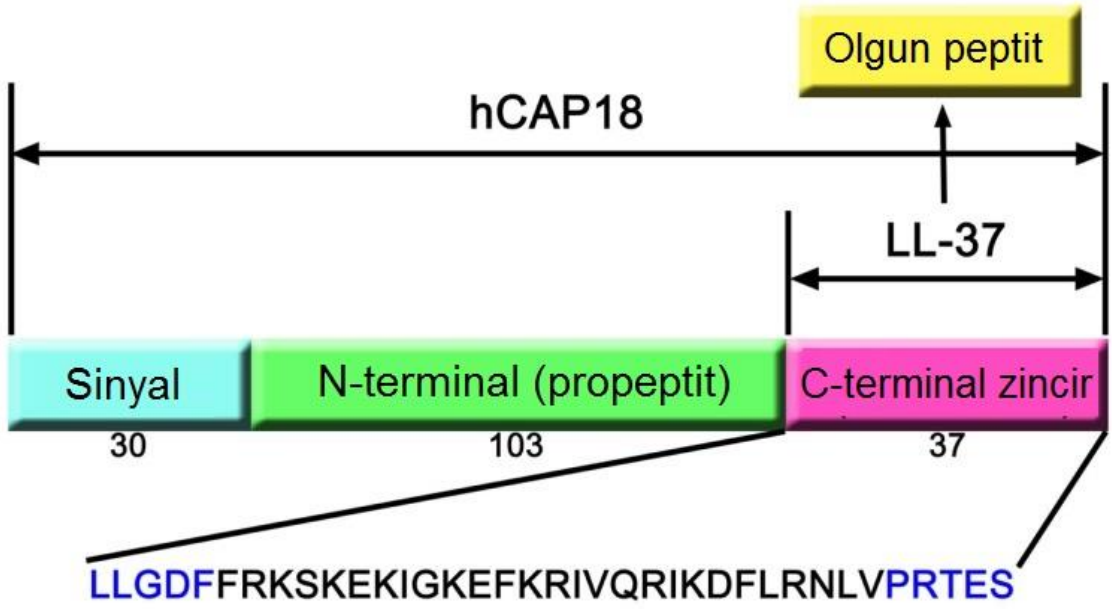
2.5.1. İnsan katyonik antimikrobiyal peptidi – (hCAP18/LL-37)

Moleküler ağırlığı 18 kDA olan ve insan katyonik antibakteriyel proteini olarak bilinen tek insan katelisidin proteini (hCAP-18) 2 farklı zincirden oluşur:

1) Birçok katelisidinin yapısında benzer olarak görülen yaklaşık 94-114 aminoasit uzunluğunda, 11 kDa ağırlığında olan N-terminal ucu ile sinyal peptitlerine bağlanan ‘katelin (katelin = katepsin L inhibitörü) proteinine benzer’ korunmuş anyonik prekürsör zincir,[152]

2) hCAP-18’in olgun antibakteriyel peptidi katelisidin LL-37’yi oluşturan antimikrobiyal aktiviteden sorumlu 37 aminoasitten oluşan değişken karboksi C-terminal zincir [153-155].

Şekil 2.1'de hCAP18/LL-37 antimikrobiyal peptit yapısı görülmektedir [121].

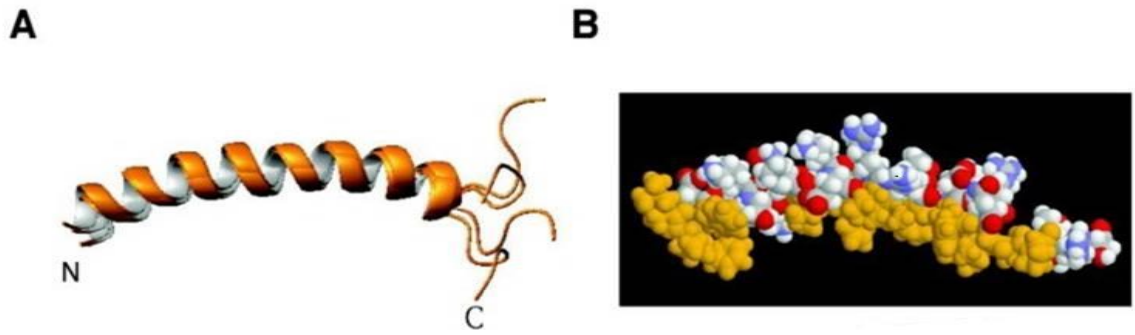


Şekil 2.1. hCAP18/LL-37 peptit yapısı

Olgun antimikrobiyal peptidin LL-37 olarak adlandırılmasının nedeni, peptidin 2 Lösin aminoasiti ile başlaması ve 37 aminoasitten oluşmasıdır [141]. Katelisidin LL-37'nin aminoasit dizilişi LLGDFFRKSK-EKIGKEFKRI-VQRIKDFLRN-LVPRTES şeklindedir [156].

2.5.2. Katelisidin LL-37 Moleküler Yapısı

Memelilerde en sık karşılaşılan katelisidinin morfolojik yapısının; lipit membranlar arasında arjinin, prolin ve triptofan gibi peptitler ve disülfit bağlarıyla korunan düz beta tabakası ile alfa-helezonlu lineer amfipatik bir yapı ile karakterize olduğu tespit edilmiştir [9, 157, 158]. Şekil 2.2'de 3 boyutlu rezonans NMR spektroskopi yöntemi ile tespit edilmiş olan insan katelisidin LL-37'nin üç boyutlu yapısı görülmektedir [159].



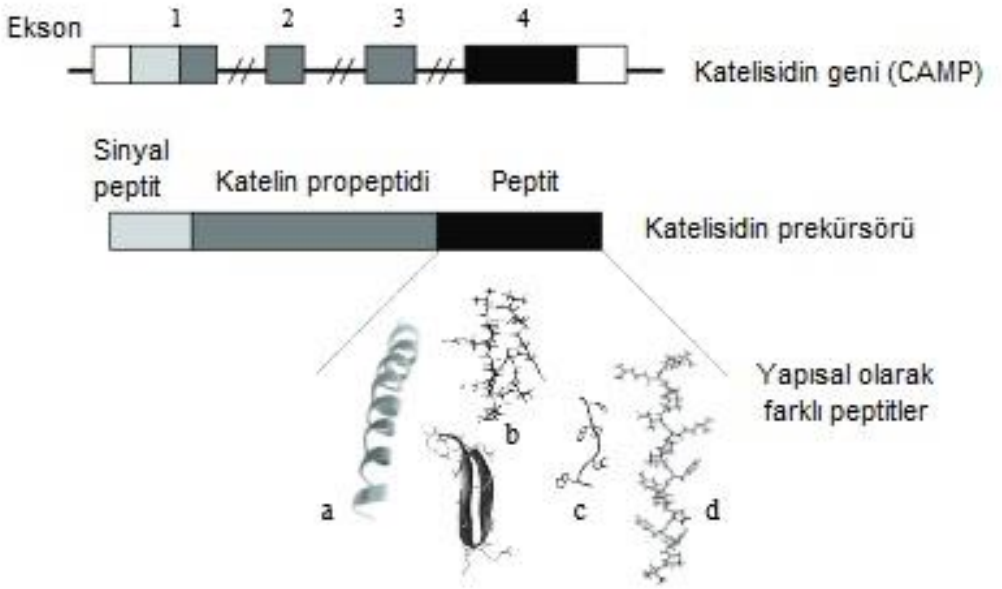
Şekil 2.2. Katelisidin LL-37'nin 3 boyutlu yapısı A) Peptidin N ve C terminal uçları B) Hidrofobik yüzeyler (altın rengi) [159]

Peptitin ortasındaki uzun sarmal yapısı antibakteriyel, anti-biyofilm ve anti-viral aktiviteleri açısından karakteristiktir [160]. Aynı zamanda membran etkileşimleri boyunca, bu alfa-helezonlu sarmal yapı özelliği sayesinde, hidrofobik kalıntıların tek taraflı olarak ayrılabilmesinin; membran penetrasyonu, transmembran porların şekillenmesi ve bakteri lizisi açısından etkili olduğu düşünülmektedir [161-163] .Katelisidin LL-37'nin pozitif yüklü olması negatif yüklü fosfolipit yapıdaki membranlar ile ilişkili olmasını sağlar. LL-37 diğer antimikrobiyal peptitlerin aksine çözeltilerde ve çift katmanlı lipit tabakalarında agregatlar oluşturabilir ve böylece proteolitik degradasyondan korunur [164].

2.5.3. Katelisidin LL-37 gen düzenlenmesi

İnsanda bulunan katyonik antimikrobiyal peptitlerden bir diğeri olan defensinlerin aksine, katelisidini kodlayan sadece bir gen mevcuttur ve bu gen 3. kromozom üzerinde bulunur [9, 165]. Geçmiş yıllarda FALL-39 olarak isimlendirilmekte iken 'Human Genome Organization' tarafından bu genin sembolünün 'CAMP' olarak kullanılması önerilmiştir [141]. CAMP geni yapısal olarak 1963 baz çifti (bp) uzunluğunda 4 eksondan oluşan kompakt bir gendir [166, 167]. Farklı canlı türlerinin katelisidinleri arasında sinyal peptit ve öncü katelin parçasını kodlayan ilk 3 eksonda benzerlik görülür. Ancak değişken biyolojik fonksiyonlardan sorumlu olgun antimikrobiyal peptit olan LL-37'yi kodlayan 4. eksonda benzeşim yoktur [168]. Aminoasit dizilişlerine göre farklılık gösteren katelsidinler yapısal olarak; lineer, α helezonlu peptitler (LL-37/hCAP18), disülfit köprüsü ile bağlı sisteinden zengin peptitler, triptofandan ve prolinden zengin peptitler olarak

sınıflandırılabilmektedir [12, 155] Katelisidinlerin gen yapısı şekil 2.3'te görülmektedir.



Şekil 2.3. Katelisidinlerin gen ve protein yapısının şematik olarak görünümü. Olgun katelisidin peptitleri: a) α-helezonlu b) sisteinden zengin c) triptofandan zengin d) prolinden zengin peptitler.[12]

2.5.4. Katelisidin LL-37'nin sentezlenmesi

Katelisidin LL-37 ve prekürsörü hCAP18'in farklı hücre ve doku tiplerinde ve vücut sıvılarında değişken konsantrasyonlarda bulunması hem peptit antibiyotik hemde sinyal molekülü özelliğini barındıran yapısını açıklamaktadır [169]. Epitel hücreleri ve dolaşımdaki nötrofiller katelisidinlerin temel kaynağıdır ve miyeloid kemik iliği hücreleri katelisidinlerin öncelikli salınım alanlarıdır [155]. LL-37 aynı zamanda deri ve testislerin skuamöz epitelinde, solunum yolları epitelinde, oral kavite, dil, vajina, özofagus ve servikste tespit edilmiştir. LL-37'nin bu bölgelerde enflamatuar durum boyunca aktif olarak sentezlenmesiyle savunma rolü oynadığı belirlenmiştir [170-175]. Konak savunmasının başlangıç safhasında rol oynayan katelisidinler doğal öldürücü hücreler (NK), monositler, lökositler, mast hücreleri, T ve B lenfositler ve makrofajlar içerisinde de tanımlanmıştır [8, 165, 167, 174, 176]. Yapılan araştırmalarda LL-37'nin aynı zamanda plazma, serum [177], dişeti oluğu sıvısı

[11], tükrük [178], ter [179], anne sütü [180], enflamatuvar yara sıvısı [181], sinoviyal membran sıvısı [182] ve bronko-alveoler lavaj sıvısı [175] gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edildiği bildirilmiştir.

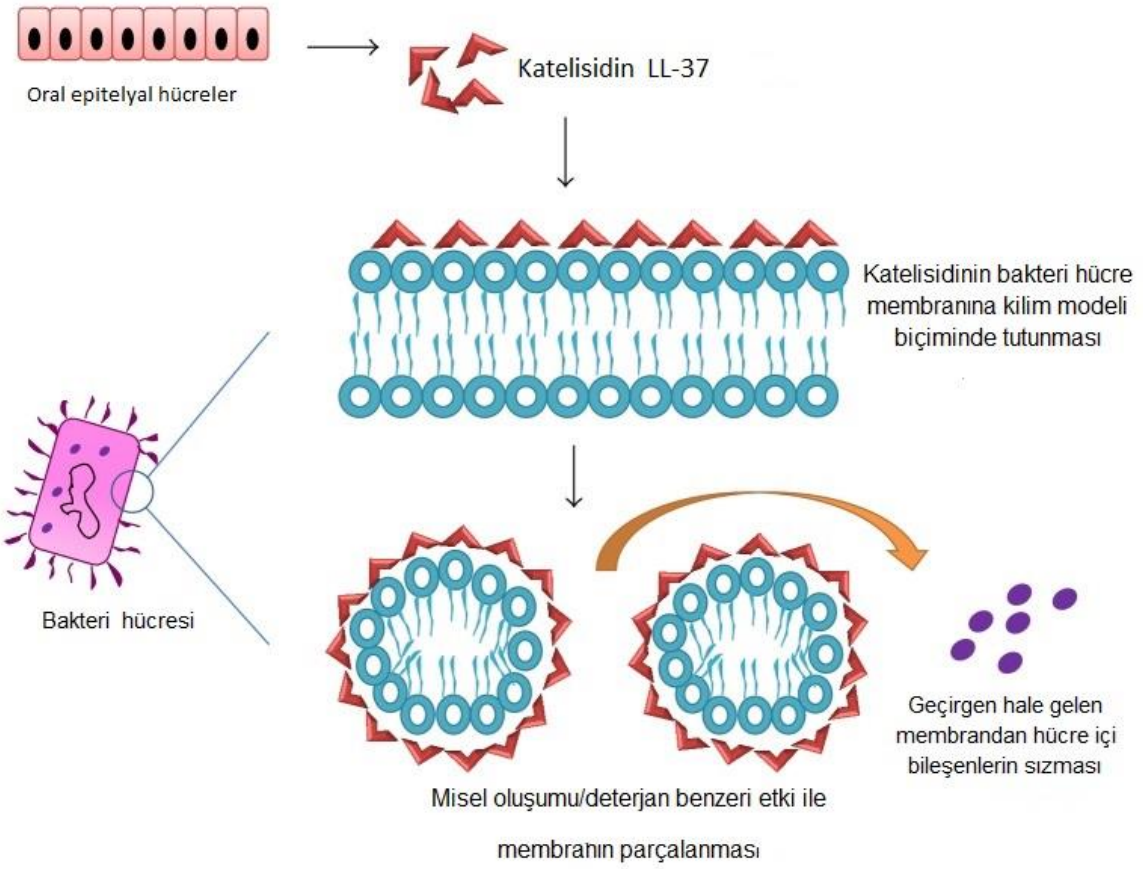
Katelisidinler miyelositte ve nötrofil olgunlaşmasının metamiyelosit safhasında pre-propeptit olarak sentezlenirler ve daha sonra sekretuvar ya da spesifik granüllere giderler. Genellikle inaktif bir prekürsör olan katelin propeptidinin mikrobiyal aktivasyonu için C-terminal peptitten ayrılması gerekir [5, 155]. İnaktif propeptit molekülü olarak nötrofil veya makrofaj granüllerinde depolanan katelisidin peptidinin depo formunun stimülasyon ile aktif peptitlere dönüşme sürecinin, aktive olmuş nötrofillerde granüllerin ekzositozunu takiben gerçekleştiği gösterilmiştir. Bir başka deyişle, depo formun aktif LL-37 peptidi dönüşmesinin aktive olmuş nötrofiller içindeki fagositik vakuollerde yada hücre dışı alan içinde degranülasyon esnasında meydana geldiği düşünülmektedir [183]. LL-37 peptidinin üretimi için, C terminal zincirin tam uzunluktaki katelisidin (hCAP-18) proteininden hücre dışında proteolitik olarak parçalanarak ayrılma süreci; nötrofil hücrelerinde proteinaz-3 enzimi [151, 184] ile keratinositlerde ise kallikrein ailesine bağlı serin proteazlar [168] tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu süreci takiben antimikrobiyal ve immünmodülatör etkinliği olan LL-37 ve sistein proteinaz inhibitör etkinliği olan katelin benzeri zincir aktif hale gelir [154, 155].

2.5.5 Katelisidin LL-37'nin antimikrobiyal etki mekanizması

İnsan katyonik antimikrobiyal peptidi katelisidin LL-37; bakteri membran bütünlüğünü direkt olarak bozabilme ve LPS bağlama kabiliyetleri ile çok sayıda gram (+) ve gram (-) bakteri türleri üzerinde etkin rol oynamaktadır. Katelisidinlerin bakteri membranı üzerindeki etkileşim mekanizması kesin olarak tespit edilmemiş olmakla birlikte, antmikrobiyal peptitlerin etki mekanizmalarını açıklamak için geliştirilmiş olan modellerden kilim modeli ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir [185].

Buna göre LL-37 ilk olarak bakterinin anyonik yüzeyini tanır ve katyonik yapıda oluşu nedeniyle bakteri hücresinin negatif yüklü yüzeyinde bulunan fosfolipit gruplar ile elektrostatik etkileşime geçer. Dış membranı geçen peptit monomerlerinin hidrofilik yüzleri membrandaki fosfolipit gruplarla karşılıklı gelecek

şekilde hedef hücrenin yüzeyine bağlanarak yüzeye paralel şekilde hücreyi bir kilim gibi örterler Bu durumdaki peptitler yeterli konsantrasyona ulaştıktan sonra peptit molekülleri dönerek membranın hidrofobik kısmına doğru bakacak şekilde yeniden yerleşirler. Peptit topluluğu membran boyunca misellere benzeyen bölgesel agregasyonlar meydana getirerek iyonların geçişi kanalların açılmasına neden olurlar deterjanlara benzer bir etki göstererek membranın parçalanmasına yol açarlar [163, 164] . Katelisidin LL-37'nin bakteri hücre membranı üzerindeki bahsedilen etkileşimi şekil 2.4'te gösterilmektedir [185].



Şekil 2.4. İnsan katelisidinin (LL-37) antimikrobiyal etki mekanizması [185]

2.5.6. Katelisidin LL-37'nin immün sistemdeki antimikrobiyal fonksiyonları

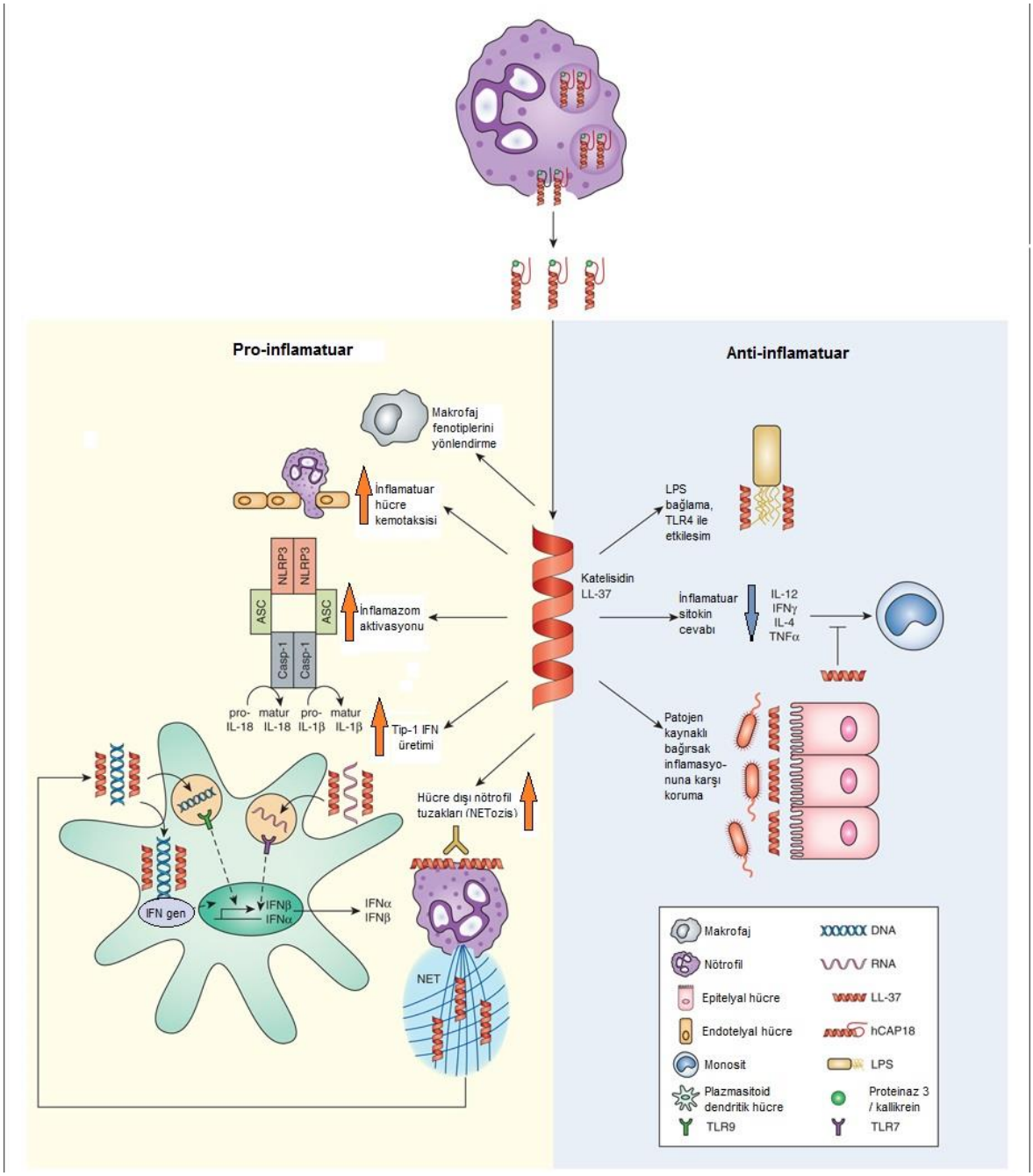
Öncelikli olarak antimikrobiyal özellikleri ile tanınmış olan LL-37 farklı çeşitlerde bakteriler, parazitler, mantarlar ve zarflı viral patojenlere karşı mikrobisid etki ile geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumu sergiler [162, 172, 186-190]. İnsan

katyonik antimikrobiyal peptiti LL-37, metisiline dirençli Staphylococcus aereus [162, 191], vankomisine dirençli Enterococcus faecalis [192], geniş spektrumlu β laktamaz üreten Escherichia coli ve birden çok antibiyotiğe dirençli Pseudomonas aeruginosa [162] gibi yüksek antibiyotik direnci gösteren birçok klinik izolatları içeren gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir. Peptitlerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) 0.1-100 µg/ml arasında değişir [121]. Minimum inhibitör değerleri ile karşılaştırılabilir düzeyde ve doza bağımlı olarak, LL-37 hızlı biçimde şüpheli organizmaların membranlarının veya artifisiyel membranların geçirgen hale gelmesini sağlar [164, 193].

Katelisidinler, katyonik, pozitif yüklü ve hidrofobik olmaları sebebiyle herhangi bir reseptöre ihtiyaç duymaksızın gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan LPS tabakası ve gram pozitif bakterilerde lipoteikoik asit gibi katyonik peptitlerin bağlanmasını sağlayan negatif yüklü tabakalar ile elektrostatik etkileşime girerek direkt olarak bakteri yüzeyine bağlanabilirler [136, 194, 195]. Bu mekanizmalar ile katelisidinlerin, lipopolisakkaritlerin serbestleşmesi ile açığa çıkan endotoksinlere bağlanarak onları inhibe etmeleri sayesinde nasıl nötralizasyon, antisepsis ve antiendotoksin aktivitesi gösterdikleri ve antibiyotikler ile nasıl sinerjist etkileşime girdikleri açıklanabilmektedir [196, 197]. Yapılan in vivo çalışmalarda bakterilerin membran bütünlüğünü bozarak direk olarak öldürebilme özelliklerinin yanı sıra tavşan ve insan katelisidininin (CAP18), lipopolisakkarit bağlama ve dolayısıyla makrofajlarda tümör nekroz faktör üretiminin indüklenmesini başarısızlığa uğratarak yan etkileri nötralize etme özellikleri sayesinde, bu peptitlerin endotoksemiyi önleme ve septik şok tedavisinde terapötik bir potansiyel taşıdıklarını göstermektedir [151, 191, 198-200].

LL-37, antimikrobiyal fonksiyonları yanında immünomodulatör etkilere de sahiptir. Katelisidin LL-37'nin farklılaşmış makrofaj fenotipini yönlendirebilmesi, bu peptidin makrofaj gelişiminde ve sitokin üretiminde güçlü etkiye sahip olabileceğini göstermektedir [201]. İlaveten LL-37'nin IL-1β sinyallenmesi ile yönlendirilen inflamatuar sitokin üretimini de uyararak immün cevabı desteklediği belirtilmiştir [202]. LL-37'nin aynı zamanda T hücreleri, monositler ve nötrofillere reseptör görevi görmesi için formil peptid reseptör benzeri-1'e (FPRL-1) bağlanarak, kemoatraktif özellikler sergilediği ve böylece inflamatuar hücre etkileşiminde kemotaksise katkıda bulunduğu gösterilmiştir [8, 203]. Bununla beraber epidermal

growth factor (EGF)'nin LL-37 tarafından aktive edildiği ve bu yolla artan keratinosit kemotaksisi ile yara iyileşmesinin desteklenebildiği belirtilmektedir [204]. LL-37'nin inflamasyonda, doku yaralanmasında ve enfeksiyon varlığında gerçekleştirdiği pro–inflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkiler şekil 2.5'te şematize edilmiştir [205] .



Şekil 2.5. Katelisidin LL-37'nin immün sistemdeki anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar fonksiyonları [205]

İmmunmodülatör olarak LL-37, formil peptide like receptor benzeri (FPRL)-1'e bağlanarak HIV-1 (human immunodeficiency virüs) virüsü kemokin reseptörlerini inhibe eder ve HIV enfeksiyonuna duyarlılığı azaltarak lokal korunmaya katkı sağlar [206, 207]. Bu biyolojik fonksiyonların yanında, yapılan çalışmalar katelisidin LL-37'nin; sitolizis indüksiyonu, anjoyogenez stimülasyonu ve epitelyal yara iyileşmesi gibi birçok immunomodülatör rolde görev aldığı bildirilmektedir [208]. Atopik dermatitiste görülen deri lezyonlarında LL-37'nin düşük miktarda salınımı bu peptitin enfeksiyondan korunmadaki in vivo önemini göstermektedir [209]. Benzer şekilde psöriyazis hastalığında LL-37'nin artmış salınımı da deri enfeksiyonlarını önlemektedir [165].

İnsan antimikrobiyal peptitlerinin anti-kanser aktiviteleri henüz geniş kapsamlı olarak değerlendirilmemiş olmasıyla birlikte, APD (Antimicrobial Peptide Database) tarafından yanlızca 6 adet AMP üyesinin anti-kanser özelliğine sahip olduğu açıklanmıştır. Bunlar; HNP-1, HNP-2, HNP-3, hBD-1, LL-37 ve granulisindir [126]. Kanser hastalarında azalmış seviyede granulisin salınımının, kanser ilerleyişi ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir [210]. Bununla birlikte esasen kanser hücrelerinde granulisin seviyesinin arttığı rapor edilmiştir [211]. Benzer gözlemler insan defensinleri ve Ll-37 içinde yapılmıştır.

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalarda, LL-37'nin aşırı salınımı ve anjiyojenik özelliğinin göğüs, akciğer ve yumurtalık kanserlerinin gelişimi ve ilerleyişine katkıda bulunduğu ve böylece pro-kanser aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir [26, 212, 213]. Ancak aksine, LL-37 kolon ve gastrik kanser hücrelerinde proteazomal aktiviteyi inhibe ederek karsinogenezisi baskılar ve dolayısıyla anti-kanser özelliği de gösterir [212, 214]. Defensinler ve katelisidin LL-37'nin aşırı salınımının kanser teşhisinde yararlı belirteçler olduğu ve özellikle var olan tedavi yaklaşımlarına dirençli vakalarda yeni anti-tümör ilaçların geliştirilmesi için antikanser etkileri bilinen bu peptitlerin uygun bir şablon oluşturabilecekleri belirtilmiştir [215, 216].

Ayrıca perinatal periotta ve yenidoğanlarda trakeal sıvıda da yüksek oranda tespit edilebilen LL-37'nin, defensinler ile sinerjist antimikrobiyal aktivite göstererek yenidoğan döneminde hücresel immün cevap mekanizmasının gelişimi boyunca B

grubu streptokoklar gibi önemli neonatal patojenlere karşı savunma fonksiyonuna sahip olduğu gösterilmiştir [217-219].

2.5.7. Katelisidin LL-37 ve periodontal hastalıklar

Antiikrobiyal peptitler, oral kavitede biofilmin oluşturduğu kompleks çevre içerisinde hastalık ve sağlık arasındaki dengeyi idame ettirmeyi sağlayan önemli bileşenlerdir [5]. Katelisidin LL-37, özellikle inflamatuar stimülasyonu takiben gingival epitelyal hücreler ve nötrofiller tarafından ortama salınır. Peptit molekülü ve mRNA'sı insan dili, bukkal mukozası [172], DOS [11] ve tükrükte [178] tespit edilmiştir. LL-37, periodontopatojenik bakterilerin geçiş bölgesi olan birleşim epitelinden gingival oluğa doğru göç eden nörofillerde yüksek miktarda bulunur ve defensinler ile birlikte birleşim epitelinin bakteri istilası ile apikale göçüne karşı oluşan konak savunma cevabına katkıda bulunurlar [220].

Morbus Kostmann Sendromu

Rolf Kostmann 1956 ve 1975 yıllarında infantil genetik granülositozis olarak isimlendirdiği, günümüzde ise Morbus Kostmann sendromu veya ileri derecede konjenital nötropeni olarak adlandırılan bozulmuş kemik iliği miyelosit oluşumu ve periferal kandaki mutlak nötrofil sayılarında düşüş ile karakterize olan sendromu tanımlamıştır [221,222]. Morbus Kostmann Sendromu aynı zamanda ağrılı aftöz ülserler, gingivitis ve erken yaşta ileri derecede generalize agresif formda kemik kaybı ile seyreden periodontitis ile ilişkilendirilmiş bir konjenital nötropeni tablosudur [222-224]. Kostmann sendromlu hastalarda tükrük, plazma ve nötrofillerde LL-37 tamamen eksiktir ve α-defensin oranlarında %30 azalma görülmektedir [11]. Putsep ve diğerlerinin bu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, granülosit kolon stimüle edici faktör tedavisi ile nötrofil sayıları normal seviyede tutulabilmesine karşın hastalardaki katelisidin LL-37 eksikliği devam etmiş ve periodontitis görülmüştür. Ayrıca kemik iliği nakli yapılan Kostmann sendromuna sahip olan bir hastada LL-37 antimikrobiyal peptit seviyesi ve nötrofil sayısı normal seviyede korunmuş ve bu bireyde herhangi bir periodontal hastalık izlenmemiştir [223].

Konjenital nötropenili Kostmann sendromlu 4 bireyin dahil edildiği diğer bir araştırmada, 3 hastada şiddetli alveoler kemik kaybı ile karakterize periodontitis gözlemlenmiştir. Bu çalışmada periodontal hastalığa sahip 3 bireyden 1 tanesinde aynı zamanda nötrofil elastaz geninde heterozigot mutasyon olduğu ve hastanın *A.actinomycetemcomitans*'tan zengin bir oral floraya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu hastaya ait takip döneminde elde edilen klinik görüntüler ve radyografiler resim 2.1'de görülmektedir. Çalışmanın takip periyodu içerisinde hastaların kan ve tükrük örneklerine ait nötrofillerde LL-37 eksikliğini tespit eden araştırıcılar, şiddetli konjenital nötropenisi bulunan hastalarda mutlak normal nötrofil seviyelerinin periodontal sağlığın idamesinde yeterli olmadığını, konak savunma sisteminin önemli bileşenleri olan antimikrobiyal peptitlerden katelisidin LL-37 eksikliğinin bu hastalarda görülen kronik periodontal hastalıkları açıklayabildiğini belirtmişlerdir [224].



Resim 2.1. Morbus Kostman Sendromlu hastanın farklı yaşlarda kaydedilen ve ağız içi fotoğrafları ve radyografileri [224]

Papiion-Lefevre Sendromu

Benzer olarak Papillon-Lefevre ve Haim-Munk Sendromu olan hastalarda da katelisidin LL-37 seviyesinin düşük olduğu ve ileri derecede periodontitis görüldüğü bildirilmiştir [225, 226]. Bu hastalarda katelisidinin prekürsör kısmı normal seviyelerde olmasına karşın, katepsin C genindeki allelik mutasyon ve proteaz 3 enzim eksikliği sebebiyle, prekürsör hcap18'in çok az bir kısmı biyoaktif form olan matur katelisidin LL-37 peptidine dönüşebilmektedir [34, 227]. Eick ve diğerlerinin Papillon–Lefevre sendromlu (PLS), kronik periodontitisli ve agresif periodontitisli hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada, tüm gruplarda DOS nötrofil seviyeleri eşit bulunmasına rağmen, PLS olan hastalarda LL-37'nin tamamen eksik olduğu bildirilmiştir. Araştırıcılar, PLS hastalarında katelisidin LL-37'nin antmikrobiyal ve immünmodülatör fonksiyonlarından mahrum kalan dişeti dokusunda, özellikle *A.actinomycetemcomitans* periodontopatojeninin ortamda çoğalmasının desteklendiğini ve beraberinde ileri derecede yıkımla seyreden periodontitis gelişebildiğini vurgulamışlardır [34].

Katelisidin LL-37, dişeti epiteli hücreleri ve nötrofiller tarafından sentezlenir ve tükrükte 0.14-3 µg/ml oranında bulunur [178, 228, 229]. Woo ve diğerlerinin normal tükrük bezi (10 birey) ve kronik siyaladenitisli tükrük bezinde (10 birey) katelisidin LL-37 salınımını inceledikleri çalışmalarında; katelisidin mRNA transkriptlerinin her iki gruptaki tükrük bezlerinden elde edilen dokularda mevcut olduğunu, fakat LL-37 mRNA seviyesinin kronik siyaladenitisli tükrük bezlerine sahip olan hastalarda normal tükrük bezi olan bireylere göre daha yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar çalışma sonuçlarına dayanarak katelisidin LL-37'nin doğal ve kazanılmış immünite arasında fonksiyonel bağlantı sağlayarak konak savunmasına katkıda bulunuduğunu belirtmişlerdir [230].

Periodontitisin ilerleyişi süresince α ve β defensinler gibi diğer antimikrobiyal peptitler ile birlikte katelisidin LL-37 salınımı da artmaktadır [120]. LL-37, periodontitiste baskın olarak bulunan A. actinomycetemcomitans ve P.gingivalis suşları gibi Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı aktif bir peptittir [120]. LL-37, direkt olarak LPS'leri bağlar. Daha önce yapılan bir çalışmada, LL-37'nin P.gingivalis fimbriaları ve bakteriyel LPS ile stimüle edilen

insan dişeti fibroblastlarında inflamatuvar cevabı inhibe ederek IL-6 ve IL-8 salınımını baskıladığı rapor edilmiştir [151, 231].

LL-37 aktivitesinin fizyolojik şartlar altında değerlendirildiği bir çalışmada, karbonat varlığında hedef olan bakterilerin hücre duvarlarında modifikasyonlar sergiledikleri ve böylece LL-37' ye karşı duyarlılıklarının arttığı gösterilmiştir [232]. A.actinomycetemcomitans ve P.gingivalis'in farklı suşlarına karşı gerekli olan minimum inhibitör konsantrasyon değeri (MiK) sırasıyla 30-60 µg/ml ve >125 µg/ml'dir [120]. P.gingivalis'in MIK konsantrasyonunun yüksek oluş nedeni; P.gingivalis'in proteolitik degradasyon amacıyla ortama saldığı gingipain proteazlarının LL-37'yi yıkıma uğratması olabilir [233].

Periodontitiste yüksek oranda proteolitik aktivite gösteren anaerop yapıdaki P.gingivalisin proteaz enzimleri sayesinde LL-37'yi parçalayarak inaktivasyonuna neden olabildiği bildirilmiştir [234-237]. İlginç olarak tükrük içerisinde *P.gingivalis*'in LL-37'yi tam olarak parçalama ve inaktive etme yeteneğinde azalma görüldüğü belirtilmiştir. Tükrük *P.gingivalis* gingipain proteazlarını inhibe etmemekte, fakat doza bağımlı biçimde LL-37'yi proteolitik degradasyondan korumakta ve böylece LL-37 proteaz varlığında da antimikrobiyal aktivitesini sürdürebilmektedir [233]. Sol ve diğerleri, birçok ökaryot hücresinde yüksek oranda bulunan ve enfeksiyon varlığında salınımı artan aktin peptidinin, LL-37'ye bağlanarak LL-37'yi P. gingivalis tarafından salınan gingipain proteazlarından ve dolayısı ile degradasyondan koruduğunu rapor etmişlerdir [238].

Katelisidin LL-37'nin tükrük ve dişeti oluğu sıvısındaki konsantrasyonunun oral bakterilerin MiK değerinden düşük olması, LL-37'nin endojen bir medyatör olarak oral kavitede önemli biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmesi için lokal konsantrasyonunun yüksek olması gerektiğini gösterir [239].

Dişeti oluğu sıvısı LL-37 seviyesinin kronik ve agresif periodontitis görülen hastalarda yüksek olduğu gösterilmiştir [10, 11]. Literatürde yapılan sınırlı sayıda çalışmaya bakıldığında; LL-37'nin DOS'daki tayini (0.5 µg/ml) için çoğunlukla immunoblotlama ve ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir [10, 11, 31]. Kronik periodontitis hastalarında oral kavitede, sağlıklı bölgelere kıyasla inflame olan bölgelerdeki DOS katelisidin LL-37 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur [240] ve konak cevabında multifonksiyonel

olarak görev alan LL-37 eksikliğinin direkt olarak periodontitis gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [223]. Kronik periodontitis hastalarında DOS LL-37 seviyeleri ile örnekleme bölgelerindeki periodontal cep derinliği, klinik ataşman seviyesi, plak indeksi, sondlamada kanama ve papiller kanama indeksi gibi klinik veriler arasında pozitif yönde ilişki olduğu gösterilmiştir [10].

2.5.8. Katelisidin LL-37 salınımının düzenlenmesi

Antimikrobiyal peptitlerin ekzojen terapötik ajanlar olarak kullanımlarının dışında, endojen peptit salınımının uyarılması da antimikrobiyal tedavide mümkün görülen bir yaklaşımdır [4]. Katelisidin LL-37 dahil, antimikrobiyal peptitlerin birçoğunun salınımı ortamdaki bakteri ve bakteri toksinlerine bağlı olarak düzenlenmektedir [3, 241]. Periodontitis etiyolojisinde esas faktör olan mikrobiyal dental plak formasyonuna karşı savunmada kritik rol oynayan antimikrobiyal peptitlerin salınımları hastalığın ilerleyişi esnasında bakteri ve bakteri toksinleri varlığında indüklenmektedir [242].

Agresif ve kronik periodontitis varlığında ortamdaki F.nucleatum ve P.intermedia gibi periodontopatojenler ile uyarılmaya bağlı olarak LL-37 salınımı artmaktadır [11, 243]. *P.gingivalis, T.forsyhtia* ve *T.denticola* gibi kırmızı komplekse dahil olan bakteriler tarafından uyarılma durumundan ise önemli oranda etkilenmemektedir [243].

Patojen olmayan faktörler dışında, AMP salınımını düzenleyici alternatif ve önemli mekanizmalardan bir diğeri de; çeşitli insan hücre tiplerinde CAMP gen ekspresyonu ile katelisidin LL-37 salınımı ve aktivitesinin 1,25-dihidroksi vitamin D3 tarafından arttırılmasıdır [17].

Vitamin D dahil olmak üzere katelisidin LL-37 üretimini indüklediği bilinen bazı faktörler ve etkilediği hücreler çizelge 2.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2**.** Katelisidin LL-37 salınımını uyaran faktörler

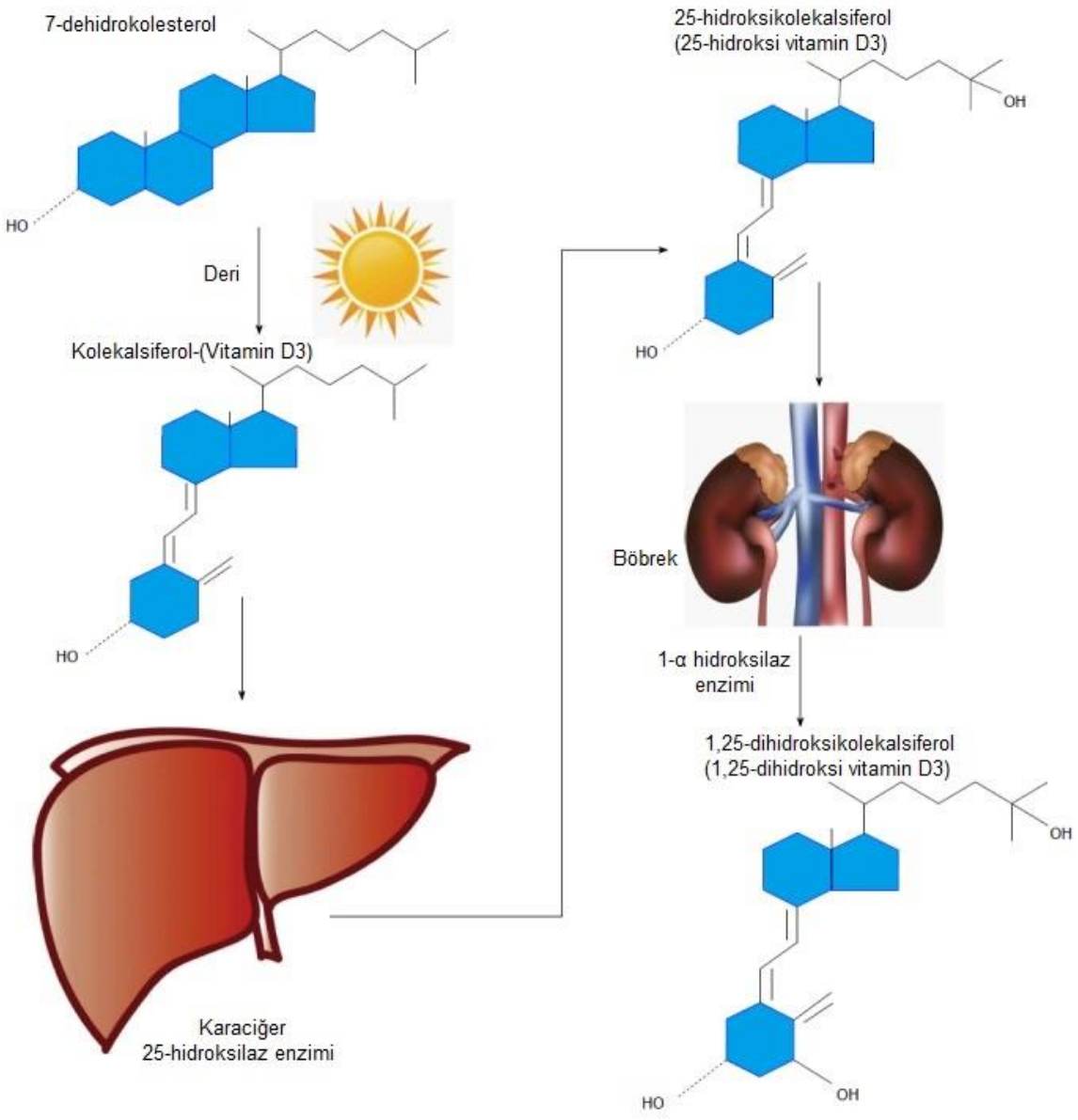
Faktör	Hücre	Kaynak no
Bakteriler/LPS	Keratinositler	[244]
TNF-α	Keratinositler	[244]
UV ışığı	Keratinositler	[244, 245]
Vitamin D3	Nötrofil öncü (progenitör) ve EBV dönüşümlü B hücreleri	[246, 247]
Laktoz	Kolonik epitelyal hücreler, T84, THP-1 monositler ve makrofajlar	[248]
Kısa zincirli yağ asitleri	Kolonik epitelyal hücreler ve monositik hücreler	[249]
Zn^{2+}	Caco-2 hücreleri	[250]
Butirat	Kolon, gastrik ve hepatoselüler hücreler	[251]
Fenilbutirat/1,25-dihidroksi vitamin D3	Ölümsüz insan bronşiyal epitelyal hücre hattı VA10	[252]

2.6. Vitamin D

D vitamini, kalsiyum absorbsiyonu, kemik metabolizması ve mineral dengesinin düzenlenmesinde görevli ve nöromusküler fonksiyonlar için önemli rollere sahiptir. D vitamini kas ve iskelet sisteminin iyi bilinen bir düzenleyicisi konumunda olan steroid yapıda bir hormondur. Kısa süreli katabolik bir etkiyle kemik remodelingi ve yeni kemik formasyonu için gerektiğinde osteoklast farklılaşması ve aktivasyonuna katkıda bulunarak kemik rezorpsiyonunu da stimüle edebildiği belirtilmiştir [253]. Ancak vitamin D; aslında osteoblastlar üzerinde proliferasyon ile osteopontin ve alkalen fosfataz uyarılmasını da içeren çeşitli anabolik etkiler ile kemik yapımına katkıda bulunmaktadır [254]. Vitamin D, aynı zamanda T ve B lenfosit hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve immunglobülin (Ig) üretimindeki direkt etkileri nedeniyle kazanılmış immün cevapta da etkin rolü olan bir vitamindir [255-257].

Literatürde, vitamin D eksikliğinin; insanlarda sadece düşük mineral kemik yoğunluğu riski oluşturmakla kalmayıp, aynı zamanda immün cevap, kronik inflamatuar hastalıklar ve kanser gibi diğer metabolik olaylarda da risk oluşturduğu belirtilmiştir [258]. D vitamininin deride güneş ışığı ile sentezlenen 27 karbon molekülü içeren vitamin D3 (kolekalsiferol) ve besinlerle alınan 28 karbon molekülü içeren vitamin D2 (ergokalsiferol) olmak üzere aynı yolla metabolize olan 2 kaynağı mevcuttur [259].

Güneşin 280-320 nm dalga boyundaki UVB ışınlarının etkisiyle epidermiste bulunan 7-dehidrokolesterolün (pro-vitamin D3) enzimatik fotolizi sonucu önce inaktif formda olan pre-vitamin D3 (kalsiol) sentezi gerçekleşir ve en yüksek düzeye ulaşır. Pre-vitamin D3'ten vitamin D3'e dönüşüm ise oldukça yavaş ısıya duyarlı olarak izomerizasyon ile deride gerçekleşir ve organizmanın ihtiyacına göre ayarlanır. Deriden sentez edilen ve besinlerle alınan D vitamininin tüm şekilleri vitamin D bağlayıcı proteine (DVBP) bağlanarak karaciğere taşınır. Pre-vitamin D3'ün hedef dokuda etkili olabilmesi için önce karaciğerde sitokrom vitamin D 25 hidroksilaz (CYP27A1) enzimi ile 25-hidroksi D vitaminine (25(OH)D) ve daha sonra böbrekte 1-α hidroksilaz enzimi ile (CYP27B1) aktif formdaki 1,25-dihidroksivitamin D3'e (kalsitrol) dönüşmesi gereklidir. Vücutta gerçekleşen D vitamini sentez mekanizması şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Vitamin D sentezi

Bu mekanizmadan bağımsız olarak; derinin bazal ve suprabazal tabakalarındaki keratinositlerin prekürsör 7-dehidrokolesterolden (provitami D) 1,25-dihidroksi vitamin D'nin direkt sentezini sağlayan hidroksilaz enzimlerini salgılayabilmesi vitamin D'nin normal keratinosit proliferasyonu, diferansiyasyonu ve fonksiyonları açısından önemli bir gereksinim olduğunu göstermektedir [260-262].

Pro-vitamin D3'ün UV ışınları ile aktivasyonunun azalması, vitamin D reseptörü (VDR) polimorfizmi veya besin alımına bağlı faktörler sebebiyle serum vitamin D3 seviyesinin düşmesi; dolaşımda reaktif protein seviyesinin artması [263],

kardiyovasküler hastalıklar [264] ve inflamatuvar kemik hastalığı, romatoid artirit ve multipe skleroz (MS) gibi otoimmün hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir [265].

Normal koşullar altında güneş ışınları ile deride oluşan vitamin D3 vücut ihtiyacının %90-95'ini karşılamaktadır. Yetersiz güneş ışını (UVB) alımı ve dengesiz diyet ile tüketilen besinlerin D vitamini içeriklerinin düşük olması, serumda düşük vitamin D seviyesinin oluşması için ilk akla gelen sebeplerdir. D vitamini biyosentezinde anahtar enzim görevi yapan 25-hidroksilaza ait gendeki homozigot mutasyon, klasik D vitamini eksikliği bulgularının yanı sıra düşük 25(OH)D düzeyi ile sonuçlanır. Bunların dışında; yaş, cinsiyet, mevsimler ve enlem, koyu renkli deri pigmentasyonu, giyim tarzı nedeniyle güneş ışığından faydalanamama, güneş koruyucular, obezite ve diyetle dışardan vitamin D takviyesinin olmayışı gibi sebepler immunmodülatör olarak görev yapan vitamin D'nin düşük serum seviyeleri ile anlamlı ölçüde ilişkilendirilmiştir [266, 267].

2.6.1. Vitamin D3 ve periodontitis ilişkisi

Vitamin D bilindiği gibi, bağırsaklardan kalsiyum absorbsiyonunu sağlayan ve normal kemik gelişimi için osteoblast hücrelerini stimüle ederek klasik kalsiyum homeostazisini dengeleyen önemli bir vitamindir. İleri derecede eksiklikleri mineralizasyon defektleri (osteomalazi), rickets ve osteoporoz gibi uzun süreli hastalıklarla sonuçlanan vitamin D ve kalsiyumun kronik olarak düşük seviyede alımı negatif bir kalsiyum dengesi ile alveoler çene kemiklerini de etkileyecek ölçüde tüm vücutta kemik kaybı ile sonuçlanabilir. Yapılan çok sayıda epidemiyolojik çalışmada,, düşük kemik kütlesi veya osteoporoz ile alveoler kemik kaybı ve diş kaybı arasındaki pozitif ilişki belirtilmiştir [268-276]. Bu durum düşük kemik kütlesinin periodontal hastalık gelişiminde ve ilerleyişinde bir risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır [271, 275].

Kemik ve kalsiyum metabolizmasındaki rollerinin yanı sıra, vitamin D'nin aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D3 ($1,25(OH)_2D_3$), immün sistem hücrelerinin sitokin üretimini önleme ve kuvvetli antibiyotik aktiviteye sahip peptitlerin sagılanması için monosit ve makrofajları stimüle etme fonksiyonları ile anti-inflamatuar etki de göstermektedir [14, 220, 274, 277-279]. Vitamin D3'ün bu etkisi bakterilerin yönlendirdiği enfeksiyonlara yatkınlık ile ilişkilendirilmiş, beraberinde

de düşük vitamin D seviyeleri enfeksiyöz hastalıklara yakalanma riskinin artışıyla bağdaştırılmıştır [280]. Böylece, bağ doku ve alveolar kemik gibi destekleyici periodontal dokuların kaybıyla sonuçlanan, inflamatuvar mediatörlerin bakteriyel salınımlarıyla konak savunma mekanizmasının aktivasyonunu içeren kronik inflamatuvar bir hastalık olan periodontitis tedavisinde de, vitamin D'nin faydalı olabileceği belirtilmiştir [281]. Garcia ve diğerleri yaptıkları takip periyotlu araştırma sonuçlarına göre, günlük olarak 800-1000 IU'dan daha fazla dozda kalsiyum ve vitamin D takviyesinin periodontal hastalık şiddetini azaltabildiğini belirtmiş ve randomize klinik çalışmalarda vitamin D 'nin periodontal hastalık üzerindeki potansiyel faydalı rolünün test edilmesi için bu oranı desteklemişlerdir [276].

Vitamin D ve kalsiyum takviyesinin alveolar kret rezorpsiyonu ve diş kaybı oranını azalttığını bildiren çok sayıda çalışma olmasına karşın, bu çalışmaların bir çoğu heterojen popülasyonları içeren veya direkt olarak periodontal hastalık statüsünü ölçmeyen limitasyonlu araştırmalardır [282-289]. Literatürde yer alan diğer bazı çalışmalarda düşük kalsiyum alımı periodontitis hastalarında alveolar kemik kaybı ile ilişkilendirilmiş ve kalsiyum takviyesi yapılan hastalarda inflamasyonun ve krestal alveolar kemik kaybının azaldığı, beraberinde periodontal cep derinliği ve diş mobilite ölçümünün düştüğü gözlemlenmiştir [290-293]. Aynı zamanda kemik metabolizmasının medyatörlerinden biri olan spesifik vitamin D reseptör (VDR) genotiplerinin oral kemik kaybı, klinik ataşman kaybı ve diş kaybı ile seyreden lokalize agresif peridontitise yatkınlık ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [294-296]. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda serum vitamin D3 seviyeleri ile periodontal inflamasyonun şiddeti arasında negatif yönde bir korelasyon gözlemlenmiş olmasına karşın [297, 298], Liu ve diğerleri yaptıkları araştırmalarda agresif periodontitis hastalarında serum vitamin D3 seviyesinin arttığı ve periodontal hastalık şiddeti ile vitamin D 3'ün serum konsantrasyonları arasında pozitif yönde bir ilişki olduğunu öne sürmektedirler [299, 300]. Heaney ve diğerleri de serum 25-hidroksi vitamin D3 konsantrasyonları ile periodontal hastalık arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışma sonuçlarına göre; 1,25 dihidroksi vitamin D3'ün periodontal hastalığı önlemede rol oynadığını ve vitamin D reseptörü (VDR) allel genleri ve azalmış 1,25 dihidroksi vitamin D3 seviyelerinin periodontititis ile ilişkili olabildiğini bildirmişlerdir [301].

2.6.2. Vitamin D3 ve katelisidin LL-37 ilişkisi

Vitamin D'nin osteoblastlarda anabolik aktivasyon gibi kemik ve kalsiyum metabolizmasını direkt etkileyen özellikleri dışında, anti-inflamatuvar bir ajan olarak periodontal yıkıma eşlik eden inflamatuar medyatörlerin inhibisyonu (TNFα ve IL-12 gibi) ve peridontopatojenler üzerinde antibiyotik etki gösteren peptitlerin sentezi ile de periodontitis tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir [254].

Vitamin D, antimikrobiyal peptitlerin stimulasyonunu uyararak bu şekilde bariyer fonksiyonu ve immün modülatör görevi ile doğal immüniteye katkı sağlar [302]. İnsanlarda katelisidin ve bazı defensinlerin (hBD-2) üretimi dolaşımda var olan yeterli vitamin D seviyesine bağımlıdır. [17] Katelisidin LL-37salınımı; bronşiyal hücreler [303], ürogenital epitelyal hücreler [304], keratinositler [305], plasental blastosist hücreler [306] ve myeloid hücre hatları [307] gibi çeşitli dokularda vitamin D3'ün aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D3 ile indüklenmektedir [14].

Metabolik yolak içerisinde aktif vitamin D3, biyolojik aktivitelerini gösterebilmek için birçok dokuda ve nötrofil, monosit ve T hücreleri gibi bazı lökositlerde sitoplazmik vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Daha sonra bu kompleks yapı çekirdeğe taşınır ve transkripsiyon için hedef genlere bağlanır. Fonksiyonel vitamin D cevap elementini (VDRE) içeren bu genlerden biri de, katelisidin LL-37 (CAMP) genidir [14, 308-310]. Böylelikle, vitamin D3'ün bronşiyal epitelyal hücrelerde, keratinositlerde ve miyeloid hücrelerinde (nötrofil,monosit) LL-37 salınımını indükleyebildiği ve insanlarda vitamin D3'ün LL-37 salınımı için önemli bir düzenleyici olduğu söylenebilmektedir [311, 312] CAMP geni $1,25(OH)_2D_3$ ile direkt olarak stimule edildiğinde dokularda artmış LL-37 salınımı görülebilmektedir [310].

Literatürde, insanda dişeti epitelyal hücreler dahil olmak üzere çeşitli dokularda vitamin D3'ün katelisidin LL-37 üretimini indüklediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Jeng ve diğerileri yaptıkları çalışmada, yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan İleri derecede hasta bireylerde (sepsis ve sepsis olmayan) sağlıklı olan bireylere oranla daha düşük seviyede serum vitamin D3 ve LL-37 seviyesi görüldüğünü ve tüm çalışma grubunda vitamin D seviyeleri ile LL-37 arasında

pozitif yönde bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir [313]. Steinmann ve diğerleri, bir başka LL-37 stimülatörü olan fenil butirat ile sinerjist etki gösteren 1,25 dihidroksi vitamin D3'ün akciğer epitelyal hücre hattı boyunca hem protein hem de mRNA düzeyinde katelisidin LL-37 salınımını indüklediğini bildirmişlerdir [314]. Diğer bir in vivo çalışmada, vitamin D takviyesinin monositlerde toll like reseptör (TLR2/1) ile indüklenmiş katelisidin salınımını artırdığı gösterilmiştir [315]. Mycobacterium tuberculosis kaynaklı gelişen ve ölümle sonuçlanabilen tüberküloz hastalığında, aktif formdaki vitamin D3'ün geniş antibakteriyel spektruma sahip katelisidin LL-37 üretimini artırarak, enfeksiyona karşı doğal konak savunmasına katkıda bulunduğu ve aktif pulmoner tüberküloz tedavisinde doz bağımlı şekilde faydalı olabileceği öngörülmüştür [14, 35, 316].

McMahon ve diğerleri, aktif formdaki vitamin D3'ün ($1,25(OH)_2D_3$), kültüre edilmiş dişeti epitel hücrelerinde katelisidin LL-37 salınımı ve periodontopatojen A. actinomycetemcomitans'a karşı geliştirilen antibakteriyel aktiviteyi içeren doğal immün cevap üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre gingival epitelyal hücrelerin inaktif formdaki vitamin D3'ün aktif hale dönüşmesi için gerekli olan 1-α hidroksilaz enzimini salgılayabildiği ve bu aktivasyon ile katelisidin LL-37 salınımında artış sağlandığı belirtilmiştir. Ayrıca, *A.actinomycetemcomitans* eklenen kültür örneklerinin 24 saat boyunca 1,25 dihidroksi vitamin D3 ile stimüle edilmesi sonucunda, LL-37 üretiminin artmasıyla birlikte patojene karşı gelişen antibakteriyel aktivite oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Araştırıcılar gingival epitel hücrelerinin endojenöz olarak vitamin D3'ü aktif hale getirebildiklerini, *A.actinomycetemcomitans* dahil birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, virüs ve mantarlara karşı geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olan katelisidin LL-37 üretiminin dişeti dokusunda da bakteriler ve vitamin D3 tarafından stimule edilebildiğini ve dolayısıyla vitamin D3'ün bu yolla konağın doğal immun cevabına katkıda bulunarak LL-37 ile birlikte periodontal enfeksiyonlara karşı savunmada etkili olduğunu belirtmişlerdir [317].

2.7. Sigara ve Periodontitis İlişkisi

Periodontitis; dişin destek dokularında yıkım ile sonuçlanabilen bakteriyel, çevresel ve konağa ait-genetik faktörlerin kompleks etkileşimi sonucu oluşan kronik inflamatuar bir hastalıktır [318, 319]. Literatürde, sigaranın periodontal hastalık patogenezinde ve ilerleyişinde etkili olan çevresel risk faktörleri arasında önemli yeri olduğu belirtilmektedir [320, 321]. Sigara kullanımı periodonsiyumda oluşan yıkımı mikrosirkulasyon ve konak immün sistemi, bağ doku ve kemik metabolizması gibi farklı yollardan etkileyebilmektedir [322].

Çok sayıda kesitsel ve klinik çalışmada, sigara içen bireylerde içmeyenlere oranla daha yüksek cep derinliği ölçümü, daha fazla ataşman kaybı, dişeti çekilmesi, furkasyon problemi ve alveoler kemik kaybı olduğu ve dişeti kenarında azalmış inflamatuar cevap geliştiği görülmüştür [323-326]. Bununla birlikte deneysel gingivitis çalışmaları dahil birçok klinik çalışmada, içilen sigara miktarına bağlı olarak sondlamada kanama indeksi veya kanama skorları sigara içen bireylerde içmeyenlere oranla daha düşük seyir göstermiştir [327-329]. Ayrıca, sigara içen peridontitisli hastalarda içmeyenlere oranla önemli oranda daha düşük DOS hacmi bulunduğu bildirilmiştir [330].

Nötrofiller, periodontal patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturan hücrelerdir ve sigara içen bireylerde sistemik dolaşımda sayıları artmış olmasına rağmen, gingival oluğa ulaşabilen hücre sayısı azalmaktadır [110, 331-333]. Sigara kullanımı, periodontal olarak sağlıklı olan bireylerde dahi nötrofil canlılığını, periodontal mikrovaskülarite içerisindeki göçlerini, kemotaksis ve fagositozu negatif yönde etkileyerek inflamatuar cevabı baskılar [320, 334]. Sigara içeriğindeki bileşenlerin, patojenlere karşı oluşturulan doğal immün savunmayı bozduğu, antijen sunumunu değiştirdiği ve adaptif immün yanıtı modüle ettiği öne sürülmektedir [19]. Sigara-nikotin kullanımı oral doku proliferasyonunu ve kan akışını, fibroblastların tutunmasını ve migrasyonunu engellemekte, aynı zamanda da alveoler kemikteki osteoklastların diferansiyasyonunu desteklemektedir [335, 336].

Literatürde sigara veya nikotinin gingival epitelyal hücrelerden defensin ve LL-37 gibi antimikrobiyal peptitlerin salınımı üzerindeki spesifik etkilerini inceleyen çok az

sayıda çalışma mevcuttur. Bazı araştırıcılar, sigaranın insan dişeti epitel hücrelerinde defensin peptitinin (hBD-2) salınımını baskıladığını belirtirken [337], diğer bazı araştırıcılar ise keratinositlerde defensin salınımının nikotin ile stimüle edildiğini belirtmektedir [338, 339]. Sigara içimi sonucu açığa çıkan başlıca ürünlerden biri olan polisiklik aromatik hidrokarbon benzo(A)prenin, 24-hidroksilaz enzim salınımını stimule ederek vitamin D katabolizmasını etkilediği ve makrofajlarda vitamin D reseptörü (VDR) aracılığı ile gerçekleşen vitamin D3 bağımlı katelisidin LL-37 indüksiyonunu azalttığı gösterilmiştir [340]. Bu sonuçlara dayanarak, sigara içerisindeki toksik bileşenlerin vitamin D aracılı doğal immüniteye de aktif olarak zarar verebildiğini öne sürmektedir [341].

2.8. Dişeti Oluğu Sıvısı ve Periodontitis İlişkisi

Dişeti oluğu sıvısı, kaynağını kan plazmasından alan, ancak periodontal yıkımla ilişkili iltihabi değişimlerden etkilenen ve sonuçta gingival oluğa/periodontal cebe dökülen iltihabi bir eksudadır [342]. Subgingival plaktaki bakteri ürünleri dişeti oluğundaki epitel boyunca bazal membrana diffüze olarak ozmotik basıncı artırırlar. Artan ozmotik basınç ile doku sıvısı dişeti cebi içine itilir. İltihabi yanıtın başlamasıyla bu sıvının yapısı değişir ve sekonder olarak enflamatuvar eksuda haline gelir. DOS'un hücresel bileşeni; % 70-80'i nötrofillerden, % 10 20'si monosit ve makrofajlardan, % 5'i mast hücrelerinden ve % 5'i T-lenfositlerden oluşmaktadır [343, 344].

Periodontal olarak sağlıklı ve hastalıklı bölgelerde varlığı görülen ve konak savunma ürünü olarak kabul edilen DOS'nın miktarı ve kompozisyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [119, 345, 346]. Sağlıklı dişetinde çok az bulunan DOS miktarı sistemik hastalıklara, kullanılan ilaçlara, hormonal değişimlere, sigara kullanımına ve inflamasyon derecesine göre değişiklik gösterir. Mevcut dental plak ürünlerine karşı bir cevap olarak değerlendirilen ve esas olarak mikrovasküler sızıntıdan kaynaklanan DOS'un içeriğinde; hücreler arası sıvı ve hücresel sitoplazma, dişeti oluğu bölgesindeki bakteri ve konak hücrelerinin metabolik elementleri, epitel, bakteri veya konak kaynaklı hücresel elemanlar, antimikrobiyal peptitler, proteinler, antikorlar, antijenler, enzimler, sitokinler, biyokimyasal

belirleyiciler, büyüme faktörleri, bağ dokusu proteinleri (kollajen propeptitleri) ve K, Na, Ca gibi elektrolitler yer alır [118, 347, 348].

Periodontal dokuların savunma mekanizmasında önemli bir role sahip olan DOS ‘un periodontal hastalık patogenezindeki önemi ve diagnostik yararını tespit etmeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Başta serum olmak üzere dişeti bağ dokusu ve epitelinden de kaynaklanan DOS inflame dokuda periodontal hastalığını başlaması veya sağlığını korunması ile ilişkili konak doku cevabından kaynaklanan enzimleri, konak ve bakterinin yıkıcı ürünleri ve sitokinleri gibi diğer molekülleri de taşır. DOS, periodontal hastalığın göstergesi sayılan bu ürünleri barındırması sebebiyle, bölgeye spesifik bir hastalık olan peridontitisin değerlendirilmesinde serumdan daha çok tercih edilen bir teşhis aracı olarak önemli bir yere sahiptir [342].

Periodontal cep içerisinden DOS’u elde etmek için üç temel teknik kullanılmaktadır [349]. Bunlar:

1- Dişeti oluğu yıkama metodu,
2- Kapiller tüp veya mikropipetlerin kullanımı,
3- Absorbe filtre kağıt şeritlerin kullanımıdır.

Her tekniğin avantajları ve dezavantajları olduğu için seçilecek teknik çalışmanın amaçlarına göre belirlenmelidir [350].

Günümüze değin farklı enflamasyon derecesine sahip dişeti örneklerindeki LL-37 salınımını ve değişik periodontal hastalık tiplerinde LL-37 antimikrobiyal peptidinin varlığını inceleyen sınırlı sayıda araştırma bulunmamaktadır. Literatür incelendiğinde, doğal immün sistemde önemli bir yer tutan katelisidin LL-37 ve vitamin D ile ilgili tıp alanında birçok çalışma yapılmasına karşın, diş hekimliği alanında bu ilişkiyi değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda DOS LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin değerlendirildiği çalışmamız bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığında planlanan, sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalara ve periodontal olarak sağlıklı bireylere ait DOS katelisidin LL-37 düzeyleri, bu bireylere ait cep derinliği (CD), plak indeksi (PI), gingival indeks (GI), klinik ataşman seviyesi (KAS) ölçümlerini içeren klinik periodontal kayıtlar, radyografik değerlendirmeler, serum vitamin D3 düzeyleri ve DOS katelisidin LL-37 belirlenmesi ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın amaçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

a) Kronik periodontitisli ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde konak savunma cevabı düzeylerinin DOS LL-37 açısından karşılaştırılması ve sigaranın kronik periodontitis ve periodontal olarak sağlıklı bireylerde bu cevap üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi,

b) Kronik periodontitisli ve periodontal olarak sağlıklı sigara içen ve içmeyen bireylere ait klinik ölçümlerin karşılaştırılması,

c) Sigara-vitamin D3 düzeyleri arasındaki olası ilişkinin araştırılması,

d) Vitamin D3 düzeylerinin periodontal sağlık ve DOS LL-37 seviyeleri üzerindeki olası etkisinin değerlendirilmesi,

e) Değerlendirilen klinik ölçümler, vitamin D3 ve DOS LL-37 seviyeleri arasındaki olası ilişkinin araştırılmasıdır.

Bu çalışma ile periodontal hastalıklarda sigaranın, vitamin D3'ün ve katelisidin LL-37 antimikrobiyal peptidinin seviyelerinin incelenmesi ve bu parametrelerin birbirleri üzerindeki etkisinin tespit edilmesinin; periodontal hastalıkların patogenezinin anlaşılmasında ve tedavi sürecinde yeni veriler elde etmemize fayda sağlayacağı düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada yer alan bireyler Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na Aralık 2011- Temmuz 2012 tarihleri arasında çeşitli periodontal şikayetler ile başvuran kronik periodontitis tanısı konulan bireyler ile diğer dental şikayetler veya kontrol nedeniyle başvuran periodontal açıdan sağlıklı bireyler tarafından oluşturuldu. Çalışma öncesinde Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'na başvuruldu ve 04.10.2011 tarihli 21/1 nolu etik kurul onayı elde edildi. (Ek-1-Etik kurul raporu)

3.1.Hasta Seçimi

Çalışmada yer alan kronik periodontitis hastalarının teşhisi, 1999 Uluslararası Periodontoloji Workshop'unda Amerikan Periodontoloji Akademisi (AAP) tarafından kabul edilen periodontal hastalık sınıflamasında yer alan kriterler dikkate alınarak konuldu [53]. Yapılan klinik muayenelerde ve periodontal indeks ölçümü sonucu birbirine komşu olmayan en az 2 dişinde ≥5 mm periodontal cep varlığı ve ataşman kaybı tespit edilen, ve panaromik-periapikal radyografiler alınarak yapılan incelemelerde interdental septumda vertikal veya horizontal kemik kaybı görülen hastalar kronik periodontitis grubuna dahil edildi. Çalışmada yer alan kronik periodontitis hastalarının agresif periodontitis ile ayırıcı tanısı hastanın yaşı, hastalığın zaman içerisindeki ilerleme oranı, agresif karakterdeki hastalığın ailesel geçiş doğası göstermesi ve kronik periodontitiste görülen plak ve kalkulus varlığı ile karşılaştırıldığında agresif peridoontitiste lokal faktörlerin bulunmayışı gibi farklı noktalar dikkate alınarak konuldu [53, 93, 318] .

3.2. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Çalışmada, kronik periodontitis grubuna dahil edilen bireyler aşağıdaki kriterlere uygun olarak seçildi:

1- Hastanın gönüllü olması, (Çalışmadan önce tüm bireylere peridontal hastalıklar ve araştırma ile ilgili ve yapılacak işlemler hakkında bilgi verilerek yazılı onam formu ile onayları alınmıştır)

2- Hastanın hiçbir sistemik problemi olmaması (diabet, kardiyovasküler hastalıklar, immünolojik bozukluklar, hepatit gibi) veya periodontal sağlığı etkileyebilecek sürekli bir ilaç tedavisi altında bulunmaması,
3- Son üç ay içinde antibiyotik veya antiinflamatuvar ilaç kullanmamış olmaları,
4- Son 6 ay içinde herhangi bir periodontal tedavi görmemiş olmaları,
5- Generalize kronik peridontitis kriterleri taşıyan hastalar (%30'dan fazla alveoler kemik kaybı),
6- İlk seansta kronik periodontitis teşhisi konulan hastalarda, DOS örnek bölgesi olarak seçilmek üzere en az 6 bölgede ≥ 5mm derinlikte periodontal cep bulunması,
7- Kadın hastaların hamile, menapoz ve emzirme döneminde olmamaları,
8- Sigara grupları için; en az üç yıl veya daha uzun süredir sigara kullanan ve günde ≥10 adet sigara içen bireyler olmaları,
9- Hastaların daha önce vitamin D desteğine yönelik herhangi bir tedavi almamış olmalarıdır.

Çalışmada yer alan periodontal açıdan sağlıklı kontrol grubu, aşağıdaki kriterlere uygun olarak seçildi:

1- Bireylerin gönüllü olması, (Çalışmadan önce tüm bireylere peridontal hastalıklar ve araştırıma ile ilgili ve yapılacak işlemler hakkında bilgi verilerek yazılı onam formu ile onayları alınmıştır)
2- Bireylerin hiçbir sistemik problemi olmaması veya periodontal sağlığı etkileyebilecek sürekli bir ilaç tedavisi altında bulunmaması,
3- Son üç ay içinde antibiyotik veya antiinflamatuvar ilaç kullanmamış olmaları,
4- Son 6 ay içinde bir periodontal tedavi görmemiş olmaları,
5- Sigara kullanmıyor olmaları,
6- Klinik ve radyolojik muayeneler sonucunda cep derinliği <3mm olan, minimal enflamasyon belirtisi taşıyan veya klinik olarak tamamen sağlıklı periodontal dokulara sahip olmaları ve radyografide kemik kaybı görülmemesi,
7- Bayan hastaların hamile, menapoz ve emzirme döneminde olmamaları
8- Hastaların daha önce vitamin D desteğine yönelik herhangi bir tedavi almamış olmalarıdır.

3.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri

Aşağıdaki durumlardan en az birine sahip olan hastalar çalışma dışı bırakıldı:

1- DOS örnek bölgelerinde yıkımı arttıran lokal faktörlerin (ör: hatalı restorasyon varlığı) bulunması,
2- Vitamin D desteğine yönelik herhangi bir tedavi veya dışardan takviye alan bireyler,
3- Hamile, emzirme ve menapoz dönemindeki kadınlar,
4- Periodontal tedaviye engel bir durumu olan bireyler,
5- Herhangi bir sistemik hastalığı bulunan bireyler,
6- Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen bireyler.

3.4. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Yapılması düşünülen araştırmanın içeriği, amaçları ve hastalara uygulanacak işlemler katılımcılara anlatıldı. Bilgilendirilen ve çalışmada yer almayı kabul eden bireylerin yazılı aydınlatılmış onam formları alınarak araştırmaya dahil edildi. (Ek-2-Hasta onam formu)

Detaylı bir sistemik anamnez alındıktan sonra yapılan klinik ve radyografik değerlendirmeler sonucunda belirtilen kriterlere uygun olarak seçilen 20 sigara içen kronik periodontitis (KP-1), 20 sigara içmeyen kronik periodontitis (KP-2) ve 20 periodontal açıdan sağlıklı (K) birey çalışmaya dahil edilerek toplam 3 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Çalışmamıza 28'ı kadın 32'si erkek olmak üzere toplam 60 birey dahil edildi.

Çalışmamızda yer alan gruplar çizelge 3.1'de şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Çizelge 3.1. Çalışma Grupları

	GRUP KP-1	GRUP KP-2	GRUP-K
Sigara kullanımı	**+**	**-**	**-**
Periodontal durum	**Kronik Periodontitis**	**Kronik Periodontitis**	**Sağlıklı**
Sayı	**20**	**20**	**20**

3.5. Çalışma Dizaynı

İlk seansta tüm hastalardan detaylı sistemik ve dental anamnez alınıp bireylerin yaşı ve cinsiyet bilgileri, oral hijyen alışkanlıkları ve herhangi bir sistemik rahatsızlığa sahip olup olmadığı kaydedildi. (Ek-3-Hasta anamnez formu)

Tüm dişlerinden plak indeksi (Pİ) [351], gingival indeks (Gİ) [352], sondlanabilen cep derinliği (SCD) ölçümleri ve klinik ataşman seviyeleri (KAS) periodontal indeks formlarına kaydedildi.(Ek-4-Periodontal klinik indeks formu) Periapikal ve panaromik radyografiler elde edilerek radyografik değerlendirmeler yapıldı. Yapılan klinik ve radyografik değerlendirmeler sonucu kronik periodontitis ve periodontal olarak sağlıklı tanısı konulan, gönüllü hastalar ikinci randevuya çağırıldı. İkinci randevuda, DOS hacmi ve ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile katelisidin LL-37 tayini için, kağıt şeritler yöntemi ile örnekleme bölgelerinden dişeti oluğu sıvıları elde edildi. Aynı seansta Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) testi ile yapılacak olan Vitamin D3 tayini için hastalardan kan örnekleri alındı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hastalara oral hijyen eğitimi verildi ve faz I periodontal tedavi uygulandı.

3.6. Klinik Periodontal Kayıtlar

Tüm hastaların detaylı sistemik ve dental anamnezi alındıktan sonra oral hijyen ve periodontal sağlık durumlarının klinik değerlendirmesi;

- Plak indeksi (Pİ, Silness ve Löe 1964),[351]
- Gingival indeks (Gİ, Löe ve Silness 1963),[352]
- Sondlanabilen cep derinliği (SCD),
- Klinik ataşman seviyesi (KAS) ölçümleri ile yapılmıştır

3.6.1. Plak İndeksi (PI) (Silness ve Löe 1964)[351]

Çalışmaya katılan tüm bireylerin ağız hijyen düzeylerinin belirlenmesi amacı ile, oral kavitede bulunan dişlerin altı yüzeyinden (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/lingual, midpalatinal/lingual, distopalatinal/lingual), 0,5 mm çapında Williams tipi sond (Nordent Manufacturing Inc, Elk Grove Vilage, IL, USA) kullanılarak plak indeksi skorları kaydedilmiştir. Bu indekse göre;

Çizelge 3.2. Sillness ve Löe'nün plak indeksi skorları ve kriterleri [351]

Skor	Kriter
0	Dişeti bölgesinde plak yok
1	Dişin çevresinde ve serbest dişeti kenarına tutunmuş ince bir film tabakası şeklinde plak. Gözle görünmez, plak boyası veya sond yardımı ile varlığı gözlenebilir.
2	Gözle görülebilen, dişeti cebi içerisinde veya dişin ve dişeti kenarının üzerinde orta düzeyde birikimi plak birikimi
3	Dişeti cebi içerisinde ve/veya dişin ve dişeti kenarının üzerinde interdental bölgeleri de içerisine alan yoğun biçimde plak varlığı

Her hasta için plak indeks ortalaması değerleri, tüm dişlerdeki plak indeks değerleri toplamının, mevcut toplam diş sayısının indeks alınan diş yüzey sayısı (6) ile çarpımına bölünmesiyle hesaplandı.

$$PI = \frac{\text{Tüm dişlerdeki PI değerleri toplamı}}{\text{Mevcut diş sayısı x 6}}$$

3.6.2. Gingival indeks (GI, Löe ve Silness 1963)[352]

Dişlerin marjinal dişeti bölgesindeki inflamasyonunun belirlenmesi amacıyla tüm dişlerin dişlerin 6 yüzeyinden (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/lingual, midpalatinal/lingual, distopalatinal/lingual), 0,5 mm çapında Williams tipi sond (Nordent Manufacturing Inc, Elk Grove Vilage, IL, USA) kullanılarak plak indeksi skorları kaydedilmiştir. Bu indekse göre;

Çizelge 3.3. Löe ve Sillness' in gingival indeks skorları ve kriterleri[352]

Skor	Kriter
0	Sağlıklı dişeti. İnflamasyon yok
1	Hafif inflamasyon, hafif renk değişikliği, hafif ödemle karakterize dişeti Sondalamada kanama yok.
2	Orta dereceli inflamasyon, dişeti parlak, kırmızı ve ödemlidir. Sondalamada kanama vardır.
3	Şiddetli inflamasyon, belirgin eritem ve ödem vardır Ülserasyonlar ve spontan kanamaya meyil mevcuttur

Her hasta için gingival indeks ortalaması değerleri, tüm dişlerdeki gingival indeks değerleri toplamının , mevcut toplam diş sayısının indeks alınan diş yüzey sayısı (6) ile çarpımına bölünmesiyle hesaplandı.

$$GI = \frac{\text{Tüm dişlerdeki GI değerleri toplamı}}{\text{Mevcut diş sayısı x 6}}$$

3.6.3. Sondlanabilen Cep Derinliği (SCD)

Çalışmaya katılan tüm bireylerin her dişinin mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/lingual, midpalatinal/lingual, distopalatinal/lingual olmak üzere altı noktasından, 0,5 mm çapında Williams tipi sond ile (Nordent Manufacturing Inc, Elk Grove Vilage, IL, USA) ilave bir basınç uygulanmadan, cep tabanında direnç hissedilinceye kadar sond yerleştirilip, cep tabanından serbest dişeti kenarına kadar olan mesafe milimetre cinsinden ölçülmüş ve indeks formuna kaydedilmiştir.

Her hasta için sondlanabilen cep derinliği ortalaması değerleri, tüm dişlerdeki sondlanabilen cep derinliği değerleri toplamının, mevcut toplam diş sayısının indeks alınan diş yüzey sayısı (6) ile çarpımına bölünmesiyle hesaplandı.

$$SCD = \frac{\text{Tüm dişlerdeki SCD değerleri toplamı}}{\text{Mevcut diş sayısı x 6}}$$

3.6.4. Klinik Ataşman Seviyesi (KAS)

Çalışmaya katılan tüm bireylerin her dişinin (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/lingual, midpalatinal/lingual, distopalatinal/lingual) altı noktasından cep tabanı ile mine- sement sınırı arasındaki mesafe 0.5 mm çapında Williams tipi sond (Nordent Manufacturing Inc, Elk Grove Vilage, IL, USA) ile milimetre (mm) cinsinden ölçülüp indeks formuna kaydedilmiştir.

Tüm bu klinik ölçümler tek bir klinisyen tarafından ölçülerek klinik indeks formlarına kaydedildi. (Ek-4-Periodontal klinik indeks formu)

3.7. Radyografik Değerlendirme

Tüm bireylerden klinik muayeneyi takiben alveoler kemik seviyesinin tespiti ve teşhis amacıyla periapikal ve panaromik radyografiler alındı.

3.8. Biyokimyasal Analizler için Örneklerin Toplanması

3.8.1 Dişeti Oluğu Sıvısı Toplanması ve DOS Hacim Ölçümü

Klinik indeksler alındıktan bir gün sonra DOS örnekleri sigara içen ve içmeyen kronik periodontitis tanısı konulan hastalardan, en derin periodontal ceplerin olduğu (≥5mm) 6 farklı bölgeden filtre kağıdı yöntemi ile kâğıt şeritler (periopaper®, OraFlow, PlainView, New York, NY, USA) kullanılarak toplandı. Periodontal yönden sağlıklı bireylerden DOS örneklemeleri klinik indeksler alındıktan bir gün sonra ve rastgele seçilen altı dişin birer yüzeyinden yapılmıştır [353, 354].

DOS örneklemelerinin bireylerin öğünlerinden ve diş fırçalamalarının üzerinden en az 1 saat geçtikten sonra yapılmasına özen gösterildi. Örnekleme öncesinde, DOS hacmine etki edebilecek olan diş yüzeyindeki plak ve yumuşak eklentiler dişetine dokunulmadan pamuk peletler yardımıyla dikkatli bir şekilde bölgeden uzaklaştırıldı. Örnek alınacak bölge hava ile kurutuldu ve tükürük kontaminasyonundan kaçınmak amacıyla pamuk rulolar yardımıyla izolasyon yapıldı. Standardize kağıt şeritler orta derecede basınç hissedilinceye kadar veya 1 mm'den fazla olmayacak şekilde cep içerisine yerleştirilerek 30 sn bekletildi [355].

Daha sonra kağıt şeritler steril eppendorf tüplerine konulup önceden kalibre edilmiş olan Periotron 8000® (Oraflow Inc, Plainview, N.Y, ABD) cihazında tartıldı. Elde edilen birim µl cinsine dönüştürülerek DOS hacmi hesaplandı ve kaydedildi [356, 357]. Hacim tayinlerinin örneklemeden hemen sonra yapılmasına dikkat edildi. Her hacim tayininden sonra cihazın kutupları, oluşabilecek sıvı kontaminasyonunu önlemek amacıyla kuru bir gazlı bez ile silindi. Kanla veya tükürük ile kontamine olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi ve alınan örnekler laboratuvar aşamasına kadar -30 Cº'de saklandı [357].

3.8.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Araştırmaya katılmayı kabul eden kronik periodontitisli ve periodontal sağlıklı bireylerin ilk seansta tüm ağız klinik ölçümlerinin yapılmasından 1 gün sonra serum vitamin D düzeylerinin analizi için tüm bireylerden Vacutainer ® firmasına ait hemogram tüplerine 5 ml. kan alınarak 1500 rpm'de (round per munite = devir/dakika) 10 dakika santifüj edilerek serumu ayrıştırıldı. Elde edilen serum örnekleri eppendorf tüplerine alınarak HPLC işlemlerinin yapılacağı tarihe kadar – 30 ºC' de saklandı [358].

3.9. Oral Hijyen Eğitimi ve Periodontal Tedavi

Başlangıç klinik kayıtlar titizlikle alındıktan, DOS ve serum örneklemesi yapıldıktan sonra, çalışma dizaynı içinde yer almamasına rağmen çalışmaya katılan tüm bireylere gerekli oral hijyen eğitimi (OHE) ve periodontal tedavi uygulamaları gerçekleştirildi.

Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm katılımcılara öncelikle periodontal hastalığın nedenleri ile ilgili bilgi verildi. Daha sonra periodontal hastalık etkeni mikrobiyal dental plağın nasıl uzaklaştırılması gerektiği anlatıldı. Buna göre; günde en az 2 defa, ortalama 2 dakika süre ile, orta sertlikte bir diş fırçası ile sabah kahvaltıdan sonra ve akşam yatmadan hemen önce olmak üzere dişlerini fırçalamaları gerektiği hem hasta ağızlarında plak boyayıcı ajanlar ile mikrobiyal dental plağın boyanıp gösterilmesiye, hem de modeller üstünde uygulamalı olarak anlatıldı. Ayrıca interdental temizliğin nasıl yapılması gerektiği anlatıldı ve interdental temizlik amacıyla hastaların dişlerindeki kontakt durumlarına göre uygun diş ipi veya ara yüz fırçaları önerildi [359].

Çalışmaya katılan tüm kronik periodontitisli hastalara rutin supragingival, subgingival diş yüzey temizliği ve subgingival kök yüzeyi düzeltmesini içeren başlangıç periodontal tedavileri (Faz-1) uygulandı. Mekanik periodontal tedaviye ek olarak antibiyotik veya antiinflamatuarlar gibi ilaçlar kullanılmadı. Birer hafta arayla en az 4 seans gerçekleştirilen Faz-1 tedaviden 4 hafta sonra kontrol edilen ve > 5 mm ve üzerinde sondlama derinliğine sahip olan ve sondlamada kanama

gösteren bölgelere flep operasyonu yapılması uygun görülerek gerekli uygulamalar gerçekleştirildi.

3.10. Laboratuvar İşlemleri

DOS örneklerinden ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile katelisidin LL-37 tayini Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Serum örneklerinden vitamin D tayini ise HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemleri ile Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.10.1. DOS Örneklerinin ELISA İçin Hazırlanması

Dişeti oluğu sıvısı örneklerinden LL-37 miktarlarının tayini için katelisidin LL-37'ye özgü Instant ELISA kiti (Human Cathelicidin antimicrobial peptide, CAMP ELISA Kit, CSB-E14948H,Cusabio, Wuhan, Hubei Province, P.R.China) kullanıldı.

DOS örneklerinden LL-37 tayini için öncelikle kağıt şeritlere emdirilip saklanan DOS örneklerinin ekstraksiyonu Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ile sağlandı [360]. Periopaperların olduğu Eppendorf tüplerine bu solüsyondan 200µL eklendi ve DOS'nın solüsyona geçişini sağlatmak için 2 - 8°C'de 5000 x g'de 5 dk santrifüj edildi.

Öncelikle katelisidin LL-37 tayini için standart solüsyonlar oluşturuldu. Bunun için kit içeriğinde bulunan LL-37 standart flakonunun içine 400µl Assay diluent eklendi ve nazikçe çalkalandı. Ardından 5 µl LL-37 standart şişesinden alınıp assay dilüent şişesi içine eklendi ve elde edilen karışımdan 250 µl pipet ile alınıp boş bir tüpe aktarıldı. Ardından bu karışımın yarısı alınıp içerisinde 250µl assay diluent solüsyon bulunan tüpe aktarıldı. Elde edilen son karşımın da yarısı pipet ile alınarak yine içerisinde 250 µl assay diluent bulunan tüpe eklendi ve bu şekilde yedi kez devam ettirildi. 1. tüpe sadece assay diluent eklenip negatif kontrol olarak çalışıldı. Standart solüsyonlar hazırlandıktan sonra üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA işlemlerine geçildi.

3.10.2. Örneklerden ELISA ile Katelisidin LL-37 Tayin Protokolü

DOS örnekleri anlatıldığı şekilde hazırlandıktan ve standart solüsyonlar oluşturulduktan sonra katelisidin tayini için kit içeriğindeki kullanma kılavuzuna bağlı kalarak ELISA işlemi için aşağıdaki sıra ile çalışıldı:

1. Tüm solüsyonlar ve örnekler oda ısısına getirildi.
2. Kullanılacak tamponlar, standartlar, konjugatlar ve yıkama solüsyonları kitin kullanım talimatlarına göre hazırlandı.
3. Standart solüsyonları oluşturmak için kitte belirlenen oranlarda ve 7 kez sulandırımları yapıldı.
4. Örnekler deney tamponu ile(1x) ile 1:100 oranında seyreltildi.
5. Örnekler ve standartlar ikişer adet olmak üzere mikroplak içindeki kuyucuklara konuldu ve işaretlendi. Kör kuyucuklara ise 100 µl deney tamponu(1x) konuldu
6. Örneklerin konulacağı kuyucuklara 80 µl deney tamponu konuldu. Üzerlerine 20 µl seyreltilmiş örneklerden konuldu ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
7. Yıkama yapılmadan sıvının uzaklaştırıldığı tüm kuyucuklara 100 µl Biotin-antibadi eklendi.
8. Mikroplağın üzeri, yapışkan bir streç film ile kaplanarak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon süresi bitiminde oda sıcaklığına ulaşıldıktan sonra yapışkan film çıkartılarak aspirasyon sağlandıktan sonra kuyucuklar otomatik Elisa yıkayıcısında 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile otomatik olarak yıkandı.
10. Tüm kuyucuklara 100µl HRP-avidin (1x) solüsyonu eklenip üzeri yapışkan film ile kaplanarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
11. Bu sürenin sonunda film çıkartılıp kuyucuklar otomatik yıkayıcı ile aynı şekilde ile 5 kez yıkandı.
12. Yıkama sonrasında 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve ışık almayan ortamda 37°C'de 15-30 dakika inkübe edildi.
13. Süre bitiminde tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki veriler hemen 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Chromate® Microplate Reader Awareness, Palm City, FL, USA) ile okutulup

elde edilen absorbans değerleri standartlar yardımı ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi formulüne uygun olarak hesaplandı.

Kullanılan ELISA kitinin LL-37 minimum saptanabilme limiti 0.156 ng/ml-10 ng/ml ve hassasiyet derecesi 0.039 ng/ml idi. Çalışmaya dahil edilen bireylerden toplanan DOS hacim miktarları, ELISA çalışmasından elde edilen LL-37' ye ait konsantrasyon değerleri ile çarpılarak, alınan DOS örnekleri içerisindeki LL-37'ye ait total miktarlar (pg) hesaplandı.

3.10.3. Serum Örneklerinden HPLC ile Vitamin D Tayini

Serum vitamin D seviyelerini tespit etmek için hastaların brakial venöz damarlarından vakumlu tüplere alınan kan 1500 devirde 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve serum kısmı çalışmaya kadar -30°C' de bekletildi. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kiti ile tüm işlemler üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Çalışma yapılacağı zaman derin dondurucudan alınan serum örnekleri karanlıkta çözüldükten sonra, her serum örneğinden 350 µL bir tüpe alınarak üzerine 400 µL metanol ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Daha sonra bunun üzerine 200 µL n-heptan ilave edilerek vortekste 15 sn karıştırıldı. Karışım 4000 devir/dk' da 3 dakika santrifüjlenerek üstteki hekzan fazı ayrıldı. Her bir serum örneği için hekzanla ekstraksiyon işlemi en az iki defa tekrarlandı. Böylece, serum içindeki D vitamininin tamamı hekzan fazına alındı. Ayrılan hekzan fazı azot gazı altında kuruluk sağlanıncaya kadar uçuruldu. Daha sonra örnekler tekrar 400 µL % 100 metanolde çözüldü ve 15 saniye karıştırılarak analize hazır hale getirildi. Tüpteki örneklerin tamamı cam tüplere aktarıldı ve flakonlara konularak analiz için cihaza yerleştirildi. Bu çalışmada, HPLC cihazı olarak Zivak-ZinMass Tandem-200PD LC-MS/MS Analyser kullanıldı.

3.11 İstatistiksel Analiz

Araştırma öncesinde gerekli hasta sayılarını belirlemek için yapılan güç analizine göre; %95 güvenilirlikte bu çalışma için 60 hastanın yeterli olacağı belirlendi. İstatistiksel analizler PASW istatistik versiyon 18 (Statistical Package for the Social Sciences- SPSS Inc., Chicago Ill.) yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin

normal dağılıma uygunluğu için One Sample Kolmogorov Smirnow testi uygulandı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak gösterildi. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirildi. Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde farka neden olan durumları tespit etmek amacıyla post hoc Tukey HSD testi kullanıldı. Olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için Bonferroni Düzeltmesi yapıldı. Korelasyon analizi için Pearson korelasyon analizi uygulandı. Anlamlılık p değeri <0.05 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Çalışmada yer alan kronik periodontitis hastaları ve periodontal açıdan sağlıklı bireylere ait demografik veriler çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Gruplara göre olguların demografik verileri

	GRUP K.P-1 (Sigara +) 20	GRUP K.P-2 (Sigara -) 20	GRUP K 20	p KP1-K	p KP2-K	p KP1-KP2
Kadın	7	7	14			
Erkek	13	13	6			
Yaş Ortalaması (±Std.sapma)	42.75 (±5,67)	42.7 (±7,55)	25.3(±1.1)	p<0,001	p<0,001	p=0,989

Çizelgede de görüldüğü gibi çalışmamız yaş ortalamaları 42.75 (±5,6) olan 7 kadın ve 13 erkekten oluşan sigara içen kronik periodontitis grubu (KP-1), yaş ortalamaları 42.7 (±7.5) olan 7 kadın ve 13 erkekten oluşan sigara içmeyen kronik periodontitis grubu (KP-2) ve yaş ortalamaları 25.3 (±1.1) olan 14 kadın ve 6 erkekten oluşan kontrol grubu (K) üzerinde yürütüldü.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre yaş açısından kronik periodontitis (KP-1 ve KP-2) grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiş (p<0,001), ancak KP-1 ve KP-2 grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,989)

4.1. Klinik Bulgular

Çalışmaya dahil edilen sigara içen kronik periodontitis(KP-1), sigara içmeyen kronik periodontitis (KP-2), ve periodontal açıdan sağlıklı kontrol (K) gruplarındaki bireylerin örnek bölgelerindeki ve tüm ağıza ait klinik ölçüm kayıtları incelendiğinde; Pİ, Gİ, SCD ve KAS) değerleri çizelge 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir. İstatistiksel sonuçlardan elde edilen ortalama ve standart sapma sonuçları dikkate alınmıştır.

KP-1, KP-2 ve K gruplarındaki bireylerin tüm ağız PI, GI, CD, KAS toplam (t) değerleri çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2**.** Tüm gruplara ait tüm ağız periodontal klinik kayıtlar

Klinik Parametre	Grup KP1 (ort±std) (sayı:20)	Grup KP2 (ort±std) (sayı:20)	Grup K (ort±std) (sayı:20)	p (KP.1-K)	p (KP.2-K)	p (KP.1-KP.2)
PI(t)	0,84±0,17	0,59±0,59	0,20±0,07	<0.001*	<0.001*	<0.001*
GI(t)	2,06±0,32	1,43±1,43	0,23±0,05	<0.001*	<0.001*	<0.001*
CD(t) (mm)	3,82±0,49	3,49±0,37	1,17±0,20	<0.001*	<0.001*	0.008*
KAS(t) (mm)	3,45±0,57	3,58±0,40	1,18±0,2	<0.001*	<0.001*	0.343

KP-1:Sigara içen kronik periodontitis grubu, KP-2:Sigara içmeyen kronik periodontitis grubu K: Periodontal açıdan sağlıklı kontrol grubu. PI(t): Plak indeksi toplam GI(t): gingival indeks toplam, CD(t): cep derinliği toplam, KAS(t): klinik ataşman seviyesi toplam. $p<0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * simgesi: gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre tüm ağız PI(t), GI(t), CD(t), ve KAS(t) değerleri KP-1 ve KP-2 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Tüm bu parametreler açısından KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında; plak indeksi (Pİt), gingival indeks (Gİt) değerleri KP-1 grubunda KP-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Sondlanabilir cep derinliği (SCDt) skorları yine KP-1 grubunda KP-2 grubuna oranla daha yüksek tespit edildi bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Klinik ataşman seviyesi (KASt) ölçümlerinin ise KP-2 grubunda KP-1 grubundaki bireylere oranla daha yüksek olduğu kaydedilirken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.343$)

KP-1, KP-2 ve K gruplarındaki bireylerin dişeti oluğu sıvısı örneklemelerinin yapıldığı bölgelere (örnek bölgesi) ait Pİ, Gİ, CD, KAS değerleri ve DOS hacmi ölçümü çizelge 4.3' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Tüm gruplara ait örnek bölgesi periodontal klinik kayıtlar ve DOS hacmi

Klinik Parametre	Grup KP1 (ort±std) (sayı:20)	Grup KP2 (ort±std) (sayı:20)	Grup K (ort±std) (sayı:20)	p (KP.1-K)	p (KP.2-K)	p (KP.1-KP.2)
PI	2,05±0,50	1,50±0,26	0,28±0,23	<0.001*	<0.001*	<0.001*
GI	1,73±0,37	1,84±0,35	0,23±0,23	<0.001*	<0.001*	0.301
CD (mm)	7,08±0,69	6,46±0,87	1,36±0,60	<0.001*	<0.001*	0.010*
KAS (mm)	6,12±0,60	5,63±0,62	1,45±0,55	<0.001*	<0.001*	0.011*
DOS hacmi (µl)	0,68±0,1	0,70±0,12	0,22±0,07	<0.001*	<0.001*	0.465

KP-1:Sigara içen kronik periodontitis grubu, KP-2:Sigara içmeyen kronik periodontitis grubu K: Periodontal açıdan sağlıklı kontrol grubu. PI: Plak indeks GI: gingival indeks ,CD: cep derinliği, KAS: klinik ataşman seviyesi. $p<0.05$ değeri için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. * simgesi: gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder.

Yapılan istatiksel değerlendirme sonucuna göre örnek bölgesi PI, GI, CD, KAS değerleri KP-1 ve KP-2 gruplarının herbirinde kontrol (K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Tüm bu parametreler açısından KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında; PI, CD, KAS değerleri KP-1 grubunda KP-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$,$p<0,05$). Örnek bölgesi GI değerleri ise KP-2 grubunda KP-1 grubuna göre daha yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.301$).

Alınan örneklerdeki DOS hacimleri KP-1 grubunda 0,68±0,1 µl, KP-2 grubunda 0,70±0,12 µl, K grubunda ise 0,22±0,07 µl olarak ölçüldü. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; DOS hacimleri KP-1 ve KP-2 yani kronik peridontitis

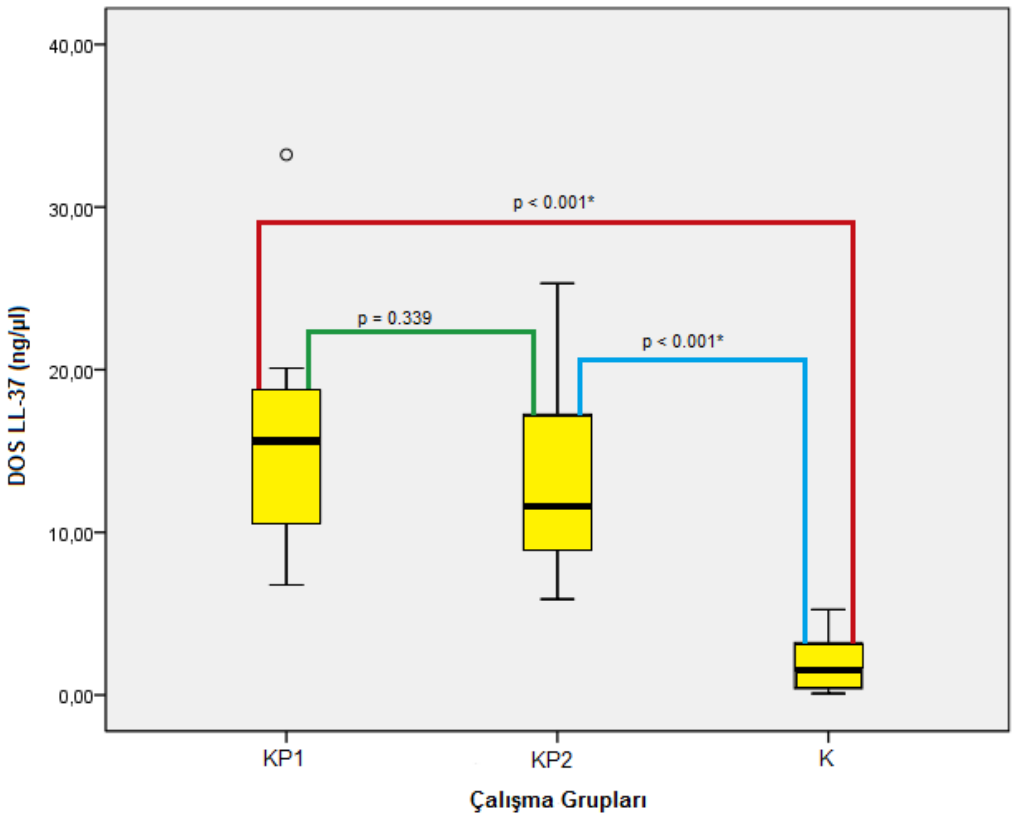
gruplarında kontrol (K) grubuna oranla göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001). Kronik periodontitis grupları arasında ise KP-2 grubunda DOS hacmi KP-1'e oranla yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.465).

4.2. Laboratuvar Bulguları

DOS LL-37 Seviyesi:

Çalışma gruplarının ELISA yöntemiyle tayin edilmiş olan DOS LL-37 konsantrasyon (ng/µl) ve total miktarlarının (pg) dağılımı şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir.

DOS katelisidin LL-37 konsantrasyon (ng/µl) düzeylerinin çalışma gruplarına göre dağılımı şekil 4.1'de gösterilmiştir.

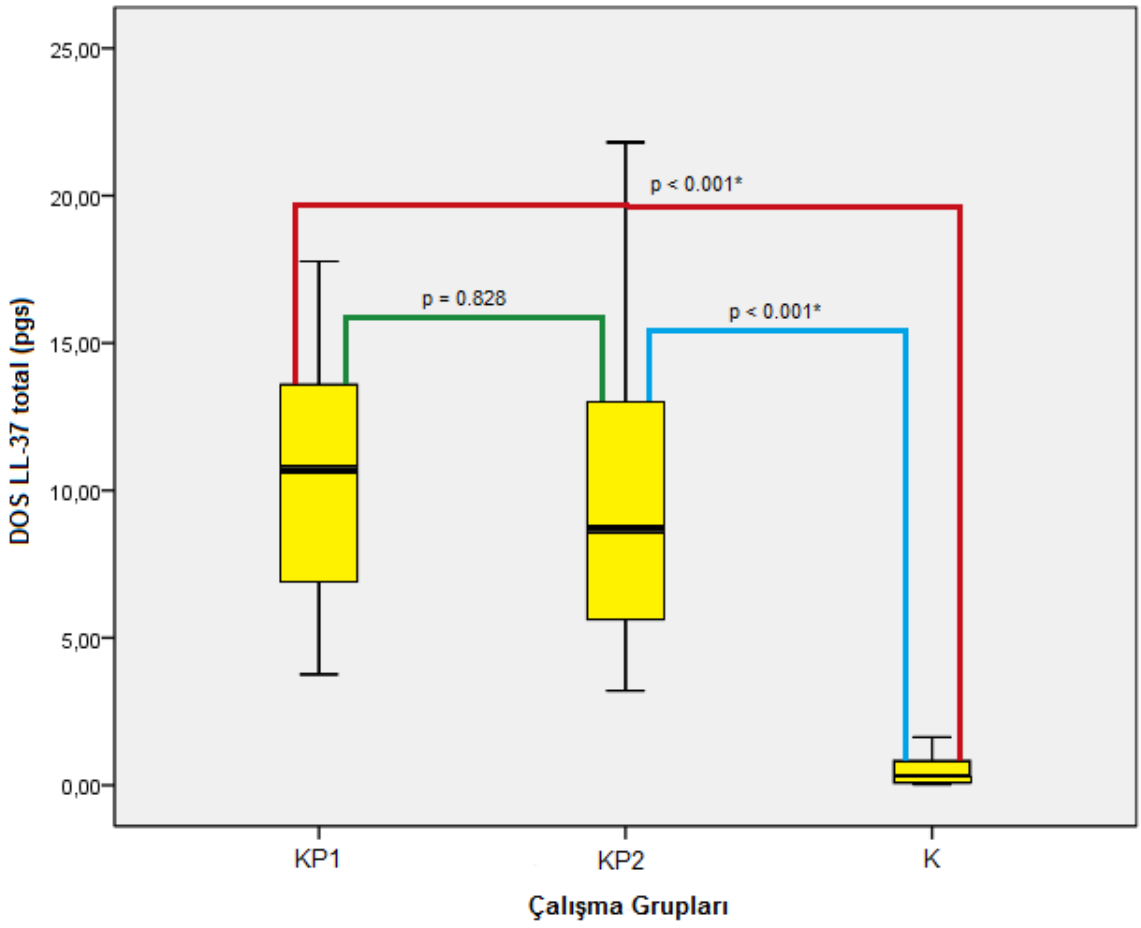


Şekil 4.1. Tüm gruplara ait DOS LL-37 konsantrasyon ölçümleri

Çalışma gruplarının DOS katelisidin LL-37 konsantrasyon değerleri incelendiğinde; bu değerlerin KP-1 grubunda 15,16±6,08 ng/µl, KP-2 grubunda 13,63±5,94 ng/µl,

K grubunda ise 1,99±1,72 ng/µl olduğu belirlendi. Buna göre; KP-1 ve KP-2 gruplarının DOS LL-37 konsantrasyon değerleri K grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu (p<0.001) KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında KP-1 grubunda DOS LL-37 konsantrasyon seviyesinin KP-2 grubuna göre daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,339)

DOS katelisidin LL-37 total (pg) düzeylerinin çalışma gruplarına göre dağılımı Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



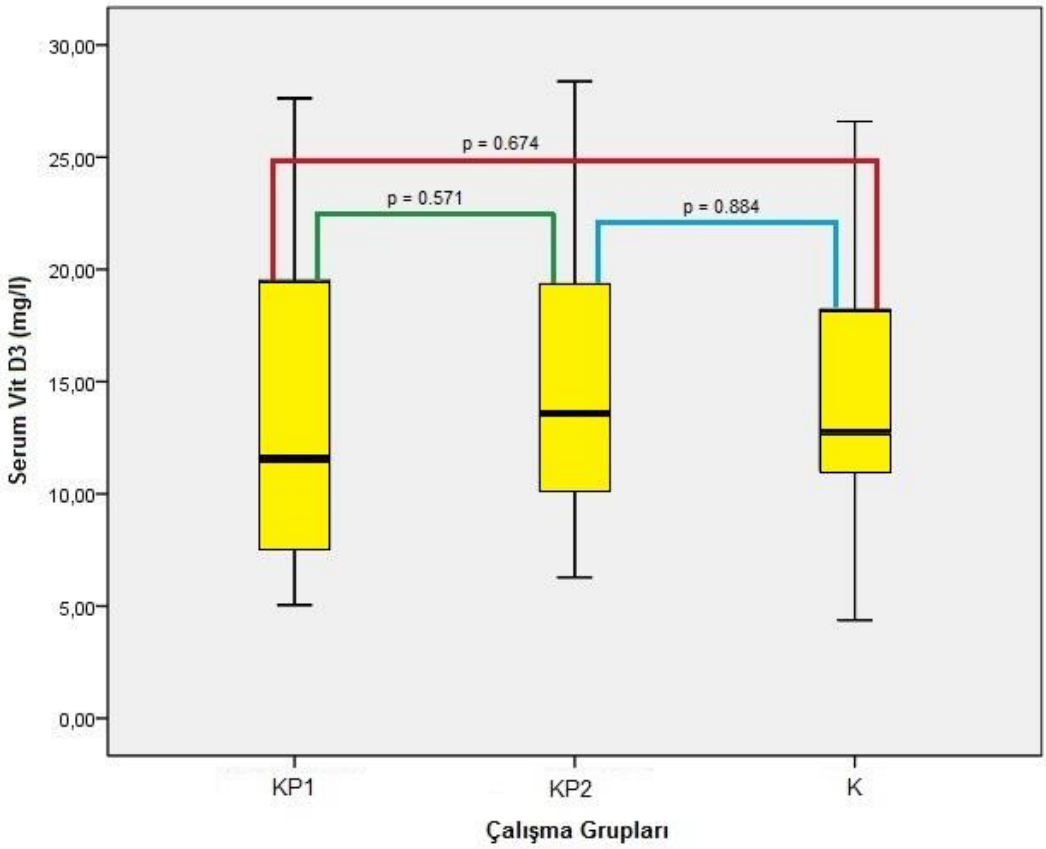
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait DOS LL-37 Total Ölçümleri

Çalışma gruplarının DOS katelisidin LL-37 total değerleri incelendiğinde; KP-1 grubunda 10,37±4,07 pg, KP-2 grubunda 10,08±5,77 pg, K grubunda ise 0,48±0,48 pg olduğu belirlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre; KP-1 ve KP-2 gruplarının DOS LL-37 total değerleri K grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunurken (p<0,001), KP-1 ve KP-2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (p=0,828).

Serum Bulguları:

Serum vitamin D3 miktarı KP-1 grubunda 12,43±6,97 mg/l; KP-2 grubunda 13,61±6,5 mg/l ve kontrol grubunda (K) 13,30±6,12 mg/l olarak saptandı.

HPLC yöntemiyle tayin edilmiş olan serum örneklerindeki vitamin D3 miktarlarının (mg/l) çalışma gruplarına göre dağılımı şekil 4.3'de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Sigara içen ve içmeyen Kronik Periodontitis ve Kontrol Gruplarının serum vitamin D3 Ölçümleri

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre sigara içmeyen kronik periodontitis grubu (KP-2) serum vitamin D3 seviyeleri; sigara içen kronik

periodontitis grubuna (KP-1) oranla daha yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,571). Yine KP-1 ve kontrol (p=0,674); ve KP-2 ve kontrol grupları (p=0,884) arasında da serum vitamin D3 seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

4.3. Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

Çalışmamızda yer alan sigara içen kronik periodontitis (KP-1), sigara içmeyen kronik periodontitis (KP-2) ve periodontal olarak sağlıklı kontrol (K) gruplarının; örnek bölgesi klinik verileri (Pİ, Gİ, SCD, KAS), tüm ağız kinik verileri (Pİt, Gİt, SCDt, KASt), DOS katelisidin LL-37 seviyeleri, DOS hacim ölçümleri ve serum vitamin D3 seviyelerini içeren klinik ve laboratuar bulgularına ilişkin korelasyon verileri Pearson korelasyon analizi kullanılarak elde edilmiş ve çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Örnek bölgelerine ait klinik parametre ortalamaları kendi içinde değerlendirildiğinde; PI ile GI (r=0,784), CD (r=0,864) ve KAS (r=0,876) arasında, GI ile CD (r=0,905) ve KAS (r=0,906) arasında ve CD ile KAS (r=0,985) arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon bulunmuştur (p<0,01).

Tüm ağıza ait klinik parametre ortalamaları kendi içinde değerlendirildiğinde; PI ile GI (r=0,852), CD (r=0,814) ve KAS (r=0,768) arasında, GI ile CD (r=0,873) ve KAS (r=0,825) arasında ve CD ile KAS (r=0,911) arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon saptanmıştır (p<0,01).

Pearson korelasyon analiz testine göre laboratuvar bulgularının klinik parametreler ile korelasyon verileri incelendiğinde; DOS hacmi ile PI (r=0,771) ve PI t (r=0,696); GI (r=0,847) ve GI t (r=0,779); CD (r=0,878) ve CD t (r=0,883); KAS (r=0,879) ve KAS t (r=0,844) arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar olduğu görülmüştür. (p<0,01)

Çizelge 4.4.Tüm Gruplara ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

	DOS hacmi (µL)	VitD3 (mg/l)	PI (t)	GI (t)	CD (t) (mm)	KAS (t) (mm)	PI	GI	CD (mm)	KAS (mm)	LL-37 (ng/ml)	LL-37 (pgs)
DOS hacmi (µL)	1											
VitD3 (mg/l)	-,010	1										
PI (t)	,696**	-,014	1									
GI (t)	,779**	-,085	,852**	1								
CD (t) (mm)	,883**	,001	,814**	,873**	1							
KAS (t) (mm)	,844**	,016	,768**	,825**	,911**	1						
PI	,771**	-,110	,879**	,852**	,863**	,804**	1					
GI	,847**	,025	,740**	,803**	,863**	,837**	,784**	1				
CD (mm)	,878**	-,064	,797**	,893**	,942**	,872**	,864**	,905**	1			
KAS (mm)	,879**	-,033	,808**	,896**	,923**	,867**	,876**	,906**	,985**	1		
LL-37 (ng/ml)	,771**	,086	,666**	,705**	,752**	,753**	,604**	,767**	,756**	,743**	1	
LL-37 (pgs)	,842**	,069	,612**	,664**	,760**	,736**	,598**	,753**	,751**	,739**	,964**	1

(*p<0,05,**p<0,01)

DOS LL-37 konsantrasyon değerleri ile PI (r=0,604) ve PI t (r=0,666); GI (r=0,767) ve GI t (r=0,705); CD (r=0,756) ve CD t (r=0,752); KAS (r=0,743) ve KAS t (r=0,753) arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar bulunmuştur. (p<0,01)

DOS LL-37 total değerleri ile PI (r=0,598) ve PI t (r=0,612); GI (r=0,753) ve GI t (r=0,664); CD (r=0,751) ve CD t (r=0,760); KAS (r=0,739) ve KAS t (r=0,736) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir. (p<0,01)

Çalışmamızda DOS ve serumda düzeyleri değerlendirilen parametrelerle ilgili olarak yapılan korelasyon analizi sonuçlarına göre; DOS hacmi ile DOS LL-37 konsantrasyonu (r=0,771) ve DOS LL-37 total miktarları (r=0,842) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (p<0,01).

Çalışmamızda tüm gruplar kendi içerisinde klinik ve laboratuvar veri analizlerinin korelasyonu açısından ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.3.1. KP-1 Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

Sigara içen kronik periodontitis grubuna (KP-1) ait örnek bölgesi klinik verileri (PI, GI, CD, KAS), tüm ağız kinik verileri (PIt, GIt, CDt, KASt), DOS katelisidin LL-37 seviyeleri, DOS hacim ölçümleri ve serum vitamin D3 seviyelerini içeren klinik ve laboratuar bulgularına ilişkin korelasyon verileri çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

KP-1 grubunda DOS katelisidin LL-37 konsantrasyonu ile serum vitamin D3 seviyeleri (r=0,510); ve DOS LL-37 total miktarları ve serum vitamin D3 seviyeleri (r=0,506) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Aynı zamanda KP-1 grubunda KAS ve CD ölçümleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu tespit edilmiştir (r=0,662).

Çizelge 4.5. KP-1 Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

	DOS hacmi (µL)	VitD3 (mg/L)	PI (t)	GI (t)	CD (t) (mm)	KAS (t) (mm)	PI	GI	CD (mm)	KAS (mm)	LL-37 (ng/ml)	LL-37 (pgs)
DOS hacmi (µL)	1											
VitD3 (mg/L)	,105	1										
PI (t)	-,208	,011	1									
GI (t)	-,279	-,264	-,057	1								
CD (t) (mm)	-,043	,297	,086	-,208	1							
KAS (t) (mm)	-,276	,339	,303	-,210	,393	1						
PI	,064	-,246	,522*	-,295	,210	,141	1					
GI	-,044	,001	,039	-,089	-,105	-,312	,036	1				
CD (mm)	,188	-,173	-,180	,098	,131	-,335	,071	,362	1			
KAS (mm)	,398	-,147	-,148	,121	-,222	-,391	,164	,122	,662**	1		
LL-37 (ng/ml)	,0001	,510*	,077	-,058	-,188	,132	-,439	,292	-,250	-348,	1	
LL-37 (pgs)	,410	,506*	-,032	-,162	-,147	-,037	-,356	,261	-,151	-,184	,901**	1

(*p<0,05,**p<0,01)

4.3.2. KP-2 Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

Sigara içmeyen kronik periodontitis grubuna (KP-2) ait örnek bölgesi klinik verileri (PI, GI, CD, KAS), tüm ağız kinik verileri (PIt, GIt, CDt, KASt), DOS katelisidin LL-37 seviyeleri, DOS hacim ölçümleri ve serum vitamin D3 seviyelerini içeren klinik ve laboratuar bulgularına ilişkin korelasyon verileri çizelge 4.6'da gösterilmektedir.

Buna göre; DOS hacmi ile CD(t) (r=0,596) , DOS LL-37 total seviyeleri (r=0,743) ve DOS LL-37 konsantrasyon değerleri (r=588) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar tespit edilmiştir.

KP-2 grubunda KAS skorları ile CD(t) (r=0,533) ve CD (r=0,804) skorları arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar görülmüştür.

Ayrıca CD(t) değerleri ile DOS LL-37 total seviyeleri (r=0,611) ($p<0,01$) ve DOS LL-37 konsantrasyon değerleri (r=0,522) arasında poziitif yönde anlamlı korelasyonlar tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.6. KP-2 Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

	DOS hacmi (µL)	VitD3 (mg/l)	PI (t)	GI (t)	CD (t) (mm)	KAS (t) (mm)	PI	GI	CD (mm)	KAS (mm)	LL-37 (ng/ml)	LL-37 (pgs)
DOS hacmi (µL)	1											
VitD3 (mg/l)	,035	1										
PI (t)	-,173	,211	1									
GI (t)	-,223	-,118	,226	1								
CD (t) (mm)	,596**	-,076	-,042	-,384	1							
KAS (t) (mm)	,198	-,151	-,137	,276	-,166	1						
PI	-,018	-,173	,445*	,216	,039	-,027	1					
GI	,253	,386	,212	-,030	,136	-,010	-,222	1				
CD (mm)	,123	-,224	-,096	-,360	,667**	-,153	-,183	,082	1			
KAS (mm)	,018	-,002	,122	-,320	,533*	-,187	-,020	,290	,804**	1		
LL-37 (ng/ml)	,588**	-,053	,002	-,115	,522*	,313	-,166	,310	,374	,364	1	
LL-37 (pgs)	,743**	-,074	-,044	-,151	,611**	,335	-,117	,271	,349	,281	,972**	1

(*p<0,05,**p<0,01)

4.3.3. K Grubu Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

Periodontal açıdan sağlıklı kontrol (K) grubuna ait örnek bölgesi klinik verileri (PI, GI, CD, KAS), tüm ağız kinik verileri (PIt, GIt, CDt, KASt), DOS katelisidin LL-37 seviyeleri, DOS hacim ölçümleri ve serum vitamin D3 seviyelerini içeren klinik ve laboratuar bulgularına ilişkin korelasyon verileri çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Buna göre; DOS hacmi ile DOS LL-37 total seviyeleri (r=0,543) arasında pozitif yönde güçlü korelasyon varlıığı tespit edilmiştir (p<0,05). Ayrıca KAS ölçümü ile CD (r=0,971), GI (r=0,716) ve PI (r=0,638) arasında pozitif yönlü korelasyonlar görülmektedir (p<0,05).

İlaveten K grubunda GI ölçümleri ile PI (r=0,613) ve CD (r=0,711) arasında ve PI ile CD ölçümleri arasında (r=0,645) pozitif yönde anlamlı korelasyonlar tespit edilmiştir (p<0,05).

Çizelge 4.7**.** K Grubuna Ait Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Korelasyon Analizleri

	DOS hacmi (µL)	VitD3 (mg/l)	PI (t)	GI (t)	CD (t) (mm)	KAS (t) (mm)	PI	GI	CD (mm)	KAS (mm)	LL-37 (ng/ml)	LL-37 (pgs)
DOS hacmi (µL)	1											
VitD3 (mg/l)	-,165	1										
PI (t)	,207	-,108	1									
GI (t)	-,234	,290	-,187	1								
CD (t) (mm)	,053	-,108	-,011	-,319	1							
KAS (t) (mm)	,110	-,146	,068	-,304	,988**	1						
PI	-,088	-,005	-,112	,024	-,217	-,231	1					
GI	-,008	-,182	-,221	-,115	,105	,084	,613**	1				
CD (mm)	,045	,033	-,140	-,046	-,189	-,207	,645**	,711**	1			
KAS (mm)	-,049	,115	-,150	,036	-,253	-,271	,638**	,716**	,971**	1		
LL-37 (ng/ml)	,224	-,273	,192	-,240	-,201	-,176	,145	,125	,065	,033	1	
LL-37 (pgs)	,543*	-,325	,224	-,259	-,156	-,118	-,014	,055	-,051	-,090	,910**	1

(*p<0,05,**p<0,01)

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalıklar için esas etiyolojik faktör mikrobiyal dental plak ve plak içerisindeki mikroorganizmalar olarak bilinse de periodontal hastalığın gelişimi ve ilerlemesi için mikrobiyal eklentilerin varlığının tek başına yeterli olmadığı; aynı zamanda mikrobiyal dental plaktaki patojen bakteriler ve konak doku savunma mekanizması arasındaki indirekt etkilerin de rol oynadığı bildirilmiştir [45, 319].

Kronik periodontitis;, mikroorganizmalar tarafından diş destek dokularında yıkım ile karakterize, ataşman kaybı, peridontal cep oluşumu ve alveol kemik kaybı ile seyreden kronik karakterde enfeksiyöz bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Klinik olarak hastalığın teşhisinde artmış cep derinliği ve klinik ataşman kaybı yanında radyografik olarak da kemik kaybı izlenir [361]. Hastalığın ortaya çıkışında patojen türlerin varlığı kadar, mikrobiyal dental plak antijenlerine karşı enflamatuar sitokinler, peptitler ve enzimler üreten bir konak cevabı ile konak doku savunma sistemleri arasındaki dengenin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir [48, 97]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, kronik periodontitisin toplumların %10 ile 15'inde görülen bir hastalık olduğu, agresif periodontitisin ise görülme oranının %0,1 ile %2 arasında olduğu belirtilmektedir [88].

Son yıllarda, periodontal biofilm oluşumu ile bakteri invazyonuna sürekli maruz kalan dişeti epitelinin, mikrobiyal ataklara karşı fiziksel bir bariyer olarak görev almakla kalmayıp, ayrıca konak doku cevabını da başlatarak doğal immün yanıta katkı sağladığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir [106, 362]. Bu anlamda bakıldığında dişeti epiteli hücreleri, başta nötrofiller olmak üzere diğer savunma sistemi hücreleri; sitokinler, kemokinler ve antimikrobiyal peptitler (AMP) gibi diğer konak savunma moleküllerinin üretimini sağlayarak konak doku cevabını başlatırlar [363].

Patojenlere karşı konak dokunun ilk savunma hattını oluşturan doğal immün sistemin önemli bileşenleri olan AMP'ler biyolojik aktivite çeşitliliği ile doğal antibiyotikler olarak görülmektedirler [123, 364]. Genellikle katyonik ve amfipatik yapıda olan AMP'ler bu özellikleri sayesinde negatif yüklü mikrobiyal hücresel membranlara direkt olarak etki ederek mikroorganizmaları inaktive edebilmektedirler. AMP'lerin antimikrobiyal aktiviteye ek olarak immün hücrelerin

kemoatraksiyonu, inflamatuar mediatörlerin epitelyal hücrelerden salınımı, yara iyileşmesini destekleme ve adaptif immün cevabın başlatılması gibi değişken fonksiyonlar ile inflamasyon sürecinde birçok aşamada görev aldıkları bilinmektedir [129]. AMP'lerin fonksiyonel sınıflarından biri olan katelisidinler günümüze kadar birçok memeli türünde tanımlanmış olup ve her birinde yapısal olarak farklılıklar göstermektedir [12].

Katyonik yapıda antimikrobiyal peptitlerden katelisidin ailesinin insanlarda bilinen tek üyesi olan insan katyonik antimikrobiyal peptit hCAP18, nötrofillerin ve birçok farklı hücrenin sekonder granüllerinde inaktif prekürsör-öncü halinde bulunur. hCAP18'in proteolitik aktivasyonu ile antimikrobiyal ve immunmodülatör etkiden sorumlu katelisidin LL-37 üretilir [168]. Katelisidin LL-37, inflame olmuş bölgelerde nötrofillerden, keratinositlerden ve mukozal epitelyal hücrelerden salınır, dokunun ilk savunma hattını oluşturarak inflamasyon ve doku yaralanması sürecinde salınımları artar [365].

LL-37, antibiyotiklere dirençli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı geniş bir antimikrobiyal aktivite sergiler. Doza bağımlı olarak hedef bakteri membran geçirgenliğini artıran yada direkt olarak MIK seviyesinde bazı bakterilerin dış membran bütünlüğünü bozan LL-37 aynı zamanda bakteri endotoksinleri ve lipopolisakkaritlerini nötralize eder [163, 366]. LL-37 aynı zamanda immun sisteme ait olan ve olmayan birçok hücre üzerinde immünmodulatör etki göstererek doğal bağışıklığa katkıda bulunur. Bu fonksiyona örnek olarak; nötrofillerin kemotaktik hareketlerini direkt olarak etkilemeleri ve dişeti fibroblastlarında interlökin-8 (IL-8) salınımını indüklemeleri verilebilir [367, 368]. Katelisidin LL-37, periodontal hastalıkta oral mukozal inflamasyonun başlaması için gerekli olabilecek siklo-oksijenaz-2 ve prostaglandin E_2 (PGE_2) salınımını da indüklemektedir [369]. Ayrıca bir çeşit konjenital nötropeni bulunan Morbus Kostmann sendromu olan bireylerde periferal nötrofillerin katelisidin LL-37 üretimi yapamadığı ve buna bağlı olarak şiddetli alveoler kemik kaybı ile karakterize ileri derecede periodontitis tablosu geliştiği bildirilmektedir [224, 370].

Yapılan çalışmalarda LPS ile stimüle edilen insan nötrofil örneklerinde, ortamda LL-37 varlığında, doza bağımlı etki ile; IL-1β, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi periodontal inflamasyonda görev alan önemli pro-inflamatuar sitokinlerin salınımında anlamlı

ölçüde düşüş görüldüğü ve LL-37'nin bu yolla nötrofil fonksiyonlarını modüle ederek antimikrobiyal aktiviteyi artırdığı rapor edilmiştir [371]. Aynı zamanda LL-37'nin LPS ile indüklenen sitokin (IL-6) ve kemokin (moonosit kemoatraktan protein-1) salınımını azalttığı ve yüksek konsantrasyonlarda insan periodontal ligament hücrelerinde DNA sentezini inhibe ederek veya apoptozisi destekleyerek hücre proliferasyonunu azalttığı ve böylece anti-prolliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [372]. Bir diğer in vitro çalışmada ise, LL-37'nin insan periodontal ligament hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörü A'nın (VEGF-A) üretimini indükleyerek anjiyogenezisi destekleyebildiği ve bu yolla periodontal rejenerasyona katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür [373]. Supanchart ve diğerleri de yaptıkları in vitro çalışma sonuçlarına dayanarak LL-37 varlığında monositlerin farklılaşarak osteoklast hücrelerine dönüşemediklerini ve LL-37'nin osteoklast gen sentezini azaltarak in vitro olarak osteoklastogenezisi inhibe ettiğini bildirmişlerdir [374].

LL-37, periodontopatojen bakterilere karşı geniş antimikrobiyal aktivite göstermesine karşın bu etkinlik bakteri hücrelerinin elektrik yükü gibi farklılıklar sebebiyle farklı türler ve suşlar üzerinde değişmektedir. Ouhara ve diğerleri Fusobacterium nucleatum'un LL-37'ye yüksek oranda hassas olduğunu belirtmiştir [375]. Bu sonuçlara paralel olarak Bachrach ve diğerleri de yaptıkları in vitro çalışmada F.nucleatum'un LL-37'ye çok hassas olduğunu, aksine P.gingivalis'in ise bu antimikrobiyal peptite dirençli olduğunu bildirmişlerdir [236]. Gutner ve diğerleri de yüksek proteolitik aktivite gösteren periodontopatojen P.gingivalis'in LL-37'ye karşı bu direnci sağlamada gingipain proteazları ile gerçekleştirdiği proteolitik inakivasyonun rolü olduğunu belirtmektedirler [233]. Hosokawa ve diğerleri de *Prevotella intermedia, F. nucleatum, Eikenella corrodens ve A. actinomycetemcomitans*'ın toksinleri ile uyarılan dişeti epitel hücreleri yada nötrofillerden LL-37 üretimine neden olduğunu belirtmişlerdir. Ancak aynı çalışmada araştırıcılar, P.gingivalis'in diğer periodontopatojenlere nazaran daha az defensin ya da LL-37 katelisidin üretimine neden olduğunu göstermişler ve P.gingivalis'in periodontopatojenik rolünün dişeti epitel hücreleri yada nötrofillerden LL-37 üretimini baskılaması ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir [376]. Yapılan çalışmalarda periodontitisin ilerleyişi boyunca DOS katelisidin LL-37 ve defensinlerin salınımında artış görüldüğü belirtilmektedir [377, 378]. Bu bilgiler

dahilinde planlanan çalışmamızda etiyolojisinde yukarıda bahsedilen peridontopatojenlerin baskın olarak rol oynadığı kronik periodontitisli bireylere ait DOS örneklerinde katelisidin LL-37 seviyelerini değerlendirmeyi amaçladık.

Hastalık teşhisinde klinik parametrelerin yanında değişik laboratuvar esaslı tanısal metotlara da ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tanısal metotlarda sıklıkla DOS, periferal kan, serum, tükrük gibi vücut sıvıları ile dişeti dokularının incelenmesinden faydalanılmaktadır [347, 379]. Periodontal hastalıkların gelişimi, şiddeti, dağılımı ve bireylerin periodontal hastalıkların tedavisine karşı verdikleri cevap ile ilgili bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada DOS ve serum en sık başvurulan örnekleme türüdür [380, 381]. DOS; içeriği bakımından serum kaynaklı iltihabi bir eksudadır ve içeriğindeki antimikrobiyal peptitler, sitokinler, serum proteinleri, periodontal doku kökenli proteinler ve çeşitli enzimlerin periodontal hastalık patogenezindeki önemli rollerinden dolayı pek çok çalışmaya konu olmuştur [118, 348, 377, 382, 383]. Lamster ve arkadaşları interdental bölgelerden elde ettikleri DOS içeriğinin değerlendirilmesinin, bu dokularda meydana gelen biyokimyasal değişimler hakkında bilgi verebileceğini bildirmişlerdir [384]. Katelisidin LL-37 temel olarak nötrofillerden köken alır ve inflamatuar bölgeye ulaşarak etkili olur. Dişeti epitel hücreleri, özellikle birleşim epiteli, nötrofiller ve tükrük bezlerinden de salınan LL-37; DOS, tükrük ve serum gibi vücut sıvılarında tespit edilmiştir [3, 32]. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda kronik periodontitisli bireylerdeki katelisidin LL-37 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla DOS örneklerinin alınması planlandı.

Literatürde, vitamin D3'ün yeterli miktarda alımının kalsiyum homeostazisi ve kemik metabolizmasının idamesi için gerekli olduğu vurgulanmaktadır [385, 386]. Esas fonksiyonlarının yanında Vitamin D'nin aktif hormonal formu olan vitamin D3'ün, dendritik hücreler ve T-B lenfositlerin uyarılmasını sağlayarak kazanılmış immunitede ve epitelyal bariyerlerde antimikrobiyal savunmayı destekleyerek de doğal immünitede immün regülatör olarak görev yaptığı belirlenmiştir [303, 387-389]. Vitamin D gerek immünomodulatör gerekse kemik mineral yoğunluğu (BMD) üzerindeki etkileri ile periodontal hastalık gelişimi sürecinde rol oynayabilmektedir [390, 391]. Dietrich ve diğerleri; 50 ve daha üzeri yaşta hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada serum $25(OH)D_3$ konsantrasyonları ile kronik periodontitis arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ters yönlü ilişki bulunduğunu göstermişlerdir [297]. Vitamin D'nin kemik şekillenmesi ve korunmasında önemli rolleri olduğu

bilinmektedir [392], ve çok sayıda epidemiyolojik araştırmada osteopöroz veya düşük kemik yoğunluğu ile alveoler kemik ve diş kaybı arasındaki pozitif ilişki kanıtlanmış ve zayıf kemik kalitesinin periodontal hastalık gelişiminde bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür [271, 275, 393].

Vitamin D3 immunmodülatör etkilerini vitamin D cevap elementi (VDRE) aracılığıyla gerçekleştirir. Katelisidin LL-37 sentezlenmesini sağlayan insanlarda bulunan tek gen olan CAMP geninde, VDRE bağlanması için düzenleyici bir bölge bulunmaktadır. Aktif formdaki vitamin D3 ($1,25(OH)_2D_3$) ve vitamin D reseptörü CAMP genini ve katelisidin LL-37 üretimini uyarır. Başka bir deyişle bakteri, bakteri endotoksinleri, inflamasyonun başlaması ve LPS salınımı gibi faktörlerin yanında; katelisidin LL-37 salınımı aynı zamanda vitamin D3 tarafından da indüklenir ve düzenlenir [17, 251, 305, 389]. Vitamin D3'ün gerek kemik ve kalsiyum metabolizmasındaki fonksiyonları ile periodontitis gelişimi üzerindeki etkileri; gerekse de katelisidin LL-37 antimikrobiyal peptit salınımını uyararak periodonsiyumda konak doku savunmasına sağladığı katkılar sebebiyle, çalışmamızda kronik periodontitisli hastalarda serum vitamin D3 seviyeleri değerlendirildi.

Periodontal hastalık gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak bildirilen sigara kullanımı, lokal ve sistemik konak savunma sistemini olumsuz yönde etkilemektedir [394]. Günümüze kadar farklı popülasyonlarda sigara kullanımı ile periodontal hastalık arasındaki güçlü ilişkiyi ortaya koyan çok sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır [23, 395-398]. Genel olarak bu çalışmalardan elde edilen veriler; sigara içen bireylerin daha ileri derecede periodontal hastalık sergilediğini, artmış oranda periodontal cep derinliği, ataşman kaybı, diş eti çekilmesi ve diş kaybı oranına sahip olduklarını göstermektedir [399, 400].

Sigara; içeriğindeki çeşitli toksik bileşenler sayesinde mukozal yüzeyler ve peridontal dokularda öncü ve baskılayıcı immünoinflamatuar etkiyi tetikler. İlaveten patojenlere karşı oluşan doğal savunmayı bozabilir, antijen sunumunu değiştirebilir ve böylece adaptif immün cevabı modüle edebilir [401]. Lokal olarak, sigarada bulunan nikotinin kan damarlar üzerine vazokonstrüktif etkisi, dişetinde kan akımında yavaşlamaya ve muhtemelen dişetine geçen hücre sayısında, oksijen miktarında ve diğer kan içeriklerinde azalmaya neden olur, böylece doku

yıkım ürünlerini uzaklaştırma yeteneğini de düşürür [402]. Sistemik olarak, periferal kandaki nötrofil fonksiyonunu engeller ve antikor üretimini azaltır [403]. Sigaradaki suda çözünebilen komponentlerin ve tütün metabolitlerinin normal PMNL kemotaktik ve fagositik yeteneklerini olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir [402]. Bu noktalardan hareketle çalışmamızda; savunma sistemini baskılayabildiği belirtilen sigaranın kronik periodontitisli bireylerde periodontal klinik ölçümlere ve DOS LL-37 seviyelerine olası etkilerinin değerlendirilmesi hedeflendi.

Literatür incelendiğinde periodontitis gelişimi ile vitamin D ve sigara kullanımı arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda çalışma bulunmasına karşın, farklı periodontal hastalık gruplarında DOS katelisidin LL-37 seviyeleri ile periodontitis ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda araştırma olduğu görülmektedir. Ayrıca sigara içen ve içmeyen kronik periodontitis gruplarında DOS katelisidin LL-37 seviyeleri ile serum vitamin D3 seviyelerinin incelendiği ve klinik parametreler ile biyokimyasal veriler arasındaki korelasyonların ortaya konduğu herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmadaki amacımız; sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda DOS LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin birbirleriyle ve klinik parametreler arasındaki olası ilişkiyi araştırmak ve sigaranın bu değerler üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Çalışmamızın bu anlamda bir ilk olduğu ve bu parametrelerin periodontal patogenezdeki rollerinin daha iyi anlaşılması açısından literatüre katkı sağlayacağı inancındayız.

Bu çalışmada elde edilecek veriler için yapılan güç analizine göre; %95 güvenilirlik ile bu çalışma için 60 hastanın yeterli olacağı belirlendi. Çalışmamızda sigara içen kronik periodontitis grubu KP-1 (20); sigara içemeyen kronik periodontitis grubu KP-2 (20) ve periodontal açıdan sağlıklı kontrol K (20) grubunu oluşturan toplam 60 bireyin mevcut periodontal durumlarını belirlemek için tedavi programına göre periodontal tedaviye başlamadan önce PI, GI, CD, ve KAS skorlarını içeren klinik indeks kayıtları literatürde belirtildiği gibi dişlerin altı yüzeyinden (mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiopalatinal/lingual, midpalatinal/lingual, distopalatinal/lingual) kaydedildi [357]. Bireylerin oral hijyen durumlarını ve mevcut bakteri plağı miktarını belirlemek için subjektif bir metod olmasından ve günümüzde de en geçerli plak indeksleri arasında yer almasından dolayı Silness ve Löe‘nün geliştirdiği plak indeks skorlarından yararlanıldı [351]. Hastaların dişeti sağlığı durumlarını belirlemek için ise Löe ve Silness’ in geliştirdiği gingival

indeksten faydalanıldı [352]. Bu indeks sistemi dişetindeki enflamasyon bulguları arasında yer alan renk ve kontur değişikliği ve dişeti kanaması gibi belirtileri aynı anda değerlendirdiği için tercih edildi.

Periodontal indekslerin, hastalığın aktivitesini göstermede etkili fakat sınırlı olduğu düşünülmektedir. Hastalığın aktivitesinin, hastalığın seyrinin, tedavi başarısının belirlenmesinde farklı ek diagnostik yöntemlerden yararlanılmaktadır. DOS örnekleri, periodontal hastalığın düzeyini belirlemede kolay, tekrarlanabilir ve atravmatik olarak elde edilebilen minimal invaziv bir prosedür olarak bildirilmektedir. DOS'taki spesifik içeriklerin analizi, bireyin periodontal sağlık durumunu yansıtan lokal hücresel metabolizmanın biyokimyasal olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır [404]. Literatürde uzun süre cep içinde bekletilen kağıt şeritlerin cep içerisinde irritasyonu artırıp iltihabi eksudanın cep içinde yoğunlaşmasına sebep olacağından uygulama süresinin 5 dakikadan uzun olmaması önerilmektedir [405]. Bu nedenle çalışmada katelisidin LL-37 antimikrobiyal peptit tespiti için yapılan DOS örneklemesi esnasında; kağıt şeritler periodontal cep içerisinde 30 sn bekletildi [406]. İltihabi eksudanın ve/ veya subgingival plak içeriğinin DOS örneğine ilave olması ile saptanan DOS hacmi artabilmekte, elde edilen örnkeler bu eksuda ile dilüe olup sonuç konsantrasyon değerini etkileyebilmektedir [119]. Ayrıca bölgede DOS örneklemesi yapılırken cep içerisine yerleştirilen kağıt şeritler de cep florasını ve bölgedeki plak miktarını etkileyebilmekte ve dişetini uyararak kanamaya sebep olabilmektedir. Bu nedenle pek çok çalışmada klinik indeks kayıtları ile DOS örneklemeleri ayrı zamanlarda yapılmıştır [407, 408]. Çalışmamızda da klinik indeks ölçümlerinin kaydedilmesinden bir gün sonra DOS örnekleri toplandı. Toker ve diğerlerinin belirttiği gibi DOS'da sitokinlerin incelendiği çalışmalarda sadece sitokinlerin konsantrasyonlarını belirlemek tek başına yeterli olmamaktadır. Aynı çalışmada DOS hacimlerinde oluşabilecek faklılıkların konsantrasyon değerlerini değiştireceği için DOS'ndaki total miktarlarının değerlendirilmesinin de gerekli olduğu vurgulanmıştır [409]. Bu nedenle çalışmamızda da DOS'da incelenen peptit yapıdaki LL-37'nin hem konsantrasyon değerleri hem de total miktarları birlikte değerlendirilmiştir.

Serum ve DOS gibi vücut sıvıları ve peridontal dokularda iltihabi ve immün mediatörlerin düzeylerine etki eden bir diğer faktör de ilaç kullanımıdır. Sistemik antibiyotik ve antienflamatuar ilaç kullanımının periodontal patojen bakteriler üzerine etkili olduğu; aynı zamanda çeşitli hücrelerden inflamasyon ve savunma cevabını etkileyebildiği, bu ilaçları kullananlarda periodontal hastalık gelişiminin etkilendiği bildirilmiştir [410, 411]. Ayrıca dışardan vitamin D takviyesi alımının da serum vitamin D3 düzeyini etkilediği bilinmektedir [276]. Bu nedenle çalışmamızda incelenecek belirteç düzeylerini etkilememesi açısından son 3 ay içinde bu tür ilaçları kullanmamış ve daha önce vitamin D takviyesi almamış bireyler çalışmaya dahil edildi.

Günümüzde spesifik ve hassas bir yöntem olan ELISA metodunun kullanımı ile mediyatörlere ve enzimlere yönelik çalışmalar daha güvenilir hale gelmiştir [412]. Tükrük veya DOS'da katelisidin LL-37 seviyelerinin incelendiği az sayıda çaılşmada da çoğunlukla ELISA yöntemi ve Western Blot biyokimyasal analiz tekniği kullanılmıştır [10, 33, 34, 413, 414]. Bu nedenle çalışmamızın laboratuvar analiz aşamasında kronik periodontitisli ve sağlıklı bireylerdeki DOS LL-37 tayini için ELISA yöntemi kullanılmıştır.

Son yıllarda epidemiyolojik araştırmalar vitamin D eksikliğinin bilinen kemik ve kalsiyum metabolizması etkilerinin dışında, peridontitis, tüberküloz, multipl skleroz (MS), tip 1 diabetus mellitus, Chron hastalığı ve kanser gelişimi gibi birçok hastalığın gelişimiyle bağlantılı olabileceği üzerinde yoğunlaşmaktadır [341, 415, 416]. Literatürde 1978 yılından bu yana vücuttaki total vitamin D, vitamin D2 ve vitamin D3 seviyelerinin ölçülebilmesi için birçok analiz tekniği denenmiştir [417]. Bu teknikler arasında vitamin D2 ve vitamin D3'ün ayrı ayrı nicel değerlendirmesini yapabilmesi, duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya ısıyla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğu, ve diğerlerine nazaran maliyetinin az olması sebebiyle Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC (High Performance Liquid Chromatography) tekniği günümüzde yaygın olarak tercih edilmektedir [418]. Bizde çalışmamızda, literatürdeki diğer araştırmalarla [419-422] benzer şekilde çalışma gruplarında serum vitamin D3 seviyelerinin belirlenmesinde HPLC analiz metodunun kullanılmasının uygun olacağını düşündük ve bu yöntemi kullandık.

Literatürde periodontal hastalık patogenezinde katelisidin LL-37 rolünü değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde Türkoğlu ve diğerleri gingivitis ve kronik peridontitis hasta gruplarında DOS'da proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-18 (IL-18) ve katelisidin LL-37 seviyelerini incelemişlerdir [10]. Araştırıcılar; katelisidin LL-37'nin antimikrobiyal ve kemotaktik aktivitelerine ilaveten IL-18 salınımı için keratinosit aktivasyonuna katılarak doğal immün cevaba destek verebildiği hipotezini desteklemektedir. 20 kronik periodontitis, 21 gingivitis ve 18 periodontal sağlıklı birey olmak üzere toplam 59 hasta üzerinde yürütülen bu araştırmada bizim çalışmamızda olduğu gibi klinik periodontal indeks ölçümleri (PI,GI,CD,KAS) alınmış ve DOS LL-37 ve IL-18 seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmanın klinik sonuçlarına göre; tüm ağız ve örnek bölgeleri PI, GI,CD ve KAS indeks skorları kronik periodontitis grubunda diğer gruplara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre tüm ağızve örnek bölgeleri PI, GI, CD, KAS değerleri sigara içen kronik periodontitis (KP-1) ve sigara içemeyen kronik periodontitis (KP-2) gruplarında gruplarının her birinde kontrol (K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Çalışmamızda Türkoğlu ve diğerlerinin sonuçlarına benzer şekilde her iki kronik periodontitis grubunda (KP-1 ve KP-2) DOS katelisidin LL-37 seviyesinin sağlıklı gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu ve DOS LL-37 seviyeleri ile örnek bölgeleri klinik peridontal parametreler (PI, CD, GI, KAS) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda Türkoğlu ve diğerlerinden farklı olarak DOS LL-37 seviyeleri ile tüm ağız klinik peridontal parametreler (PI, CD, GI, KAS) arasında da pozitif yönde güçlü korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir.

Puklo ve diğerlerinin kronik peridontitisli hastalarda western blot tekniğini kullanarak DOS katelisidin LL-37 seviyelerini inceledikleri araştırma sonuçlarında periodontal olarak sağlıklı tüm bireylerde tam uzunlukta LL-37 bulunduğunu, fakat tespit edilebilir oranlarda olgun LL-37'nin bu bireylerin yalnızca %56'sında görüldüğünü belirtmişlerdir [11]. Aynı çalışmada agresif periodontitis hastalarının %36'sında ve kronik periodontitis hastalarının %18'inde DOS'ta olgun LL-37'nin bulunmadığı görülmüştür. Araştırıcılar çalışma sonuçlarına göre periodontitis

gelişimi ile olgun forma geçen LL-37 eksikliğinin ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre bizim çalışmamızla benzer şekilde DOS LL-37 seviyeleri, sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında kronik periodontitisli bireylerde anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca Puklo ve diğerleri bizim çalışmamızdan farklı olarak agresif periodontitisli bireyleri de çalışma gruplarına dahil etmişlerdir. Araştırıcılar, kronik periodontitisli bireylerde artmış orandaki DOS LL-37 seviyesinin, periodontopatojenik bakteriler karşısında doğal immün savunma için majör bir faktör olarak nitelendirilebileceğini vurgulamışlardır [11].

Bilindiği gibi LL-37 salınımı insan dişeti epitelyal hücrelerinde gerçekleşebilmektedir. LL-37, İnflamasyon sürecinde birleşim epiteli içerisinden gingival sulkusa göç eden nötrofillerin spesifik granüllerinde yüksek miktarlarda bulunur. Birleşim epitelinde immünohistokimyasal metodlar ile tespit edilen LL-37'nin epitelyal hücrelerden ziyade, doku içerisinden migre olan nötrofillerden kaynak aldığı düşünülmektedir. İnflamatuar durumla beraber aktive olan nötrofiller periodontal bağ dokuya hCAP18 salınımı yapar. Prekürsör hCAP18, proteinaz 3 enzimi ile aktive olarak olgun LL-37 peptidine dönüşür ve peridontal dokularda birikir. Yapılan çalışmalarda DOS katelisidin LL-37 seviyelerinin periodontal açıdan sağlıklı bireylerde periodontitis hastalarına oranla daha düşük seviyede bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak sağlıklı bölgelerde dişeti oluğunda aktive olmuş nötrofil sayısının azlığı düşünülebilir [5]. Bu yorum, Dale ve diğerleri ile Hosakawa ve diğerlerinin öne sürdüğü; peridontal inflamasyonun başlangıcında dişeti epiteli ve nötrofillerden salınan katelisidin LL-37'nin; enfeksiyona cevaben aktive olmuş nötrofillerin bağ doku ve birleşim epiteli içerisinden göçleri ile periodonsiyuma ulaştığı ve LL-37'nin sağlıklı gingival bölgelere kıyasla inflamatuar lezyonlarda daha baskın olduğu görüşünü destekler niteliktedir [220, 376]. Nitekim çalışmamızda saptadığımız DOS LL-37 düzeyleri ile cep derinliği ölçümleri arasındaki pozitif yönde korelasyon, bu görüşler ile uyum göstermektedir [376].

Türkoğlu ve diğerlerinin generalize agresif periodontitis, kronik periodontitis ve periodontal olarak sağlıklı bireyler üzerinde LL-37 ve mRNA salınımını inceledikleri diğer bir araştırmalarında; kronik periodontitis hastalarından alınan dişeti dokusu örneklerinde LL-37'nin immun boyanma oranı ile mRNA salınımının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Buna karşın generalize agresif periodontitis grubunda sadece tek bir hastada LL-37 salınımının

kontrol grubuna göre artmış olduğu belirlenmiş ve agresif periodontitiste görülen lokal LL-37 eksikliğinin bu hastalıkta görülen hızlı periodontal yıkımla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [31].

Yılmaz ve diğerleri güncel bir çalışmada, tip 2 diabet olan ve olmayan generalize kronik periodontitis hastalarına ait dişeti dokularında defensinler (hBD-2 ve h BD-3) ve LL-37 varlığını immünohistokimya yöntemi ile incelemişlerdir [32]. Araştırıcılar tip 2 diabet olan ve olmayan generalize periodontitis hastalarına ait dişeti dokularında tüm epitelyal tabakalarda hCAP18/LL-37 bulunduğunu, fakat kontrol grubuna ait dişeti epitelinin yanlızca bazal tabakalarında hCAP18/LL-37 varlığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak; periodontitise bağlı olarak gelişen inflamasyon bölgelerinde antimikrobiyal peptitlerin salınımı sağlıklı dokulara oranla önemli ölçüde artmış bulunmuştur. Yılmaz ve diğerleri Tip 2 diabeti olan hastalarda tip 2 diabeti olmayan generalize periodontitis hastalarına nazaran defensin ve LL-37'nin artmış salınım gösterdiğini ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, yalnızca sistemik olarak sağlıklı kronik periodontitis hastaları çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırıcılar periodontitiste inflame dokularda antimikrobiyal peptit salınımının artışına rağmen defensin ve katelisidinlerin dişeti dokularındaki koruyucu fonksiyonlarının inflamasyona dirençte henüz yeterli olmadıkları görüşünü belirtmişlerdir [32].

Davidopoulou ve diğerlerinin kronik periodontitis, periodontal açıdan sağlıklı ve tam dişsiz olan 3 ayrı birey grubuna ait tükrük örneklerindeki serbest katelisidin LL-37 seviyesini inceledikleri çalışmalarında, kronik periodontitisli bireylerde LL-37 seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu bildirmişlerdir [414]. Araştırıcılar tam dişsiz bireylerde tükrükteki LL-37 seviyesinin çok düşük olmasının sebebini; bu bireylerde katelisidin LL-37'nin köken aldığı dişeti oluğu ve dişeti oluğu sıvısının (DOS) bulunmayışına dayandırmışlardır. Çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak DOS örnekleri değerlendirilmiş olmasına rağmen; bu çalışma ile benzer olarak DOS LL-37 seviyelerinin kronik periodontitis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda DOS hacimleri, DOS LL-37 konsantrasyon **(**ng/µl) ve DOS LL-37 total (pg) seviyeleri sigara içen ve içmeyen kronik peridontitis gruplarında

periodontal açıdan sağlıklı kontrol (K) grubuna oranla göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Yukarıda bahsedilen araştırmalar ile uyumlu olarak çalışmamızdan elde edilen veriler, kronik periodontitiste DOS LL-37 salınımının indüklendiğini, periodontal hastalık ile DOS LL-37 seviyeleri arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu göstermektedir. İlaveten bulgularımıza göre katelisidin LL-37'nin peridontal inflamasyon boyunca gelişen doğal immun yanıtta etkili olduğu söylenebilir.

Katelisidin LL-37 geniş antibakteriyel spektrumunun yanı sıra, LPS nötralizasyonu, interlökinler ve TNF-α gibi proinflamatuvar mediatörlerin salınımının baskılanması, endotokseminin önlenmesi, apoptozisin önlenmesi, kemotaksisin aktivasyonu, anjiyogenezisi destekleyerek yara iyileşmesine katkıda bulunması ve nötrofillerden antimikrobiyal peptit salınımı gibi birçok fonksiyonu ile doğal immun yanıta ve konak savunmasına katkıda bulunur [203, 231, 423-426]. Literatürde klinik periodontal durum ile ilişkilendirilmeyen bazı çalışmalarda; sigaranın, epitelyal hücrelerden AMP salınımını artırdığı [339] ve nikotinin kültüre edilmiş epitelyal hücrelerde farklılaşmayı indükleyerek dolaylı yolla AMP salınımı için bir uyaran oluşturduğu bildirilmiştir [427-429]. Sigara içeriğindeki çeşitli toksik bileşenlerin nötrofilleri ve dişeti epitel hücrelerini olumsuz yönde etkilediği, dolayısıyla antimikrobial peptit salınımını değiştirdiği, plak bakterileri varlığında gerçekleşen konak cevap düzeyini etkileyerek immun savunmayı azalttığı ve peridontopatik bakteriler tarafından üretilen toksin etkisini artırdığı bildirilmektedir [399, 430-432]. Bu nedenle çalışmamızda katelisidin LL-37 salınımını etkilediği bilinen bakteri, bakteri toksinleri, LPS ve vitamin D3 gibi faktörlerin yanında sigara kullanımının da değerlendirilmesi hedeflendi.

Son yıllarda Takeuchi ve diğerleri tarafından yapılan bir araştırmada, sigara içen kronik periodontitis hastalarında bir nikotin metaboliti olan kotinin maddesinin, tükrükteki LL-37 seviyeleri ve hastalık şiddeti üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir [433]. Araştırma sonuçlarına göre tükrük içeriğindeki kotinin seviyesi yüksek olan (≥8 ng/mL) kronik peridontitisli bireylerin istatistiksel olarak önemli oranda daha düşük LL-37 konsantrasyonuna sahip oldukları rapor edilmiştir. Araştırıcılar tükrükteki yüksek LL-37 seviyesini T.denticola varlığı ile ilişkilendirirken, tükrükteki düşük LL-37 seviyelerini tükrükteki yüksek kotinin seviyeleri ile önemli ölçüde ilişkilendirmişlerdir. İlaveten ileri derecede kronik periodontitis görülen bireylerde,

CD ≥5mm olan diş yüzdesinin tükrükteki yüksek LL-37 seviyesi ile pozitif yönde korele olduğu bildirilmiştir. Araştırıcılar tükrük LL-37 ve tükrük kotinin seviyeleri arasındaki negatif yönde korelasyon saptamışlardır. Bu sonuca göre araştırıcılar, sigara kullanımı ya da çevresel olarak sigara dumanına maruz kalmanın oral kavitede daha düşük LL-37 seviyesi ile sonuçlandığını ve periodontal hastalık riskinin arttığını öngörmüşlerdir [433]. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda LL-37 seviyeleri DOS içerisinde değerlendirilmiş olmakla birlikte sigara içen (KP-1) ve içmeyen kronik periodontitisli hastalar (KP-2) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmese de, DOS LL-37 seviyeleri kronik periodontitisli bireylerde kontrol grubuna (K) oranla anlamlı ölçüde yüksek seyretmiştir.

Literatürde DOS katelisidin LL-37 seviyesinin sigara içen ve içmeyen periodontitisli hastalarda değerlendirildiği sadece bir çalışmaya rastlanmıştır [33]. Bu çalışma Ertuğrul ve diğerlerinin sigara içen-içmeyen gingivitis ve agresif peridontitis hastalarında DOS LL-37 ve hBD-2 seviyelerini değerlendirdikleri çalışmadır [33]. Çalışmamızda sigara içen ve sigara içmeyen kronik periodontitis hasta grupları arasında klinik parametreler açısından (PI,PI(t),CD,CD(t),KAS,GI(t)) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Ertuğrul ve diğerlerinin çalışmasında ise; sigara içen-içmeyen agresif periodontits grupları arasında ve sigara içen-içmeyen gingivitis grupları arasında klinik parametreler (PI, GI, CD, KAS) açısından istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir. DOS total LL-37 ve hBD-2 seviyeleri sigara içmeyen gingivitis grubunda diğer gruplara oranla önemli ölçüde düşük seyrederken, sigara içen agresif periodontitis grubunda ise diğer gruplara oranla bu oran yüksek bulunmuştur. Sigara içen agresif peridontitis grubunda sigara içmeyen agresif periodontitis grubuna oranla; sigara içen gingivitis grubunda da sigara içmeyen gingivitis grubuna oranla daha yüksek seviyede DOS LL-37 seviyeleri bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda yer alan sigara içen kronik peridontitis (KP-1) grubunda da DOS LL-37 konsantrasyon ve total değerlerinin sigara içmeyen kronik periodontitisli (KP-2) hastalara oranla yüksek olduğu tespit edilmiş, fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İlaveten çalışmamızda DOS LL-37 seviyeleri total ve konsantrasyon değerleri ile incelenmiştir. Ertuğrul ve diğerleri ise bizim çalışmamızdan farklı olarak sadece DOS total LL-37 seviyelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda DOS hacmi

bakımından sigara içen (KP-1) ve sigara içemeyen kronik periodontitis (KP-2) grupları arasında anlamlı fark görülmemiştir. Benzer olarak Ertuğrul ve diğerleri de sigara içen-içmeyen agresif periodontitis ve sigara içen-içmeyen gingivitis grupları arasında DOS hacmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Çalışmamızda DOS LL-37 total ve konsantrasyon seviyeleri ve DOS hacminin, peridontal klinik parametreler ile pozitif yönde güçlü korelasyonlar gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer olarak Ertuğrul ve diğerleri de çalışmalarında DOS LL-37 seviyeleri ve DOS hacmi ile peridontal klinik parametreler (PI, GI, CD, KAS) arasında pozitif yönde korelasyonlar görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Literatürde vitamin D'nin kemik ve kalsiyum metabolizması ve periodontal hastalık gelişimi ile ilişkisini inceleyen ve farklı sonuçlar elde edilen çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır [297, 391, 434, 435]. UVB ışığı ile 7-dehidrokolesterolden endojen olarak deride sentezlenebilen (vitamin D3) ve diyetle alınan her iki vitamin D formu (vitamin D2-D3) karaciğerde vitamin D 25 hidroksilaz enzimi (CYP27A1) ile 25-hidroksi vitamin D3'e metabolize edilir. 25(OH)D3 vitamini vücudun tüm vitamin D havuzu hakkında en güvenilir ölçümü sağlayan dolaşımdaki esas parametre olup, biyolojik olarak inaktif formdadır ve yarılanma ömrü 15-20 gündür [436, 437]. 25-hidroksi vitamin D3 böbreklerin proksimal tübüllerinde 1-α hidroksilaz enzimi (CYP27B1) ile hidroksilize edilerek kemik metabolizması, hücre proliferasyonu inhibisyonu, hücre farklılaşması ve immün regülasyondan sorumlu aktif formdaki 1,25-dihidroksi vitamin D3'e dönüşür [438].

Deneysel olmayan birçok çalışmada, serum 25-hidroksi vitamin D3 düzeylerinin; hamilelik süresince görülen maternal periodontal hastalık ile [439], menapoz sonrası dönemde görülen periodontitis ile [440], kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) olan bireylerde görülen periodontitis ile [441], sondlamada kanama ölçümleri ile [442] ve yaş grubu ≥50 olan bireylerde ataşman kaybı ile [297] ters yönde ilişkili olabildiği belirtilmektedir. Bashutski ve diğerlerinin yaptığı deneysel çalışmanın sonuçlarına göre, serum vitamin D seviyesi yeterli olan bireylerde, vitamin D eksikliği görülen bireyler ile karşılaştırıldığında, periodontal cerrahi sonrası daha fazla klinik ataşman kazancı ve cep derinliğinde azalma görüldüğü bildirilmiştir [443]. Buna karşın 7 yıllık takip periyodu olan diğer bir deneysel çalışmada, vitamin D ve kalsiyum alımının alveoler kemik kaybı üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı bildirilmiştir [444]. Liu ve diğerleri ise, agresif

peridontitis hastalarında oral hijyen eğitimi ve faz 1 periodontal tedavi sonrası sistemik serum 25-hidroksi vitamin D3 ve IL-1β seviyelerinde azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir [299].

Yakın tarihte Antonoglou ve diğerlerinin, kronik periodontitisli bireylerde serum $25(OH)D_3$ ve $1,25(OH)_2D_3$ seviyeleri ile periodontal klinik parametreleri değerlendirdikleri araştırma sonuçlarına göre; kronik periodontitis grubundaki bireylerin daha düşük 1,25-dihidroksi vitamin D3 seviyesine sahip oldukları ve $1,25(OH)_2D3$ seviyesi ile periodontal sağlığın pozitif yönde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Öte yandan 25-hidroksi vitamin D3 seviyeleri ile kinik parametreler arasında anlamlı korelasyonlar saptanmadığı ve 25(OH)D3 ile periodontal sağlık durumunun ile ilişkilendirilemediği rapor edilmiştir [445]. Aynı çalışmada sigara kullanımı ile serum vitamin D3 metabolitleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da sigara kullanan ve kullanmayan kronik periodontitis grupları arasında vitamin D3 seviyeleri bakımından anlamlı fark tespit edilmemiştir. İlaveten bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da sigara içen (KP-1) ve içmeyen (KP-2) kronik periodontitis ve sağlıklı kontol gruplarında serum vitamin D3 (25(OH)D3) düzeyleri ile periodontal klinik parametreler (GI,PI,CD,KAS) arasında anlamlı bir korelasyon izlenmemiştir.

Liu ve diğerleri araştırmalarında agresif periodontitis, kronik periodontitis ve periodontal sağlıklı kontrol gruplarında plazma 25(OH)D3 düzeyleri ve periodontal klinik parametre ilişkilerini incelemişlerdir [300]. Araştırıcılar, plazma 25(OH)D3 düzeylerinin agresif periodontitis grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunduğunu; fakat kronik ve agresif periodontitis grupları arasnda istatistiksel olarak anlamlı fark görülmediğini tespit etmişlerdir. Buna ilaveten kronik periodontitis grubundaki bireylerin plazma 25-hidroksi vitamin D3 seviyelerinin diğer gruplardan anlamlı ölçüde farklılık göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre yalnızca agresif periodontitis grubunda 25(OH)D3 düzeylerinin kanama indeksi ile önemli ölçüde korelasyon gösterdiği, kronik periodontitis ve kontrol gruplarında ise periodontal klinik parametreler ile plazma vitamin D3 seviyeleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadığı görülmüştür. Bahsedilen çalışma sonuçları ile uyumlu olarak çalışmamızda da kronik periodontitis grupları (KP-1 ve KP-2) ile sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin

serum 25-hidroksi vitamin D3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Yine Liu ve diğerlerinin çalışma sonuçlarını destekler niteilkte, çalışma gruplarımızda serum vitamin D3 (25(OH)D3) düzeyleri ile periodontal klinik parametreler (GI,PI,CD,KAS) arasında herhangi anlamlı bir korelasyon izlenmemiştir.

Dietrich ve diğerleri, 6700 bireyin dahil edildiği serum 25-hidroksi vitamin D3 seviyeleri ile gingival inflamasyon ilişkisininin incelendiği geniş kapsamlı araştırma sonuçlarına göre; serum vitamin D3 seviyesi yüksek olan hastalarda daha az sondlamada kanama, daha düşük CD ve KAS ölçümü, daha az sayıda eksik diş ve daha düşük vücut kitle indeksi (BMI) görüldüğünü rapor etmişlerdir [298] Araştırıcılar; artmış vitamin D3 serum konsantrasyonları ile gingival inflamasyona yatkınlık arasında görülen bu ters orantılı ilişkinin vitamin D'nin anti-inflamatuar özelliklerinden kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir. Bahsedilen araştırma sonuçlarının aksine; çalışmamızda kronik periodontitis ve sağlıklı kontrol gruplarında serum vitamin D3 (25(OH)D3) düzeyleri ile periodontal klinik parametreler arasında herhangi anlamlı bir korelasyon izlenmemiştir.

İnsan katelisidin antimikrobiyal peptit geni CAMP, nötrofillerin sekonder granüllerinde depolanan ve çeşitli stimülasyonlar ile enfeksiyon veya inflamasyon varlığında proteolitik yol ile parçalanarak olgun antmikrobiyal peptit olan LL-37'yi oluşturacak, 18 kDA ağırlığındaki propeptidi (hCAP18) kodlamakla yükümlü tek gendir [141, 151, 168, 176]. CAMP geni transkripsiyon aşamasında vitamin D'nin biyoaktif formu olan $1,25(OH)_2D_3$ ve vitamin D reseptörü (VDR) tarafından düzenlenmektedir [17, 305, 307]. Yapılan bazı in vitro çalışmalarda, vitamin D3 ($1,25(OH)_2D_3$) takviyesini takiben makrofajlar ve nötrofiller gibi immün hücreler ile diğer epitelyal bariyer hücrelerde CAMP geni salınımının indüklendiği ve katelisidin seviyesinin arttığı rapor edilmiştir [14, 17, 305, 307, 446, 447]. Ayrıca topikal ve oral vitamin D analoglarının atopik dermatitis gibi hastalıklarda benzer şekilde kutanöz katelisidin üretimini stimüle ettiği ve bu oranın %600'e kadar yükselebildiği bildirilmiştir [448]. Katelisidin LL-37 geninin (CAMP) biyolojik olarak aktif formdaki $1,25(OH)_2D_3$ tarafından direkt olarak indüklendiği kanıtlanmış olmakla birlikte, aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi immün hücrelerden hCAP18/LL-37 salınımı için dolaşımda yeterli miktarda 25-hidroksi vitamin D3 formunun bulunması gerekmektedir [17, 39, 449]. İlginç olarak, 25(OH)D3 oluşumunu

sağlayan hidroksilasyon basamağında görev alan 25 hidroksilaz enzim varlığı ve dolayısıyla 25(OH)D3 aktivitesinin insan dişeti fibroblastalarında ve periodontal ligament hücrelerinde tespit edildiği rapor edilmiştir [450]. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda bireylerin serum vitamin D3 seviyeleri ile DOS LL-37 seviyelerinin ilişkisini değerlendirilebilmek amacıyla katelisidin LL-37 üretimini uyaran 1,25 dihidroksi vitamin D3'ün aktif hale gelmesi için prekürsör olarak görülen 25-hidroksi vitamin D3 seviyelerinin değerlendirilmesinin daha anlamlı olduğunu düşündük. Bu bağlamda literatürde serum 25-hidroksi vitamin D3 ve serum LL-37 seviyelerini değerlendiren çok az sayıda çalışma bulunmakla birlikte; serum vitamin D3 ve DOS LL-37 seviyelerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Konuyla ilgili olarak diş hekimliği yanında, genel tıp literatüründe de çalışmalar mevcuttur. Gombart ve diğerleri, serum hCAP18 seviyesi düşük olan hemodiyaliz hastalarının enfeksiyöz hastalıklardan ölüm riskinin 2 kat daha fazla olduğunu bildirdikleri araştırmalarında serum 25-hidroksi vitamin D3 ve serum katelisidin düzeyleri arasında korelasyona rastlamamışlardır [451]. Adams ve diğerleri de belirgin kemik hastalığı olan bireylerde 25-hidroksi vitamin D3 ve serum katelisidin düzeyleri arasında anlamlı korelasyon bulunmadığını belirtmişlerdir [315]. Öte yandan Jeng ve diğerleri; yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar üzerinde yaptıkları araştırma sonuçlarına göre bu bireylerin sağlıklı insanlara oranla çok daha düşük seviyede serum 25(OH)D3 seviyesi ve LL-37 oranına sahip olduklarını, aynı zamanda vitamin D düzeyi ile LL-37 arasında pozitif yönde korelasyon görüldüğünü belirtmişlerdir [313].

Bhan ve diğerleri ergokalsiferol takviyesi yaptıkları sistemik olarak sağlıklı 60 bireyin dahil edildiği araştırmalarında serum 25(OH)D3 seviyeleri ile serum katelisidin LL-37 seviyeleri arasında hem başlangıç değerlerinde hem de vitamin D takviyesi yapıldıktan sonra pozitif yönde korelasyonlar görüldüğünü fakat bu anlamlı korelasyonun yalnızca 25(OH)D düzeyinin ≤ 32ng/ml olduğunda tespit edildiğini rapor etmişlerdir [452]. Benzer şekilde Dixon ve diğerleri de sistemik olarak sağlıklı 19 yetişkin bireyde serum vitamin D3 ve plazma hCAP18 seviyelerini incelemişlerdir. Araştırıcılar sadece 25(OH)D seviyesi ≤ 32ng/ml olan bireylerde vitamin D3 ve plazma hCAP18 parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görüldüğünü; fakat serum 25(OH)D seviyesinin 32ng/ml' den

fazla olduğu bireylerde bu korelasyonun görülmediğini belirterek vitamin D3'ün sistemik LL-37 seviyesini düzenleyebildiği sonucuna varmışlardır [39]. İlginç olarak bizim çalışmamıza katılan bireylerin serum 25(OH)D3 seviyeleri incelendiğinde, tüm bireylerde bu oranın 32ng/ml'dan düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber çalışmamızda grupların katelisidin LL-37 seviyeleri DOS içerisinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kronik periodontitis ve sağlıklı kontrol gruplarının her birinde serum 25(OH)D3 seviyesi yukarıda bahsedilen araştırmalarda referans alındığı şekli ile 32ng/ml'dan düşük olmakla birlikte, belirtilen sonuçlar ile benzer olarak sigara içen kronik periodontitis (KP-1) grubunda serum 25-hidroksi vitamin D3 ve DOS katelisidin LL-37 seviyeleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar izlenmiştir.

Oral kavitede epitel örtü, doku bütünlüğünü bozmaya çalışan mikroorganizmalara ve kan akımını yavaşlatan sigara gibi zararlı faktörlere karşı koruyucu bariyer görevi görmektedir. Periodontal hastalıklarda inflamasyonun başlaması ve bakteri invazyonu ile beraber dişeti epitel hücrelerinden ve nötrofillerden AMP salınımı uyarılmaktadır. Bakteri ve bakteri toksinleri ile karşılaşıldığında dokunun savunma cevabı ile indüklenen LL-37'nin salınımı sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerden etkilenebilir[33]. Sigara kullanımı epitelyal yüzeylerde var olan nikotinik reseptötleri aktive ederek epitelyal hücre farklılaşmasını tetikleyebilir [427]. Bu aktivasyonun LL-37 salınımını da artırdığı düşünülmektedir. Sigara kullanımı aynı zamanda kapiller dokuları etkileyebilir ve lökosit kemotaksisini azaltabilir. Sigara kullanan bireylerde kolonize olan mikroorganizma sayısının artmış olması da LL-37 salınımını artırabilmektedir [339]. Çalışmamızda sigara içen kronik periodontitis grubunda DOS LL-37 seviyesi sigara içmeyen kronik periodontitis grubundan yüksek olmasına karşın, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi aktif formdaki vitamin D3 (1,25-dihidroksi vitaminD3), katelisidin LL-37 salınımını düzenlemektedir ve bunun sağlanması için dolaşımda belli oranda 25-hidroksi vitamin D3 bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda gruplar arasında serum vitamin D3 (25(OH)D3) düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir. Sigara içen kronik periodontitis grubunda (KP-1) serum vitamin D3 seviyesi ile DOS LL-37 seviyesi arasında pozitif yönde korelasyon varlığı tespit edilmiştir. Bu anlamlı korelasyonun sadece sigara içen

kronik periodontitis grubunda (KP-1) görülme nedeninin, sigaranın etkisine bağlı artan DOS LL-37 seviyesi olabileceğini düşünmekteyiz.

Antimikrobiyal peptitler geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri ve immün sistemdeki modülatör görevleri ve potansiyel olarak daha düşük oranda direnç geliştirebilme özellikleri sayesinde günümüzde sistemik antibiyotik kullanımına karşı ilaç gelişitirilmesinde alternatif olarak görülmektedirler [205]. Bu amaçla bazı antimikrobiyal peptit veya sentetik yan ürünleri üzerinde klinik çalışmalar yapılmaktadır [453, 454]. Katyonik AMP ailesine mensup olan tek insan katelisidini LL-37'nin immün sistemdeki anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve immünmoülatör etkilerinin kapsamlı çalışmalar ile daha iyi anlaşılması ile periodontitis, psoarizis, rosea, atopik dermatit, kanser, tüberküloz, sepsis, enfeksiyöz hastalıklar, kolit, kronik ağrı, aterosklerozis ve sistemik lupus eritamatozus (SLE) gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde alternatif terapötik yöntemlere zemin hazırlanabilir [18]

Antimikrobiyal peptit tedavisine alternatif olarak endojen antimikrobiyal peptit salınımının stimüle edilmesini sağlayacak yöntemlerin de enfeksiyonlara karşı savunmada etkili olabileceği düşünülmektedir [18]. Örneğin; bağırsakta LL-37 ve defensin-1 seviyelerinin azalmış olduğu belirlenmiş olan insan şigellöz enfeksiyonunda; sodyum butirat tedavisi ile bu antimikrobiyal peptitlerin salınımının indüklenebileceği düşüncesiyle yapılan hayvan çalışmalarında CAP18 salınımının indüklendiği ve bakteri oranının azalmasıyla beraber klinik olarak hastalığın gerilediği bildirilmektedir [455]. Bu anlamda bir diğer önemli ve güncel örnek Niel Finsen tarafından keşfedilen ışık terapisidir. Vitamin D3'ün katelisidin LL-37 salınımını indüklemesi; ışık terapisi, vitamin D ve LL-37 arasındaki ilişkinin temelini oluşturmakta ve enfeksiyonların tedavisinde tamamen farklı bir yol açmaktadır [456]. Diğer çalışmalarda, enfeksiyöz hastalıklarda geleneksel antibiyotik kullanımı yerine ışık terapisi veya vitamin D'nin kullanılabileceği öne sürülmüştür [17, 307] Yaygın görülen otoimmün bir deri hastalığı olan psöarizis tedavisinde dar bantlı UVB ışığı kullanılarak hastaların serum 25-hidroksi vitamin D3 seviyeleri artırılmış ve yöntemin bu hastalıkta alternatif bir tedavi olabileceği öne sürülmüştür [457]. Benzer yaklaşımlar düşünülerek oral dokularda, tükrük ve DOS'da antimikrobiyal peptit LL-37 salınımının artırılması mümkün olabilir [3].

Son yıllarda antimikrobik etkili katyonik peptitler ile yapılan gerek hayvan modeli çalışmaları, gerekse insanlar üzerinde yapılan faz II, faz III klinik çalışmalarında alınan olumlu sonuçlar ile; antibiyotiklere dirençli birçok mikroorganizmaya karşı etkili olan AMP'lerin enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde gelecekte yeni bir antibiyotik grubu olarak görev yapabileceği düşünülmektedir. Ancak bu maddelerin ilaç olarak klinik kullanıma girebilmeleri için antimikrobik aktivitelerinin, farmokokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. İlaveten stabilite ve toksisite gibi gelişebilecek problemlerin giderilmesi için daha fazla sayıda in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [18, 136, 196, 458].

Literatürde kronik periodontitis hastalarında sigara kullanımının, DOS katelisidin LL-37 seviyeleri ile serum vitamin D3 seviyelerinin birbirleri ve klinik peridontal parametreler arasındaki olası ilişkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Vitamin D ve katelisidin LL-37'nin periodontal inflamasyondaki antimikrobiyal ve immünmodülatör etkileri nedeniyle periodontal hastalıklardaki rollerinin daha iyi anlaşılması, periodontitis gelişimini önlemede ve periodontal tedavi seçenekleri içinde bizlere yeni bakış açıları kazandırabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda sigara içen (KP-1) ve içmeyen kronik periodontitisli (KP-2) hastalarda ve peridontal sağlıklı (K) bireylerde DOS katelsidin LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin değerlendirilmesi ve periodontal klinik parametreler ile biyokimyasal veriler arasındaki olası korelasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen verilere göre;

1- Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre tüm ağız PI(t), GI(t), CD(t), ve KAS(t) değerleri KP-1 ve KP-2 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Tüm bu parametreler açısından KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında; plak indeksi (PIt), gingival indeks (GIt) değerleri KP-1 grubunda KP-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$).

2- Cep derinliği (CDt) skorları yine KP-1 grubunda KP-2 grubuna oranla daha yüksek tespit edildi bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Klinik ataşman seviyesi (KASt) ölçümlerinin ise KP-2 grubunda KP-1 grubundaki bireylere oranla daha yüksek olduğu kaydedilirken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.343$)

3- Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre örnek bölgesi PI, GI, CD, KAS değerleri KP-1 ve KP-2 gruplarının herbirinde kontrol (K) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Tüm bu parametreler açısından KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında; PI, CD, KAS değerleri KP-1 grubunda KP-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.001$,$p<0,05$). Örnek bölgesi GI değerleri ise KP-2 grubunda KP-1 grubuna göre daha yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.301$).

4- Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; DOS hacimleri KP-1 ve KP-2 yani kronik peridontitis gruplarında kontrol (K) grubuna oranla göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$).

5- Kronik periodontitis grupları arasında ise KP-2 grubunda DOS hacmi KP-1'e oranla yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.465$).

6- Çalışma gruplarının DOS katelisidin LL-37 konsantrasyon değerleri incelendiğinde; KP-1 ve KP-2 gruplarının DOS LL-37 konsantrasyon değerleri K grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p<0.001$) KP-1 ve KP-2 grupları karşılaştırıldığında KP-1 grubunda DOS LL-37 konsantrasyon seviyesinin KP-2 grubuna göre daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,339$)

7- Çalışma gruplarının DOS katelisidin LL-37 total değerleri incelendiğinde; KP-1 ve KP-2 gruplarının DOS LL-37 total değerleri K grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunurken ($p<0,001$), KP-1 ve KP-2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,828$).

8- Yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre sigara içmeyen kronik periodontitis grubu (KP-2) serum vitamin D3 seviyeleri; sigara içen kronik periodontitis grubuna (KP-1) oranla daha yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,571$). Yine KP-1 ve kontrol ($p=0,674$); ve KP-2 ve kontrol grupları ($p=0,884$) arasında da serum vitamin D3 seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

9- Örnek bölgelerine ait klinik parametre ortalamaları kendi içinde değerlendirildiğinde; PI ile GI ($r=0,784$), CD ($r=0,864$) ve KAS ($r=0,876$) arasında, GI ile CD ($r=0,905$) ve KAS ($r=0,906$) arasında ve CD ile KAS ($r=0,985$) arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon bulunmuştur ($p<0,01$).

10- Tüm ağıza ait klinik parametre ortalamaları kendi içinde değerlendirildiğinde; PI ile GI ($r=0,852$), CD ($r=0,814$) ve KAS ($r=0,768$) arasında, GI ile CD ($r=0,873$) ve KAS ($r=0,825$) arasında ve CD ile KAS ($r=0,911$) arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon saptanmıştır ($p<0,01$).

11- Pearson korelasyon analiz testine göre laboratuvar bulgularının klinik parametreler ile korelasyon verileri incelendiğinde; DOS hacmi ile PI ($r=0,771$) ve PI t ($r=0,696$); GI ($r=0,847$) ve GI t ($r=0,779$); CD ($r=0,878$) ve CD t ($r=0,883$); KAS ($r=0,879$) ve KAS t ($r=0,844$) arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar olduğu görülmüştür. ($p<0,01$)

12- DOS LL-37 konsantrasyon değerleri ile PI (r=0,604) ve PI t (r=0,666); GI (r=0,767) ve GI t (r=0,705); CD (r=0,756) ve CD t (r=0,752); KAS (r=0,743) ve KAS t (r=0,753) arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar bulunmuştur. (p<0,01)

13- DOS LL-37 total değerleri ile PI (r=0,598) ve PI t (r=0,612); GI (r=0,753) ve GI t (r=0,664); CD (r=0,751) ve CD t (r=0,760); KAS (r=0,739) ve KAS t (r=0,736) arasında pozitif yönde güçlü korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir. (p<0,01)

14- DOS hacmi ile DOS LL-37 konsantrasyonu (r=0,771) ve DOS LL-37 total miktarları (r=0,842) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (p<0,01).

15- Çalışmamızda DOS ve serumda düzeyleri değerlendirilen parametrelerle ilgili olarak yapılan korelasyon analizi sonuçlarına göre; KP-1 grubunda DOS katelisidin LL-37 konsantrasyonu ile serum vitamin D3 seviyeleri (r=0,510); ve DOS LL-37 total miktarları ve serum vitamin D3 seviyeleri (r=0,506) arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Çalışmamızda katyonik antimikrobiyal peptit katelisidin LL-37'nin, kronik periodontitis hastalarında periodontal açıdan sağlıklı bireylere oranla DOS'da daha yüksek oranlarda bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre dişeti epitelyal ve nötrofil hücrelerinden salınan LL-37'nin güçlü antimikrobiyal etkisi ile periodontitiste bakteriyel invazyona karşı geliştirilen savunma cevabında etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

Sigara kullanımının konağın, savunma cevabini baskılayarak periodontopatojenleri elimine etme yeteneğini azaltabildiği ve periodontal dokulardaki mikroorganizma sayısının artışına neden olabileceği bilinmektedir. Bu durum ayni zamanda periodonsiyumda LL-37 gibi AMP'lerin salınımı uyarabilir.

Vitamin D, kemik ve kalsiyum metabolizmasi üzerindeki bilinen etkileri dışında, katelisidin LL-37 salınımını uyarabilme gibi immunomodulator özellikler sergileyerek periodontal sağlığın idamesine katkıda bulunabilir. Bu bilgiler dahilinde ilerde yapılması9 planlanan çalışmaların periodontal

hastalıklarda konak savunmasını artırmaya yönelik olarak LL-37'nin düzenlenmesi ve uyarılmasi üzerine odaklanılmasi gerektiğini düşünmekteyiz.

Nötrofil defektleri ile ilişkili periodontal hastalık alt yapısı göz önüne alınarak gelecekte AMP'ler ile ilişkili yapılmasi planlanan calışmalarin genetik ve moleküler mekanizmaları içermesi gerektiği düşünülmektedir.

AMP'lerin ve vitamin D'nin antimikrobiyal etkileri ve immün sistemdeki modülatör özelliklerinin, periodontal tedavi açısından değerlendirilerek yeni ilaç kullanım yaklaşımları oluşturmak için araştırılmasının gerekli olduğunu düşünüyoruz. Konuyla ilgili farklı periodontal hastalıklarda geniş kapsamlı in vitro ve/veya klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu inancındayız.

Literatür incelendiğinde sigara içen ve içmeyen kronik periodontitis hastalarında DOS katelisidin LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin değerlendirildiği bir calışmaya rastlanmamıştır. Farklı periodontal hastalık gruplarında sigara, katelisidin LL-37 ve vitamin D3 seviyelerinin değerlendirilmesi ile yapılacak olan calışmalar bu faktörlerin periodontal hastalık patogenezindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

1. Garcia, R.I., M.M. Henshaw, and Krall, E.A. (2001). Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000*,. 25, 21-36.

2. Van Dyke, T.E.(2007). Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol 2000,* 45, 158-66.

3. Gorr, S.U. (2009). Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 200051*, 152-80.

4. Gorr, S.U. and M. Abdolhosseini.(2011). Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol 38 Suppl* 11, 126-41.

5. Dale, B.A. and Fredericks, L.P. (2005). Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol,.* 7(2), 119-33.

6. Travis, S.M., P.K. Singh, and Welsh, M.J. (2001). Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr Opin Immunol.* 13(1), 89-95.

7. Kamysz, W., M. Okroj, and Lukasiak, J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides*. Acta Biochim Pol,* 50(2), 461-9.

8. Agerberth, B. (2000).The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood.* 96(9), 3086-93.

9. Wong, J.H., X.J. Ye, and T.B. Ng.(2013). Cathelicidins: peptides with antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, angiogenic, anticancer and procancer activities. *Curr Protein Pept Sci* 14(6), 504-14.

10. Türkoglu, O., Emingil, G., Kütükçüler, N. and Atilla, G. (2009). Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, *80*(6), 969-976.

11. Puklo, M., Guentsch, A., Hiemstra, P. S., Eick, S., & Potempa, J. (2008). Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, *23*(4), 328-335.

12. Zanetti, M.(2005).*T*he role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol,* 7(2), 179-96.

13. Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., and Willnow, T. E. (1999). An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D 3. *Cell*, *96*(4), 507-515.

14. Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., and Modlin, R. L. (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, *311*(5768), 1770-1773.

15. Zhang, C., Zhao, L., Ma, L., Lv, C., Ding, Y., Xia, T., and Dou, X. (2012). Vitamin D status and expression of vitamin D receptor and LL-37 in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Digestive diseases and sciences*, 57(1), 182-188.

16. Miller, J. R.L. Gallo.(2010).Vitamin D and innate immunity. *Dermatol Ther* 23(1), 13-22.

17. Wang, T. T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang, Q., Liao, J., and White, J. H. (2004). Cutting edge: 1, 25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Immunology*, 173(5), 2909-2912.

18. Wang, G. (2014).Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 7(5), 545-94.

19. Nociti, F.H., Jr., M.Z. Casati, and P.M. Duarte.(2015).*C*urrent perspective of the impact of smoking on the progression and treatment of periodontitis. *Periodontol 2000* 67(1), 187-210.

20. Kropff, B., Petersilka, G., Flemmig, T., Ehmke, B., Heuft, G. and Schneider, G. (2015). (2015).Success of a smoking cessation programme in smoking behaviour of chronic periodontitis patients and identification of predictors of motivation for smoking cessation - a pilot study. *Int Journal Dent Hyg*

21. Fiorini, T.(2015). Smoking cessation may promote additional benefits to non-surgical periodontal therapy in adults with chronic periodontitis. *Journal Evid Based Dent Pract* 15(2), 83-4.

22. Van Dyke, T.E., D. Sheilesh. (2005).*Risk factors for periodontitis.* J Int Acad Periodontol 7(1), 3-7.

23. Bergstrom, J.(1989). *Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease.* Community Dent Oral Epidemiol 17(5), 245-7.

24. Amarasena, N., Ekanayaka, A. N., Herath, L.,and Miyazaki, H. (2002). Tobacco use and oral hygiene as risk indicators for periodontitis. *Community dentistry and oral epidemiology*, *30*(2), 115-123.

25. Leung, T. F., Ching, K. W., Kong, A. P. S., Wong, G. W. K., Chan, J. C. N. and Hon, K. L. (2012). Circulating LL-37 is a biomarker for eczema severity in children. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(4), 518-522.

26. Weber, G., Chamorro, C. I., Granath, F., Liljegren, A., Zreika, S., Saidak, Z., and Stahle, M. (2009). Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res*, *11*(1), R6.

27. Cheng, W. L., Wang, C. S., Huang, Y. H., Liang, Y., Lin, P. Y., Hsueh, C. and Lin, K. H. (2008). Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 123(8), 1787-1796.

28. Emson, C. L., Fitzmaurice, S., Lindwall, G., Li, K. W., Hellerstein, M. K., Maibach, H. I., and Turner, S. M. (2013). A pilot study demonstrating a non-invasive method for the measurement of protein turnover in skin disorders: application to psoriasis. *Clin Transl Medicine*, *2*(1), 12.

29. Aryana, K., (2012). (99m)Tc-labeled ubiquicidin scintigraphy: A promising method in hip prosthesis infection diagnosis. *Nuklearmedizin,* 51(4), 133-9.

30. Türkoğlu, O., Berdeli, A., Emingil, G. and Atilla, G. (2011). A novel p. S34N mutation of CAMP gene in patients with periodontal disease. *archives of oral biology*, 56(6), 573-579.

31. Türkoğlu, O., Kandiloğlu, G., Berdeli, A., Emingil, G. and Atilla, G. (2011). Antimicrobial peptide hCAP-18/LL-37 protein and mRNA expressions in different periodontal diseases. *Oral Diseases*, 17(1), 60-67.

32. Yilmaz, D. (2015).*Overexpressions of hBD-2, hBD-3, and hCAP18/LL-37 in Gingiva of Diabetics with Periodontitis.* Immunobiology.

33. Ertugrul, A. S., Sahin, H., Dikilitas, A., Alpaslan, N. Z., Bozoğlan, A. and Tekin, Y. (2014). Gingival crevicular fluid levels of human beta-defensin-2 and cathelicidin in smoker and non-smoker patients: a cross-sectional study.*Journal of Periodontal Research*, *49*(3), 282-289.

34. Eick, S., Puklo, M., Adamowicz, K., Kantyka, T., Hiemstra, P., Stennicke, H., ... & Potempa, J. (2014). Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefèvre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis.*Orphanet Journal Rare Dis*, *9*, 148.

35. Mily, A., Rekha, R. S., Kamal, S. M., Akhtar, E., Sarker, P., Rahim, Z. and Raqib, R. (2013). Oral intake of phenylbutyrate with or without vitamin D3 upregulates the cathelicidin LL-37 in human macrophages: a dose finding study for treatment of tuberculosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 13(1), 23.

36. Wang, Q., Zhang, W., Li, H., Aprecio, R., Wu, W., Lin, Y. and Li, Y. (2013). Effects of 25-hydroxyvitamin D 3 on cathelicidin production and antibacterial function of human oral keratinocytes. *Cellular Immunology*, *283*(1), 45-50.

37. Wang, Q., Zhang, W., Li, H., Aprecio, R., Wu, W., Lin, Y. and Li, Y. (2013). Effects of 25-hydroxyvitamin D 3 on cathelicidin production and antibacterial function of human oral keratinocytes. *Cellular Immunology*, 283(1), 45-50.

38. Guo, C., Sinnott, B., Niu, B., Lowry, M. B., Fantacone, M. L. and Gombart, A. F. (2014). Synergistic induction of human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression by vitamin D and stilbenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(3), 528-536.

39. Dixon, B. M., Barker, T., McKinnon, T., Cuomo, J., Frei, B., Borregaard, N. and Gombart, A. F. (2012). Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC Research Notes*, 5(1), 575.

40. Dai, X., Sayama, K., Tohyama, M., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Tokumaru, S. and Hashimoto, K. (2010). PPARγ mediates innate immunity by regulating the 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, 60(3), 179-186.

41. Brown, L.J., H. Loe.(1993).Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000,*2, 57-71.

42. Freedman, H. L., Listgarten, M. A. and Taichman, N. S. (1968). Electron microscopic features of chronically inflamed human gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 3(4), 313-327.

43. Hasan, A., Palmer, R. M. (2014). A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease. *British Dental Journal*, 216(8), 457-461.

44. Smith, M., G.J. Seymour, and M.P. Cullinan.(2010).Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000,* 53, 45-54.

45. Page, R.C., K.S. Kornman. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000,* 14, 9-11.

46. Williams, R.C.(1990). Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine,* 322(6), 373-82.

47. Goodson, J. M., Tanner, A. C. R., Haffajee, A. D., Sornberger, G. C. and Socransky, S. S. (1982). Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(6), 472-481.

48. Amano, A.(2010). Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontol 2000*, 54(1), 9-14.

49. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. and Goodson, J. M. (1983). Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *Journal of Clinical Periodontology*, *10*(3), 257-265.

50. Page, R. C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, *26*(3), 230-242.

51. Socransky, S.S., Haffajee, A.D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts*. Journal Periodontol,* 63(4 Suppl), 322-31.

52. Socransky, S.S., C. Smith, and Haffajee, A.D. (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal Clin Periodontol,* 29(3), 260-8.

53. Armitage, G.C.(1999).Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol,* 4(1), 1-6.

54. Löe, H., Theilade, E. and Jensen, S. B. (1965). Experimental gingivitis in man.*Journal of Periodontology*, 36(3), 177-187..

55. Mariotti, A.(1999).*Dental plaque-induced gingival diseases. Ann Periodontol* 4(1), 7-19.

56. Kinane, D.F., G.J. Marshall.(2001). Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent Journal,* 46(1), 2-12.

57. Aldred, M.J., P.M. Bartold.(1998).Genetic disorders of the gingivae and periodontium. *Periodontol 2000,* 18, 7-20.

58. Bhat, M. (1991).Periodontal health of 14-17-year-old US schoolchildren. *Journal Public Health Dent* 51(1), 5-11.

59. Ababneh, K. T., Hwaij, Z. M. A. and Khader, Y. S. (2012). Prevalence and risk indicators of gingivitis and periodontitis in a Multi-Centre study in North Jordan: a cross sectional study. *BMC Oral Health*, *12*(1), 1.

60. Aimetti, M., Perotto, S., Castiglione, A., Mariani, G. M., Ferrarotti, F. and Romano, F. (2015). Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *Journal Clin Periodontol.*

61. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson.(2005). Periodontal diseases. *Lancet* 366(9499), 1809-20.

62. Summers, A. (2009).*Gingivitis: diagnosis and treatment.* Emerg Nurse 17(1), 18-20; quiz 35.

63. Tatakis, D.N. and L. Trombelli.(2004).*Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. Journal Clin Periodontol, 3*1(4), 229-38.

64. Trombelli, L., Farina, R., Manfrini, R. and Tatakis, D. N. (2004). Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effect of incisor crown form.*Journal of dental research*, 83(9), 728-731.

65. Page, R.C., H.E. Schroeder. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34(3), 235-49.

66. Seymour, G. J., Powell, R. N., Cole, K. L., Aitken, J. F., Brooks, D., Beckman, I. and Burns, G. F. (1983). Experimental gingivitis in humans. *Journal of periodontal research*, 18(4), 375-385.

67. Lindhe, J., Hamp, S. E. and Löe, H. (1973). Experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of Periodontal Research*, 8(1), 1-10.

68. Lindhe, J., Hamp, S. E. and Löe, H. (1973). Experimental periodontitis in the beagle dog. *Journal of Periodontal Research*, *8*(1), 1-10.

69. Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H. and Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80.

70. Llndhe, J., Schroeder, H. E., Page, R. C., Münzel-Pedrazzoli, S. and Hugoson, A. (1974). Clinical and stereologic analysis of the course of early gingivitis in dogs. *Journal of periodontal research*, *9*(5), 314-330.

71. Flieder, D.E., C.N. Sun, and B.C. Schneider. (1966). Chemistry of normal and inflamed human gingival tissues. *Periodontics* 4(6), 302-7.

72. Schroeder, H.E., S. Munzel-Pedrazzoli, and R. Page.(1973).Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol,* 18(7), 899-923.

73. Hock, J., Nuki, K. (1971). A vital microscopy morphology of study of normal the and inflamed gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 6(2), 81-88.

74. Kindlová, M. (1965). Changes in the vascular bed of the marginal periodontium in periodontitis. *Journal of Dental Research*, 44(2), 456-456.

75. Amato, R. (1986). Interproximal gingival inflammation related to the conversion of a bleeding to a nonbleeding state. *Journal Periodontol,* 57(2), 63-8.

76. Seymour, G.J., R.N. Powell, and J.F. Aitken.(1983). Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *Journal Periodontol,* 54(9), 522-8.

77. Garant, P.R., Mulvihill, J.E. (1971).The ultrastructure of clinically normal sulcular tissues in the beagle dog. *Journal Periodontal Res,* 6(4), 252-65.

78. Page, R.C., D.M. Simpson, and W.F. Ammons.(1975). Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease IV. The periodontal and dental status of a group of aged great apes. *Journal Periodontol,* 46(3), 144-55.

79. Albandar, J. M., Brunelle, J. A. and Kingman, A. (1999). Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994.*Journal of Periodontology*, 70(1), 13-29.

80. Seymour, G. J., Greenspan, J. S. (1979). The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 14(1), 39-46.

81. Seymour, G. J., Powell, R. N. and Davies, W. I. R. (1979). Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *Journal of Clinical Periodontology*, 6(5), 267-277.

82. Schwartz, Z. V. I., Goultschin, J., Dean, D. D. and Boyan, B. D. (1997). Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, 14(1), 158-172.

83. Kinane, D.F.(2001). *Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000,* 25, 8-20.

84. Deas, D.E. and B.L. Mealey.(2010). *Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. Periodontol 2000,* 53, 154-66.

85. Singh, A. (2012). *Prevalence of chronic periodontitis in Meerut: A cross-sectional survey. Journal Indian Soc Periodontol,* 16(4), 529-32.

86. Susin, C., Haas, A. N., Valle, P. M., Oppermann, R. V. and Albandar, J. M. (2011). Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(4), 326-333.

87. Oppermann, R. V., Haas, A. N., Rösing, C. K. and Susin, C. (2015). Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America.*Periodontology 2000*, 67(1), 13-33.

88. Papapanou, P. N. (1999). Epidemiology of periodontal diseases: an update. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 1(4), 110-116.

89. Albandar, J.M. (2002). Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000,* 29, 31-69.

90. Newman, M. (2000). Genotype and clinical management of periodontitis.*Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)*, 22(2 Spec No), 12-16.

91. Botero, J. E., Rösing, C. K., Duque, A., Jaramillo, A. and Contreras, A. (2015). Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontology 2000*, 67(1), 34-57.

92. Zappler, S. E. (1948). Periodontal disease in children. *The Journal of the American Dental Association*, 37(3), 333-345.

93. Flemmig, T.F. (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol,* 4(1), 32-8.

94. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease.*Australian Dental Journal*, 54(s1), S11-S26.

95. Hirschmann, P. N. (1987). Radiographic interpretation of chronic periodontitis.*International Dental Journal*, 37(1), 3-9.

96. Desai, S. R., Shinde, H. H. (2012). Correlation of interdental and interradicular bone loss in patients with chronic periodontitis: A clinical and radiographic study. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 15(2), 125-131.

97. Armitage, G. C., Cullinan, M. P. (2010). Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 12-27.

98. Kirst, M.E. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Appl Environ Microbiol* 81(2), 783-93.

99. Contreras, A. (2015). *Periodontal microbiology in Latin America. Periodontol 2000,* 67(1), 58-86.

100. Gibbons, R. J., Socransky, S. S., Sawyer, S., Kapsimalis, B. and Macdonald, J. B. (1963). The microbiota of the gingival crevice area of man—II: The predominant cultivable organisms. *Archives of Oral Biology*, 8(3), 281-289.

101. Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N. and Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90(10), 1164-1170.

102. Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Review of Infectious Diseases*, *10*(Supplement 2), S274-S276.

103. Singer, R.E., B.A. Buckner.(1981). Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun,* 32(2), 458-63.

104. Kinane, D.F., J. Mooney, and J.L. Ebersole. (1999). Humoral immune response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease. *Periodontol 2000,* 20, 289-340.

105. Van Steenbergern, T. J. M., Van der Mispel, L. M. S. and De Graaff, J. (1986). Effects of ammonia and volatile fatty acids produced by oral bacteria on tissue culture cells. *Journal of Dental Research*, 65(6), 909-912.

106. Jin, L.(2011).An update on innate defense molecules of human gingiva. *Periodontol 2000,* 56(1), 125-42.

107. Roberts, F.A., G.J. Richardson, and S.M. Michalek.(1997).Effects of Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. *Infect Immun,* 65(8), 3248-54.

108. Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T. and Kato, I. (1997). Secretion of IL-1β, TNF-α, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontal Research*, 32(3), 279-286.

109. Ahmed, R., Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, 272(5258), 54-60.

110. Dennison, D. K., DYKE, T. E. (1997). The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 14(1), 54-78.

111. Kinane, D.F. (2001). Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontol 2000,* 26, 54-91.

112. Mosmann, T. R., Schumacher, J. H., Street, N. F., Budd, R., O'garra, A., Fong, T. A. T. and Fiorentino, D. F. (1991). Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunological Reviews*, 123(1), 209-229.

113. Walsh, L. J. (2003). Mast cells and oral inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(3), 188-198.

114. Abe, D., Kubota, T., Morozumi, T., Shimizu, T., Nakasone, N., Itagaki, M. and Yoshie, H. (2011). Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. *Journal of Periodontal Research*, 46(3), 345-353.

115. Smalley, J. W. (1994). Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Advances in Dental Research*, 8(2), 320-328.

116. Schenkein, H.A.(2006). Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000,* 40, 77-93.

117. Azuma, M. (2006). Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of Periodontal Research*, 41(5), 361-373.

118. Uitto, V.J. (2003). Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontol 2000,* 31, 9-11.

119. Lamster, I.B., L.J. Hartley, and Vogel, R.I. (1985). Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *Journal Periodontol,* 56(11 Suppl), 13-21.

120. Gorr, S.U. (2012). Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. *Front Oral Biol,* 15, 84-98.

121. Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, *1*(3), 141.

122. Weinberg, A., Krisanaprakornkit, S. and Dale, B. A. (1998). Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(4), 399-414.

123. Zasloff, M.(2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature,* 415(6870), 389-95.

124. Hancock, R.E. and H.G. Sahl.(2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol,* 24(12), 1551-7.

125. Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *The Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 9-13.

126. Wang, G., Li, X., Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*,*37*(suppl 1), D933-D937.

127. Wang, Z., Wang, G. (2004). APD: the antimicrobial peptide database.*Nucleic Acids Research*, *32*(suppl 1), D590-D592.

128. Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3), 197-215.

129. Lai, Y. and R.L. Gallo .(2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30(3), 131-41.

130. Denny, P., Hagen, F. K., Hardt, M., Liao, L., Yan, W., Arellanno, M. and Wong, D. T. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/ sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1994-2006.

131. Ganz, T., R.I. Lehrer.(1995).Defensins. *Pharmacol Ther* 66(2), 191-205.

132. Yount, N. Y., Yeaman, M. R. (2012). Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 337-360.

133. Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C. and Simons, M. (2000). PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nature Medicine*, 6(1), 49-55.

134. Yeaman, M. R., Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, *55*(1), 27-55.

135. Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 1-10.

136. Hancock, R.E., A. Rozek.(2002)., Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides*. FEMS Microbiol Lett* 206(2), 143-9.

137. Sawyer, J. G., Martin, N. L. and Hancock, R. E. (1988). Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. *Infection and Immunity*, 56(3), 693-698.

138. La Rocca, P., Biggin, P. C., Tieleman, D. P. and Sansom, M. S. (1999). Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid

bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1), 185-200.

139. Maddox, M. W., Longo, M. L. (2002). A Monte Carlo study of peptide insertion into lipid bilayers: equilibrium conformations and insertion mechanisms. *Biophysical Journal*, *82*(1), 244-263.

140. Tsang, J.C., D.A. Weber, and D.A. Brown. (1976). Evidences for complex formation between polymyxin B and lipopolysaccharides from Serratia marcescens. *The Journal of Antibiotics*, 29(7), 735-742.

141. Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G. and Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 195-199.

142. Bals, R., Lang, C., Weiner, D. J., Vogelmeier, C., Welsch, U. and Wilson, J. M. (2001). Rhesus monkey (Macaca mulatta) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 370-375.

143. Scocchi, M., Bontempo, D., Boscolo, S., Tomasinsig, L., Giulotto, E. and Zanetti, M. (1999). Novel cathelicidins in horse leukocytes. *FEBS Letters*, 457(3), 459-464.

144. Gennaro, R., Scocchi, M., Merluzzi, L. and Zanetti, M. (1998). Biological characterization of a novel mammalian antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1425(2), 361-368.

145. Mahoney, M. M., Lee, A. Y., Brezinski-Caliguri, D. J. and Huttner, K. M. (1995). Molecular analysis of the sheep cathelin family reveals a novel antimicrobial peptide. *FEBS Letters*, 377(3), 519-522.

146. Shamova, O., Brogden, K. A., Zhao, C., Nguyen, T., Kokryakov, V. N. and Lehrer, R. I. (1999). Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infection and Immunity*, *67*(8), 4106-4111.

147. Pungerčar, J., Štrukelj, B., Kopitar, G., Renko, M., Lenarčič, B., Gubenšek, F. and Turk, V. (1993). Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow. *FEBS Letters*, 336(2), 284-288.

148. Larrick, J. W., Morgan, J. G., Palings, I., Hirata, M. and Yen, M. H. (1991). Complementary DNA sequence of rabbit CAP18—a unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(1), 170-175.

149. Gallo, R. L., Kim, K. J., Bernfield, M., Kozak, C. A., Zanetti, M., Merluzzi, L. and Gennaro, R. (1997). Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13088-13093.

150. Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R. and lecha, F. (2002). Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes and Infection*, 4(3), 361-372.

151. Larrick, J. W., Hirata, M., Balint, R. F., Lee, J., Zhong, J. and Wright, S. C. (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein.*Infection and Immunity*, 63(4), 1291-1297.

152. Tomasinsig, L., Zanetti, M. (2005). The cathelicidins-structure, function and evolution. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1), 23-34.

153. Zanetti, M., R. Gennaro, and D. Romeo .(1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett,* 374(1), 1-5.

154. Zaiou, M., V. Nizet, and R.L. Gallo.(2003). Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *Journal Invest Dermatol,*120(5)810-6.

155. Bals, R., Wilson, J. M. (2003). Cathelicidins-a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(4), 711-720.

156. Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D. and Agerberth, B. (1998). Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3718-3724.

157. Shinnar, A.E., K.L. Butler, and H.J. Park. (2003). Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg Chem,* 31(6), 425-36.

158. Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B. and Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *22*(5), 465-478.

159. Wang, G. (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem,* 283(47), 32637-43.

160. Wang, G., Mishra, B., Epand, R. F. and Epand, R. M. (2014). High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(9), 2160-2172.

161. Bucki, R., Janmey, P.A. (2006). Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(9), 2932-40.

162. Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J. and Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9), 2206-2214.

163. Lee, C. C., Sun, Y., Qian, S. and Huang, H. W. (2011). Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical Journal*, 100(7), 1688-1696.

164. Oren, Z., Lerman, J., Gudmundsson, G., Agerberth, B. and Shai, Y. (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J*, 341, 501-513.

165. Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Ståhle-Bäckdahl, M., Lidén, S., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15258-15263.

166. Larrick, J. W., Lee, J., Ma, S., Li, X., Francke, U., Wright, S. C. and Balint, R. F. (1996). Structural, functional analysis and localization of the human CAP18 gene. *FEBS letters*, 398(1), 74-80.

167. Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B. and Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry*, 238(2), 325-332.

168. Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S. and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97(12), 3951-3959.

169. Durr, U.H., U.S. Sudheendra, and A. Ramamoorthy.(2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta,* 1758(9), 1408-25.

170. Malm, J., Sørensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A. and Egesten, A. (2000). The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa.*Infection and Immunity*, 68(7), 4297-4302.

171. Dorschner, R. A., Pestonjamasp, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V. and Gallo, R. L. (2001). Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(1), 91-97.

172. Nilsson, M. F., Sandstedt, B., Sørensen, O., Weber, G., Borregaard, N. and Ståhle-Bäckdahl, M. (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and Immunity*, 67(5), 2561-2566.

173. Islam, D., Bandholtz, L., Nilsson, J., Wigzell, H., Christensson, B., Agerberth, B. and Gudmundsson, G. H. (2001). Downregulation of

bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nature Medicine*, 7(2), 180-185.

174. Bals, R., Wang, X., Zasloff, M. and Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9541-9546.

175. Agerberth, B., Grunewald, J., Castaños-velez, E., Olsson, B., Jornvall, H., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. (1999). Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients.*American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(1), 283-290.

176. Cowland, J.B., A.H. Johnsen, and N. Borregaard .(1995).hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett*, 368(1), 173-6.

177. Sørensen, O., Cowland, J. B., Askaa, J. and Borregaard, N. (1997). An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *Journal of immunological methods*, 206(1), 53-59.

178. Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A. and Gallo, R. L. (2002). Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *Journal of dental research*, 81(12), 845-850.

179. Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., Schittek, B., Garbe, C. and Gallo, R. L. (2002). Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(5), 1090-1095.

180. Murakami, M., Dorschner, R. A., Stern, L. J., Lin, K. H. and Gallo, R. L. (2005). Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatric research*, 57(1), 10-15.

181. Frohm, M., Gunne, H., Bergman, A. C., Agerberth, B., Bergman, T., Boman, A. and Boman, H. G. (1996). Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *European Journal of Biochemistry*, 237(1), 86-92.

182. Paulsen, F., Pufe, T., Conradi, L., Varoga, D., Tsokos, M., Papendieck, J. and Petersen, W. (2002). Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *The Journal of Pathology*,198(3), 369-377.

183. Panyutich, A., Shi, J., Boutz, P. L., Zhao, C. and Ganz, T. (1997). Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted proprotegrins. *Infection and Immunity*, 65(3), 978-985.

184. Yamasaki, K., Schauber, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R. A., Schechter, N. M. and Gallo, R. L. (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *The FASEB Journal*, 20(12), 2068-2080.

185. Hans, M., Madaan Hans, V. (2014). Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity. *International Journal of Peptides*, *2014*.

186. Sørensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F. and Borregaard, N. (1997). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 90(7), 2796-2803.

187. Larrick, J. W., Hirata, M., Zhong, J. and Wright, S. C. (1995). Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology*, 1(1), 65-72.

188. Tanaka, D., K.T. Miyasaki, and R.I. Lehrer.(2000). Sensitivity of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Capnocytophaga spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. *Oral Microbiol Immunol,* 15(4), 226-31.

189. Travis, S. M., Anderson, N. N., Forsyth, W. R., Espiritu, C., Conway, B. D., Greenberg, E. P. and Tack, B. F. (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infection and Immunity*, 68(5), 2748-2755.

190. Shin, S. Y., Kang, S. W., Lee, D. G., Eom, S. H., Song, W. K. and Kim, J. I. (2000). *CRAMP analogues having potent antibiotic activity against bacterial, fungal, and tumor cells without hemolytic activity. Biochem Biophys Res Commun* 275(3), 904-9.

191. Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A. and Zanetti, M. (1996). Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28375-28381.

192. Skerlavaj, B., Benincasa, M., Risso, A., Zanetti, M. and Gennaro, R. (1999). SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes.*FEBS Letters*, 463(1), 58-62.

193. Zanetti, M. (1994). Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. *Journal Biol Chem* 269(11), 7855-8.

194. Scott, M.G., M.R. Gold, and Hancock, R.E. (1999). Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram-positive bacteria. *Infect Immun* 67(12), 6445-53.

195. Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 156-164.

196. Hancock, R.E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet,* 349(9049), 418-22.

197. Fulton, C., Anderson, G. M., Zasloff, M., Bull, R. and Quinn, A. G. (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *The Lancet*, 350(9093), 1750-1751.

198. Tossi, A., Scocchi, M., Skerlavaj, B. and Gennaro, R. (1994). Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Letters*, 339(1), 108-112.

199. Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C., Buurman, W. A., Hancock, R. E. and Gold, M. R. (2000). Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *The Journal of Immunology*,164(2), 549-553.

200. Kirikae, T., Hirata, M., Yamasu, H., Kirikae, F., Tamura, H., Kayama, F. and Nakano, M. (1998). Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infection and Immunity*, 66(5), 1861-1868.

201. van der Does, A. M., Beekhuizen, H., Ravensbergen, B., Vos, T., Ottenhoff, T. H., van Dissel, J. T. and Nibbering, P. H. (2010). LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature. *The Journal of Immunology*, *185*(3), 1442-1449.

202. Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D. M., Pistolic, J., Li, Y. and Hancock, R. E. (2007). Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1β, augments immune responses by multiple pathways. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7684-7691.

203. Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J. and Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule–and epithelial cell–derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor–like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1069-1074.

204. Tokumaru, S., Sayama, K., Shirakata, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Hanakawa, Y. and Hashimoto, K. (2005). Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4662-4668.

205. Kahlenberg, J. M., Kaplan, M. J. (2013). Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *The Journal of Immunology*,191(10), 4895-4901.

206. Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B. and Soderlund, J. (2007). The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Current HIV research*, *5*(4), 410-415.

207. Wang, G., K.M. Watson, and R.W. Buckheit, Jr.(2008). Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived

from human and bovine cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother*,. 52(9), 3438-40.

208. Nijnik, A., R.E. Hancock.(2009). The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol,* 16(1), 41-7.

209. Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T. and Leung, D. Y. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 347(15), 1151-1160.

210. Forde, E. (2014). Potential of host defense peptide prodrugs as neutrophil elastase-dependent anti-infective agents for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2), 978-85.

211. Forde, E., Devocelle, M. (2015). Pro-moieties of antimicrobial peptide prodrugs. *Molecules* 20(1), 1210-27.

212. Wu, W. K., Wang, G., Coffelt, S. B., Betancourt, A. M., Lee, C. W., Fan, D. and Cho, C. H. (2010). Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications. *International Journal of Cancer*, 127(8), 1741-1747.

213. Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T. and Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1665.

214. Ren, S. X., Cheng, A. S., To, K. F., Tong, J. H., Li, M. S., Shen, J. and Cho, C. H. (2012). Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer. *Cancer Research*, 72(24), 6512-6523.

215. van den Broek, I. (2010). Evaluation of human neutrophil peptide-1, -2 and -3 as serum markers for colorectal cancer. *Cancer Biomark,* 7(2), 109-15.

216. Albrethsen, J., Bøgebo, R., Gammeltoft, S., Olsen, J., Winther, B. and Raskov, H. (2005). Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer*, 5(1), 8..

217. Schaller-Bals, S., Schulze, A. and Bals, R. (2002). Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection.*American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(7), 992-995.

218. Dorschner, R. A., Lin, K. H., Murakami, M. and Gallo, R. L. (2003). Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatric research*, 53(4), 566-572.

219. Marchini, G., Lindow, S., Brismar, H., Ståbi, B., Berggren, V., Ulfgren, A. K. and Gudmundsson, G. H. (2002). The newborn infant is protected by an

innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *British Journal of Dermatology*, 147(6), 1127-1134.

220. Dale, B. A., Kimball, J. R., Krisanaprakornkit, S., Roberts, F., Robinovitch, M., O'Neal, R. and Weinberg, A. (2001). Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 36(5), 285-294.

221. Kostman, R.(1975). Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases*. Acta Paediatr Scand* 64(2), 362-8.

222. Kostmann, R.(1956). Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl,* 45(Suppl 105), 1-78.

223. Pütsep, K., Carlsson, G., Boman, H. G. and Andersson, M. (2002). Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study.*The Lancet*, 360(9340), 1144-1149.

224. Carlsson, G., Wahlin, Y. B., Johansson, A., Olsson, A., Eriksson, T., Claesson, R. and Henter, J. I. (2006). Periodontal disease in patients from the original Kostmann family with severe congenital neutropenia. *Journal of Periodontology*, 77(4), 744-751.

225. Rai, R., Thiagarajan, S., Mohandas, S., Natarajan, K., Shanmuga Sekar, C., & Ramalingam, S. (2010). Haim Munk syndrome and Papillon Lefevre syndrome–allelic mutations in cathepsin C with variation in phenotype. *International Journal of Dermatology*, 49(5), 541-543.

226. Hart, T. C., Hart, P. S., Michalec, M. D., Zhang, Y., Firatli, E., Van Dyke, T. E. and Soskolne, W. A. (2000). Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *Journal of Medical Genetics*, 37(2), 88-94.

227. Hart, T.C., Kornman, K.S. (1997). Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 14, 202-15.

228. Bachrach, G., Chaushu, G., Zigmond, M., Yefenof, E., Stabholz, A., Shapira, J.and Chaushu, S. (2006). Salivary LL-37 secretion in individuals with Down syndrome is normal. *Journal of Dental Research*, 85(10), 933-936.

229. Tao, R., Jurevic, R. J., Coulton, K. K., Tsutsui, M. T., Roberts, M. C., Kimball, J. R.and Dale, B. A. (2005). Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3883-3888.

230. Woo, J. S., Jeong, J. Y., Hwang, Y. J., Chae, S. W., Hwang, S. J. and Lee, H. M. (2003). Expression of cathelicidin in human salivary glands. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129(2), 211-214.

231. Inomata, M., Into, T. and Murakami, Y. (2010). Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10

induced by Porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts.*European Journal of Oral Sciences*, *118*(6), 574-581.

232. Dorschner, R. A., Lopez-Garcia, B., Peschel, A., Kraus, D., Morikawa, K., Nizet, V. and Gallo, R. L. (2006). The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *The FASEB Journal*, 20(1), 35-42.

233. Gutner, M., Chaushu, S., Balter, D. and Bachrach, G. (2009). Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of Porphyromonas gingivalis. *Infection and immunity*, 77(12), 5558-5563.

234. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. and Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144.

235. Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A. and Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Hhost & Microbe*, *10*(5), 497-506.

236. Bachrach, G., Altman, H., Kolenbrander, P. E., Chalmers, N. I., Gabai-Gutner, M., Mor, A., and Steinberg, D. (2008). Resistance of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 to direct killing by antimicrobial peptides is protease independent.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 638-642.

237. Devine, D. A., Marsh, P. D., Percival, R. S., Rangarajan, M. and Curtis, M. A. (1999). Modulation of antibacterial peptide activity by products of Porphyromonas gingivalis and Prevotella spp. *Microbiology*, 145(4), 965-971.

238. Sol, A., Skvirsky, Y., Nashef, R., Zelentsova, K., Burstyn-Cohen, T., Blotnick, E. and Bachrach, G. (2014). Actin enables the antimicrobial action of LL-37 peptide in the presence of microbial proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), 22926-22941.

239. Yang, D., Oppenheim, J. J. (2009). Alarmins and antimicrobial immunity.*Medical mycology*, 47(sup1), S146-S153.

240. Dommisch, H., Vorderwülbecke, S., Eberhard, J., Steglich, M. and Jepsen, S. (2009). SELDI–TOF-MS of gingival crevicular fluid—A methodological approach. *Archives of Oral Biology*, 54(9), 803-809.

241. Diamond, G., Beckloff, N. and Ryan, L. K. (2008). Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *Journal of Dental Research*,87(10), 915-927.

242. Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., Weinberg, A., Darveau, R. P., Bainbridge, B. W., and Dale, B. A. (2000). Inducible expression of human β-defensin 2 byFusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: multiple

signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier.*Infection and Immunity*, 68(5), 2907-2915.

243. Ji, S., Kim, Y., Min, B. M., Han, S. H. and Choi, Y. (2007). Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontal Research*, 42(6), 503-510.

244. Kim, B. J., Rho, Y. K., Lee, H. I., Jeong, M. S., Li, K., Seo, S. J. and Hong, C. K. (2010). The Effect of Calcipotriol on the Expression of Human $\boldsymbol{\beta}$ Defensin-2 and LL-37 in Cultured Human Keratinocytes. *Clinical and Developmental Immunology*, *2009*.

245. Yin, Q., Xu, X., Lin, Y., Lv, J., Zhao, L. and He, R. (2014). Ultraviolet B irradiation induces skin accumulation of plasmacytoid dendritic cells: A possible role for chemerin. *Autoimmunity*, 47(3), 185-192.

246. Karlsson, J., Carlsson, G., Larne, O., Andersson, M., & Pütsep, K. (2008). Vitamin D3 induces pro-LL-37 expression in myeloid precursors from patients with severe congenital neutropenia. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(5), 1279-1286.

247. Martineau, A. R., Wilkinson, K. A., Newton, S. M., Floto, R. A., Norman, A. W., Skolimowska, K. and Wilkinson, R. J. (2007). IFN-γ-and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7190-7198.

248. Cederlund, A., Kai-Larsen, Y., Printz, G., Yoshio, H., Alvelius, G., Lagercrantz, H. and Agerberth, B. (2013). Lactose in human breast milk an inducer of innate immunity with implications for a role in intestinal homeostasis. *PLoS One*, 8(1), e53876.

249. Jiang, W., Sunkara, L. T., Zeng, X., Deng, Z., Myers, S. M. and Zhang, G. (2013). Differential regulation of human cathelicidin LL-37 by free fatty acids and their analogs. *Peptides*, 50, 129-138.

250. Talukder, P., Satho, T., Irie, K., Sharmin, T., Hamady, D., Nakashima, Y. and Miake, F. (2011). Trace metal zinc stimulates secretion of antimicrobial peptide LL-37 from Caco-2 cells through ERK and p38 MAP kinase. *International Immunopharmacology*, 11(1), 141-144.

251. Schauber, J., Iffland, K., Frisch, S., Kudlich, T., Schmausser, B., Eck, M. and Scheppach, W. (2004). Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Molecular Immunology*, 41(9), 847-854.

252. Cederlund, A., Nylén, F., Miraglia, E., Bergman, P., Gudmundsson, G. H. and Agerberth, B. (2013). Label-Free Quantitative Mass Spectrometry Reveals Novel Pathways Involved in LL-37 Expression. *Journal of Innate Immunity*, 6(3), 365-376.

253. Kitazawa, S., Kajimoto, K., Kondo, T. and Kitazawa, R. (2003). Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of

human RANKL gene promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(4), 771-777.

254. Anand, N., Chandrasekaran, S. C. and Rajput, N. S. (2013). Vitamin D and periodontal health: Current concepts. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(3), 302.

255. Karmali, R., Hewison, M., Rayment, N., Farrow, S. M., Brennan, A., Katz, D. R. and O'Riordan, J. L. (1991). 1, 25 (OH) 2D3 regulates c-myc mRNA levels in tonsillar T lymphocytes. *Immunology*, *74*(4), 589.

256. Shiozawa, K., Shiozawa, S., Shimizu, S. and Fujita, T. (1985). 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits pokeweed mitogen-stimulated human B-cell activation: an analysis using serum-free culture conditions. *Immunology*, 56(1), 161.

257. Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deftos, L. J. and Manolagas, S. C. (1986). 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *The Journal of Immunology*, 136(8), 2734-2740.

258. Bikle, D. (2009). Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(1), 26-34.

259. Hochberg, Z.(2003). Rickets--past and present. Introduction. *Endocr Dev*, 6, 1-13.

260. Lehmann, B. (2009). Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin–facts, contradictions and hypotheses. *Experimental dermatology*, 18(2), 97-108.

261. Bikle, D. D., Pillai, S., Gee, E. and Hincenbergs, M. (1989). Regulation of 1, 25-Dihydroxyvitamin D Production in Human Keratinocytes by Interferon-γ*. *Endocrinology*, 124(2), 655-660.

262. Bikle, D. D. (2004). Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(3), 436-444.

263. Timms, P. M., Mannan, N., Hitman, G. A., Noonan, K., Mills, P. G., Aganna, E. and Boucher, B. J. (2002). Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders?. *Qjm*, 95(12), 787-796.

264. Kendrick, J., Targher, G., Smits, G. and Chonchol, M. (2009). 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey.*Atherosclerosis*, 205(1), 255-260.

265. Cantorna, M. T., Mahon, B. D. (2004). Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Experimental Biology and Medicine*, *229*(11), 1136-1142.

266. Wahl, D. A., Cooper, C., Ebeling, P. R., Eggersdorfer, M., Hilger, J., Hoffmann, K. and Dawson-Hughes, B. (2013). A global representation of vitamin D status in healthy populations: reply to comment by Saadi. *Archives of Osteoporosis*,8(1-2), 1-2.

267. Mithal, A., Wahl, D. A., Bonjour, J. P., Burckhardt, P., Dawson-Hughes, B., Eisman, J. A. and IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. (2009). Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*, *20*(11), 1807-1820.

268. Jeffcoat, M. (2005). The association between osteoporosis and oral bone loss.*Journal of Periodontology*, 76(11-s), 2125-2132.

269. Hildebolt, C. F. (1997). Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofacial Radiology*, 26(1), 3-15.

270. Southard, K. A., Southard, T. E., Schlechte, J. A. and Meis, P. A. (2000). The relationship between the density of the alveolar processes and that of post-cranial bone. *Journal of dental research*, 79(4), 964-969.

271. Payne, J. B., Reinhardt, R. A., Nummikoski, P. V. and Patil, K. D. (1999). Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporosis international*, 10(1), 34-40.

272. Wactawski-Wende, J., Grossi, S. G., Trevisan, M., Genco, R. J., Tezal, M., Dunford, R. G. and Hreshchyshyn, M. M. (1996). The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 67(10s), 1076-1084.

273. Wactawski-Wende, J., Hausmann, E., Hovey, K., Trevisan, M., Grossi, S. and Genco, R. J. (2005). The association between osteoporosis and alveolar crestal height in postmenopausal women. *Journal of periodontology*, 76(11-s), 2116-2124.

274. Walters, M. R. (1992). Newly Identified Actions of the Vitamin D Endocrine System. *Endocrine Reviews*, 13(4), 719-764.

275. Tezal, M., Wactawski-Wende, J., Grossi, S. G., Ho, A. W., Dunford, R., & Genco, R. J. (2000). The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *Journal of Periodontology*, 71(9), 1492-1498.

276. Garcia, M. N., Hildebolt, C. F., Miley, D. D., Dixon, D. A., Couture, R. A., Anderson Spearie, C. L. and Civitelli, R. (2011). One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82(1), 25-32.

277. Cannell, J. J., Hollis, B. W., Zasloff, M. and Heaney, R. P. (2008). Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency.

278. Cannell, J. J., Vieth, R., Willett, W., Zasloff, M., Hathcock, J. N., White, J. H. and Giovannucci, E. (2008). Cod liver oil, vitamin A toxicity, frequent

respiratory infections, and the vitamin D deficiency epidemic. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 117(11), 864.

279. White, J. H. (2008). Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infection and immunity*, 76(9), 3837-3843.

280. Zittermann, A. (2003). Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?. *British Journal of Nutrition*, 89(05), 552-572.

281. Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease.*Journal of periodontology*, 79(8S), 1569-1576.

282. Pereira, F.M. (2015). Association between periodontal changes and osteoporosis in postmenopausal women. *Climacteric,* 18(2), 311-5.

283. Moeintaghavi, A., Pourjavad, M., Dadgar, S. and Tabbakh, N. S. (2013). Evaluation of the Association Between Periodontal Parameters, Osteoporosis and Osteopenia in Post Menopausal Women. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 10(5), 443.

284. Bertulucci, L. D. A. B., Pereira, F. M. B. G., Oliveira, A. E. F. D., Brito, L. M. O. and Lopes, F. F. (2012). Periodontal disease in women in post-menopause and its relationship with osteoporosis. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, *34*(12), 563-567.

285. Baxter, J. C. (1984). The nutritional intake of geriatric patients with varied dentitions. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 51(2), 164-168.

286. Habets, L. L. M. H., Bras, J. and Borgmeyer-Hoelen, A. M. M. J. (1988). Mandibular atrophy and metabolic bone loss: endocrinology, radiology and histomorphometry. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 17(3), 208-211.

287. Habets, L. L. M. H., Bras, J. and Van Merkesteyn, J. P. R. (1988). Mandibular atrophy and metabolic bone loss: Histomorphometry of iliac crest biopsies in 74 patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *17*(5), 325-329.

288. Wical, K. E., Brussee, P. (1979). Effects of a calcium and vitamin D supplement on alveolar ridge resorption in immediate denture patients. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 41(1), 4-11.

289. Wical, K. E., Swoope, C. C. (1974). Studies of residual ridge resorption. Part II. The relationship of dietary calcium and phosphorus to residual ridge resorption. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 32(1), 13-22.

290. Groen, J. J., Duyvensz, F. and Halsted, J. A. (1960). Diffuse alveolar atrophy of the jaw (non-inflammatory form of paradental disease) and pre-senile osteoporosis. *Gerontologia Clinica*, 2(2), 68-86.

291. Krook, L. (1972).*Human periodontal disease. Morphology and response to calcium therapy.* Cornell Vet 62(1), 32-53.

292. Lutwak, L. (1971). *Calcium deficiency and human periodontal disease.* Isr J Med Sci, 7(3), 504-5.

293. Lutwak, L., F.R. Singer, and M.R. Urist.(1974).UCLA conference: Current concepts of bone metabolism. *Ann Intern Medicine,* 80(5), 630-44.

294. Inagaki, K., Krall, E. A., Fleet, J. C. and Garcia, R. I. (2003). Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *Journal of Periodontology*, 74(2), 161-167.

295. Hennig, B. J., Parkhill, J. M., Chapple, L. L., Heasman, P. A. and Taylor, J. J. (1999). Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 70(9), 1032-1038.

296. Hildebolt, C. F. (2005). Effect of vitamin D and calcium on periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76(9), 1576-1587.

297. Dietrich, T., Joshipura, K. J., Dawson-Hughes, B. and Bischoff-Ferrari, H. A. (2004). Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and periodontal disease in the US population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 108-113.

298. Dietrich, T., Nunn, M., Dawson-Hughes, B. and Bischoff-Ferrari, H. A. (2005). Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and gingival inflammation. *The American journal of Clinical Nutrition*, *82*(3), 575-580.

299. Liu, K., Meng, H., Lu, R., Xu, L., Zhang, L., Chen, Z. and Tang, X. (2010). Initial periodontal therapy reduced systemic and local 25-hydroxy vitamin D3 and Interleukin-1β in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 81(2), 260-266.

300. Liu, K., Meng, H., Tang, X., Xu, L., Zhang, L., Chen, Z. and Lu, R. (2009). Elevated plasma calcifediol is associated with aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 80(7), 1114-1120.

301. Heaney, R. P., Davies, K. M., Chen, T. C., Holick, M. F. and Barger-Lux, M. J. (2003). Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(1), 204-210.

302. Chun, R. F., Adams, J. S. and Hewison, M. (2008). Back to the future: a new look at 'old'vitamin D. *Journal of Endocrinology*, *198*(2), 261-269.

303. Yim, S., Dhawan, P., Ragunath, C., Christakos, S. and Diamond, G. (2007). Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. *Journal of Cystic Fibrosis*, 6(6), 403-410.

304. Chromek, M., Slamová, Z., Bergman, P., Kovács, L., Podracká, L. U., Ehrén, I. and Brauner, A. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin

protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine*, 12(6), 636-641.

305. Weber, G., Heilborn, J. D., Jimenez, C. I. C., Hammarsjö, A., Törmä, H. and Ståhle, M. (2005). Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(5), 1080-1082.

306. Liu, N., Kaplan, A. T., Low, J., Nguyen, L., Liu, G. Y., Equils, O. and Hewison, M. (2009). Vitamin D induces innate antibacterial responses in human trophoblasts via an intracrine pathway. *Biology of Reproduction*, 80(3), 398-406.

307. Gombart, A. F., Borregaard, N. and Koeffler, H. P. (2005). Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *The FASEB Journal*, 19(9), 1067-1077.

308. Bikle, D. D. (2010). Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(6), 375-384.

309. Lin, R., White, J. H. (2004). The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays*, 26(1), 21-28.

310. Wang, T. T., Tavera-Mendoza, L. E., Laperriere, D., Libby, E., Burton MacLeod, N., Nagai, Y. andWhite, J. H. (2005). Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1, 25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Molecular Endocrinology*, 19(11), 2685-2695.

311. Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C. and Mathieu, C. (2010). Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology*, 10(4), 482-496.

312. Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F. and Malaguarnera, L. (2011). Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*, 134(2), 123-139.

313. Jeng, L., Yamshchikov, A. V., Judd, S. E., Blumberg, H. M., Martin, G. S., Ziegler, T. R. and Tangpricha, V. (2009). Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *Journal Transl Medicine*, 7(28), 19.

314. Steinmann, J., Halldórsson, S., Agerberth, B. and Gudmundsson, G. H. (2009). Phenylbutyrate induces antimicrobial peptide expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12), 5127-5133.

315. Adams, J. S., Ren, S., Liu, P. T., Chun, R. F., Lagishetty, V., Gombart, A. F. and Hewison, M. (2009). Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *The Journal of Immunology*, 182(7), 4289-4295.

316. Liu, P. T., Stenger, S., Tang, D. H. and Modlin, R. L. (2007). Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium

tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2060-2063.

317. McMahon, L., Schwartz, K., Yilmaz, O., Brown, E., Ryan, L. K. and Diamond, G. (2011). Vitamin D-mediated induction of innate immunity in gingival epithelial cells. *Infection and immunity*, 79(6), 2250-2256.

318. Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. American Academy of Periodontology. (2000).*Journal Periodontol,* 71(5 Suppl), 853-5.

319. Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J. and Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*,14(1), 216-248.

320. Güntsch, A., Erler, M., Preshaw, P. M., Sigusch, B. W., Klinger, G. and Glockmann, E. (2006). Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *Journal of Periodontal Research*, 41(3), 184-188.

321. Hujoel, P. P., Del Aguila, M. A., & DeRouen, T. A. (2003). A hidden periodontitis epidemic during the 20th century?. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *31*(1), 1-6.

322. Ojima, M., Hanioka, T. (2010). Destructive effects of smoking on molecular and genetic factors of periodontal disease. *Tobacco Induced Diseases*, 8(1), 4.

323. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. (2001). Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(4), 283-295.

324. Erdemir, E. O., Duran, I. and Haliloglu, S. (2004). Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-α in patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(2), 99-104.

325. Baljoon, M., Natto, S. and Bergström, J. (2005). Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(7), 789-797.

326. Gomes, S. C., Piccinin, F. B., Oppermann, R. V., Susin, C., Nonnenmacher, C. I., Mutters, R. and Marcantonio, R. A. (2006). Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *Journal of Periodontology*,77(9), 1483-1490.

327. Bergström, J., Preber, H. (1986). The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *Journal of Periodontal Research*, 21(6), 668-676.

328. Bergström, J., Boström, L. (2001). Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(7), 680-685.

329. Dietrich, T., Bernimoulin, J. P. and Glynn, R. J. (2004). The effect of cigareté smoking on gingival bleeding. *Journal of Periodontology*, 75(1), 16-22.

330. Kinane, D. F., Radvar, M. (1997). The Effect of Smoking on Mechanical and Antimicrobial Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology*, 68(5), 467-472.

331. Iho, S., Tanaka, Y., Takauji, R., Kobayashi, C., Muramatsu, I., Iwasaki, H. and Takahashi, T. (2003). Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-κB. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(5), 942-951.

332. Sørensen, L. T., Nielsen, H. B., Kharazmi, A. and Gottrup, F. (2004). Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. *Surgery*, *136*(5), 1047-1053.

333. Pauletto, N. C., Liede, K., Nieminen, A., Larjava, H. and Uitto, V. J. (2000). Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, 71(1), 58-62.

334. MacFarlane, G. D., Herzberg, M. C., Wolff, L. F. and Hardie, N. A. (1992). Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *Journal of Periodontology*, 63(11), 908-913.

335. Henemyre, C. L., K. Scales, D., Hokett, S. D., Cuenin, M. F., Peacock, M. E., Parker, M. H. and Chuang, A. H. (2003). Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *Journal of Periodontology*, *74*(10), 1440-1446.

336. Johnson, G. K., Guthmiller, J. M. (2007). The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontology 2000*, 44(1), 178-194.

337. Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Eksomtramate, M., Rerkyen, P., Phairat, B., Schaecher, K. E. and Pichyangkul, S. (2009). Cigarette smoke extract modulates human β-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *Journal of Periodontal Research*, 44(4), 557-564.

338. Wolgin, M., Liodakis, S., Pries, A. R., Zakrzewicz, A. and Kielbassa, A. M. (2012). HBD-1 and hBD-2 expression in HaCaT keratinocytes stimulated with nicotine. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 814-819.

339. Nakamura, S., Saitoh, M., Yamazaki, M., Nishimura, M., Kurashige, Y., Arakawa, T., ... & Abiko, Y. (2010). Nicotine induces upregulated expression of beta defensin-2 via the p38MAPK pathway in the HaCaT

human keratinocyte cell line. *Medical Molecular Morphology*, 43(4), 204-210.

340. Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S. and Makishima, M. (2009). The aryl hydrocarbon receptor activator benzo [a] pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages. *Toxicological Sciences*, 109(1), 50-58.

341. Hewison, M. (2010). Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(2), 365-379.

342. Lamster, I. B., Ahlo, J. K. (2007). Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), 216-229.

343. Alfano, M. C. (1974). The origin of gingival fluid. *Journal of Theoretical Biology*, 47(1), 127-136.

344. Griffiths, G. S. (2003). Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31(1), 32-42.

345. Kleinberg, I., Golub, D. and Lorne, M. (1985). Gingival crevicular fluid and its use in diagnosis of disease. *International Journal of Dermatology*, 24(1), 37-40.

346. Cao, C. F., & Smith, Q. T. (1989). Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 16(1), 17-20.

347. Page, R. C. (1992). Host Response Tests for Diagnosing Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 63(4s), 356-366.

348. Uitto, V. J., Overall, C. M. and McCulloch, C. (2003). Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31(1), 77-104.

349. Leishman, S. J., Seymour, G. J. and Ford, P. J. (2013). Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. *Disease Markers*, 35(5), 543-549.

350. Goodson, J. M. (2003). Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*, 31(1), 43-54.

351. Silness, J., Löe, H. (1964). Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica*, 22(1), 121-135.

352. Löe, H., Silness, J. (1963). Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica*, 21(6), 533-551.

353. Kardeşler, L., Buduneli, N., Bıyıkoğlu, B., Çetinkalp, Ş. and Kütükçüler, N. (2008). Gingival crevicular fluid PGE 2, IL-1ß, t-PA, PAI-2 levels in type 2

diabetes and relationship with periodontal disease. *Clinical Biochemistry*, 41(10), 863-868.

354. Linden, G. J., Mullally, B. H., Burden, D. J., Lamey, P. J., Shaw, C., Ardill, J. and Lundy, F. T. (2002). Changes in vasoactive intestinal peptide in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, *29*(6), 484-489.

355. Jin, L., Söder, B. and Corbet, E. F. (2000). Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(6), 929-939.

356. Tüter, G., Kurtis, B. and Serdar, M. (2002). Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Journal of Periodontology*, 73(5), 487-493.

357. Kurtis, B., Tüter, G., Serdar, M., Akdemir, P., Uygur, C., Firatli, E. and Bal, B. (2005). Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76(11), 1849-1855.

358. Hymøller, L., Jensen, S. K. (2011). Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C 30 reversed phase column and UV detection–Easy and acetonitrile-free. *Journal of Chromatography A*,1218(14), 1835-1841.

359. Schlueter, N. (2010). *Adoption of a toothbrushing technique: a controlled, randomised clinical trial.* Clin Oral Investig 14(1), 99-106.

360. Bedran, T.B. (2014).Synergistic Anti-Inflammatory Activity of the Antimicrobial Peptides Human Beta-Defensin-3 (hBD-3) and Cathelicidin (LL-37) in a Three-Dimensional Co-Culture Model of Gingival Epithelial Cells and Fibroblasts. *PLoS One,* 9(9), e106766.

361. Kinane, D. F., Lappin, D. F. (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica*, 59(3), 154-160.

362. Montreekachon, P., Nongparn, S., Sastraruji, T., Khongkhunthian, S., Chruewkamlow, N., Kasinrerk, W. Krisanaprakornkit, S. (2013). Favorable interleukin-8 induction in human gingival epithelial cells by the antimicrobial peptide LL-37. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 32(3), 251-DOI.

363. Dale, B. A. (2002). Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontology 2000*, 30(1), 70-78.

364. Broekman, D. C., Frei, D. M., Gylfason, G. A., Steinarsson, A., Jörnvall, H., Agerberth, B. and Maier, V. H. (2011). Cod cathelicidin: isolation of the mature peptide, cleavage site characterisation and developmental expression.*Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), 296-303.

365. Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O., Borregaard, N. and Ståhle-Bäckdahl, M. (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *Journal of Investigative Dermatology*,120(3), 379-389.

366. Sawa, T., Kurahashi, K., Ohara, M., Gropper, M. A., Doshi, V., Larrick, J. W. and Wiener-Kronish, J. P. (1998). Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against Pseudomonas aeruginosa in a mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), 3269-3275.

367. Montreekachon, P., Chotjumlong, P., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Reutrakul, V and Krisanaprakornkit, S. (2011). Involvement of P2X7 purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 46(3), 327-337.

368. Tjabringa, G. S., Ninaber, D. K., Drijfhout, J. W., Rabe, K. F. and Hiemstra, P. S. (2006). Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *International Archives of Allergy and Immunology*, 140(2), 103-112.

369. Chotjumlong, P., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Reutrakul, V., Supanchart, C., Buranaphatthana, W. and Krisanaprakornkit, S. (2013). Involvement of the P2X7 purinergic receptor and c-Jun N-terminal and extracellular signal-regulated kinases in cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 induction by LL-37. *Journal of Innate Immunity*, 5(1), 72-83.

370. Izadpanah, A., Gallo, R.L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal Am Acad Dermatol,* 52(3 Pt 1), 381-90.

371. Alalwani, S. M., Sierigk, J., Herr, C., Pinkenburg, O., Gallo, R., Vogelmeier, C. and Bals, R. (2010). The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology*, 40(4), 1118-1126.

372. Jönsson, D. Nilsson, B. O. (2012). The antimicrobial peptide LL-37 is anti-inflammatory and proapoptotic in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, *47*(3), 330-335.

373. Kittaka, M., Shiba, H., Kajiya, M., Ouhara, K., Takeda, K., Kanbara, K. and Kurihara, H. (2013). Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 48(2), 228-234.

374. Supanchart, C., Thawanaphong, S., Makeudom, A., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Kornak, U., & Krisanaprakornkit, S. (2012). The antimicrobial peptide, LL-37, inhibits in vitro osteoclastogenesis. *Journal of Dental Research*, 91(11), 1071-1077.

375. Ouhara, K. (2008).Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. *Journal Antimicrob Chemother,* 61(6), 1266-9.

376. Hosokawa, I. (2006).Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin Exp Immunol* 146(2), 218-25.

377. McCrudden, M.T. (2013). LL-37 in periodontal health and disease and its susceptibility to degradation by proteinases present in gingival crevicular fluid. *Journal Clin Periodontol,* 40(10), 933-41.

378. Pereira, A.L. (2012).Human beta-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 57(12), 1609-14.

379. Johnson, N.W.(1991). Crevicular fluid-based diagnostic tests. *Curr Opin Dent* 1(1), 52-65.

380. Becerik, S. (2012). Gingival crevicular fluid and plasma acute-phase cytokine levels in different periodontal diseases. *Jounal Periodontol,* 83(10), 1304-13.

381. Lamster, I. B. (1992). The Host Response in Gingival Crevicular Fluid: Potential Applications in Periodontitis Clinical Trials. *Journal of Periodontology*,63(12s), 1117-1123.

382. Griffiths, G. S. (2003). Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31(1), 32-42.

383. Embery, G., Waddington, R. (1994). Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. *Advances in Dental Research*, 8(2), 329-336.

384. Lamster, I.B., R.L. Oshrain, and J.M. Gordon. (1986). Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *Journal Clin Periodontol*, 13(8), 799-804.

385. Holick, M. F., Uskokovic, M., Henley, J. W., MacLaughlin, J., Holick, S. A. and Potts Jr, J. T. (1980). The Photoproduction of 1α, 25–Dihydroxyvitamin D3 in Skin: An Approach to the Therapy of Vitamin-D-Resistant Syndromes. *New England Journal of Medicine*, *303*(7), 349-354.

386. Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Ruzicka, T. and Schauber, J. (2010). Control of cutaneous antimicrobial peptides by vitamin D3. *Archives of Dermatological Research*, 302(6), 401-408.

387. Van Etten, E., Stoffels, K., Gysemans, C., Mathieu, C. and Overbergh, L. (2008). Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. *Nutrition Reviews*, *66*(suppl 2), S125-S134.

388. van Etten, E., Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3: basic concepts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 97(1), 93-101.

389. Schauber, J., Dorschner, R. A., Coda, A. B., Büchau, A. S., Liu, P. T., Kiken, D. and Gallo, R. L. (2007). Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D–dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 803.

390. D'Ambrosio, D. (1998). Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *Journal Clin Invest,* 101(1), 252-62.

391. Krall, E. A., Wehler, C., Garcia, R. I., Harris, S. S. and Dawson-Hughes, B. (2001). Calcium and vitamin D supplements reduce tooth loss in the elderly. *The American Journal of Medicine*, 111(6), 452-456.

392. Specker, B. L., Ho, M. L., Oestreich, A., Yin, T. A., Shui, Q. M., Chen, X. C. and Tsang, R. C. (1992). Prospective study of vitamin D supplementation and rickets in China. *The Journal of pediatrics*, 120(5), 733-739.

393. Dervis, E. (2005). Oral implications of osteoporosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 100(3), 349-356.

394. Kinane, D. F., Chestnutt, I. G. (2000). Smoking and periodontal disease.*Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3), 356-365.

395. Supaporn Chatrchaiwiwatana, D. D. S. (2009). Periodontitis associated with tobacco smoking among rural Khon Kaen Thai males: analysis of two data sets. *Journal Medicine Assoc Thai*, 92(11), 1524-31.

396. Do, L. G., Slade, G. D., Roberts-Thomson, K. F. and Sanders, A. E. (2008). Smoking-attributable periodontal disease in the Australian adult population.*Journal of Clinical Periodontology*, 35(5), 398-404.

397. Vouros, I. D., Kalpidis, C. D., Chadjipantelis, T. and Konstantinidis, A. B. (2009). Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 11(4), 250-257.

398. Yanagisawa, T., Ueno, M., Shinada, K., Ohara, S., Wright, F. A. C. and Kawaguchi, Y. (2010). Relationship of smoking and smoking cessation with oral health status in Japanese men. *Journal of Periodontal Research*, 45(2), 277-283.

399. Bergström, J., Eliasson, S. and Dock, J. (2000). A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *Journal of Periodontology*, *71*(8), 1338-1347.

400. Ramón, J. M., Echeverría, J. J. (2002). Effects of smoking on periodontal tissues. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(8), 771-776.

401. Lee, J., Taneja, V., Vassallo, R. (2012). Cigarette smoking and inflammation cellular and molecular mechanisms. *Journal of Dental Research*, 91(2), 14 2-149.

402. Pabst, M. J., Pabst, K. M., Collier, J. A., Coleman, T. C., Lemons-Prince, M. L., Godat, M. S. and Babu, J. P. (1995). Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *Journal of Periodontology*, 66(12), 1047-1055.

403. Genco, R. J. (1996). Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases.*Journal of Periodontology*, *67*(10s), 1041-1049.

404. Orban, J.E., Stallard, R.E. (1969). Gingival crevicular fluid: a reliable predictor of gingival health? *Journal Periodontol*, 40(4), 231-5.

405. Eley, B. M., Cox, S. W. (1998). Advances in periodontal diagnosis. 9. Potential markers of cell death and tissue degradation. *British Dental Journal*,184(9), 427-430.

406. Gamonal, J. (2000). Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *Journal Periodontol* 71(10), 1535-45.

407. Figueredo, C. M., Brito, F., Barros, F. C., Menegat, J. S. B., Pedreira, R. R., Fischer, R. G. and Gustafsson, A. (2011). Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*,46(1), 141-146.

408. Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y. and Ishikawa, I. (2003). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of periodontology*, 74(10), 1460-1469.

409. Toker, H., Poyraz, O. and Eren, K. (2008). Effect of periodontal treatment on IL-1β, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(6), 507-513.

410. Mendonça, A. C., Santos, V. R., Ribeiro, F. V., Lima, J. A., Miranda, T. S., Feres, M. and Duarte, P. M. (2012). Surgical and non-surgical therapy with systemic antimicrobials for residual pockets in type 2 diabetics with chronic periodontitis: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(4), 368-376.

411. Cetinkaya, B., Guzeldemir, E., Ogus, E. and Bulut, S. (2013). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 84(1), 84-93.

412. Grassi, J., Roberge, C. J., Frobert, Y., Pradelles, P. and Poubelle, P. E. (1991). Determination of ILlα, ILlβ and IL2 in Biological Media using Specific Enzyme Immunometric Assays. *Immunological reviews*, *119*(1), 125-145.

413. Davidopoulou, S., Diza, E., Menexes, G. and Kalfas, S. (2012). Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in children. *Archives of Oral Biology*, *57*(7), 865-869.

414. Davidopoulou, S., Diza, E., Sakellari, D., Menexes, G. and Kalfas, S. (2013). Salivary concentration of free LL-37 in edentulism, chronic periodontitis and healthy periodontium. *Archives of Oral Biology*, 58(8), 930-934.

415. Lee, J.M. (2007). *Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants.* Clin Pediatr (Phila) 46(1), 42-4.

416. Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), 266-281.

417. Dokoh, S., Morita, R., Fukunaga, M., Yamamoto, I. and Torizuka, K. (1978). Competitive protein binding assay for 1, 25-dihydroxyvitamin D in human plasma. *Endocrinologia Japonica*, 25(5), 431-436.

418. Olkowski, A. A., Aranda-Osorio, G. and McKinnon, J. (2003). Rapid HPLC method for measurement of vitamin D3 and 25 (OH) D3 in blood plasma.*International Journal For Vitamin and Nutrition Research*, *73*(1), 15-18.

419. Chen, Y., Reddy, R. M., Li, W., Yettlla, R. R., Lopez, S. and Woodman, M. (2015). Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Vitamins A and D3 in Fluid Milk Products. *Journal of AOAC International*, *98*(2), 390-396.

420. Cangussu, L.M. (2015). *Effect of vitamin D supplementation alone on muscle function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.* Osteoporos Int.

421. Galunska, B., Gerova, D., Kosev, P., Anakievski, D., & Hinev, A. (2015). Serum 25-hydroxy vitamin D levels in Bulgarian patients with prostate cancer: a pilot study. *Clinical Laboratory*, *61*(3-4), 329-335.

422. Du, L., Shan, L., Wang, B., Feng, J. Y., Xu, Z. D. and Jia, F. Y. (2015). [Serum levels of 25-hydroxyvitamin D in children with autism spectrum disorders.].*Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese journal of Contemporary Pediatrics*,17(1), 68-71.

423. Lee, S. H., Jun, H. K., Lee, H. R., Chung, C. P. and Choi, B. K. (2010). Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *35*(2), 138-145.

424. Mookherjee, N. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37*. Journal Immunol* 176(4), 2455-64.

425. Nagaoka, I., Tamura, H. and Hirata, M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *The Journal of Immunology*, 176(5), 3044-3052.

426. Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H. and Heumann, D. (2001). Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-α by blocking the binding of LPS to CD14+ cells. *The Journal of Immunology*, 167(6), 3329-3338.

427. Grando, S. A., Horton, R. M., Mauro, T. M., Kist, D. A., Lee, T. X. and Dahl, M. V. (1996). Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(3), 412-418.

428. Theilig, C., Bernd, A., Ramirez-Bosca, A., Görmar, F. F., Bereiter-Hahn, J., Keller-Stanislawski, B. and Holzmann, H. (1994). Reactions of human keratinocytes in vitro after application of nicotine. *Skin Pharmacology and Physiology*, *7*(6), 307-315.

429. Kwon, O. S., Chung, J. H., Cho, K. H., Suh, D. H., Park, K. C., Kim, K. H. and Eun, H. E. (1999). Nicotine-enhanced epithelial differentiation in reconstructed human oral mucosa in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology*, 12(4), 227-234.

430. Sayers, N. M., James, J. A., Drucker, D. B. and Blinkhorn, A. S. (1999). Possible potentiation of toxins from Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, and Porphyromonas gingivalis by cotinine. *Journal of Periodontology*, 70(11), 1269-1275.

431. Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J. B., Tangada, S., Hahn, C. L., Schenkein, H. A. and Tew, J. G. (1997). Tobacco and smoking: environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 8(4), 437-460.

432. Bergstrom, J., S. Eliasson, and J. Dock.(2000). Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *Journal Clin Periodontol.* 27(1), 61-8.

433. Takeuchi, Y., Nagasawa, T., Katagiri, S., Kitagawara, S., Kobayashi, H., Koyanagi, T. and Izumi, Y. (2012). Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 83(6), 766-772.

434. Miley, D.D. (2009). Cross-sectional study of vitamin D and calcium supplementation effects on chronic periodontitis. *Journal Periodontol* 80(9), 1433-9.

435. Arabi, A. (2009). Vitamin D receptor gene polymorphisms modulate the skeletal response to vitamin D supplementation in healthy girls. *Bone* 45(6), 1091-7.

436. Bienaime, F. (2011).Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol Cell Endocrinol* 347(1-2), 30-41.

437. Lips, P.(2006). Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92(1), 4-8.

438. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky .(2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol,* 289(1), F8-28.

439. Boggess, K. A., Espinola, J. A., Moss, K., Beck, J., Offenbacher, S. and Camargo Jr, C. A. (2011). Vitamin D status and periodontal disease among pregnant women. *Journal of Periodontology*, 82(2), 195-200.

440. Jabbar, S., Drury, J., Fordham, J., Datta, H. K., Francis, R. M. and Tuck, S. P. (2011). Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *Journal of Periodontal Research*, 46(1), 97-104.

441. Zhou, X., Han, J., Song, Y., Zhang, J. and Wang, Z. (2012). Serum levels of 25-hydroxyvitamin D, oral health and chronic obstructive pulmonary disease.*Journal of Clinical Periodontology*, 39(4), 350-356.

442. Dietrich, T., Garcia, R.I. (2005).Associations between periodontal disease and systemic disease: evaluating the strength of the evidence. *Journal Periodontol* 76(11 Suppl), 2175-84.

443. Bashutski, J. D., Eber, R. M., Kinney, J. S., Benavides, E., Maitra, S., Braun, T. M. and McCauley, L. K. (2011). The impact of vitamin D status on periodontal surgery outcomes. *Journal of Dental Research*, 90(8), 1007-1012.

444. Krall, E.A.(2001). The periodontal-systemic connection: implications for treatment of patients with osteoporosis and periodontal disease. *Ann Periodontol,* 6(1), 209-13.

445. Antonoglou, G. N., Knuuttila, M., Niemelä, O., Raunio, T., Karttunen, R., Vainio, O. and Tervonen, T. (2015). Low serum level of 1, 25 (OH) 2D is associated with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(2), 274-280.

446. Gombart, A. F., O'Kelly, J., Saito, T. and Koeffler, H. P. (2007). Regulation of the CAMP gene by 1, 25 (OH) 2 D 3 in various tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3), 552-557.

447. Schauber, J., Dorschner, R. A., Yamasaki, K., Brouha, B. and Gallo, R. L. (2006). Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*,118(4), 509-519.

448. Hata, T. R., Kotol, P., Jackson, M., Nguyen, M., Paik, A., Udall, D. and Gallo, R. L. (2008). Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*,122(4), 829.

449. Schwalfenberg, G. K. (2011). A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 96-108.

450. Liu, K., Meng, H., Hou, J. (2012). Activity of 25-hydroxylase in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *PloS one*, 7(12), e52053.

451. Gombart, A. F., Bhan, I., Borregaard, N., Tamez, H., Camargo, C. A., Koeffler, H. P. and Thadhani, R. (2009). Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. *Clinical Infectious Diseases*, 48(4), 418-424.

452. Bhan, I. (2011). Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *Journal Allergy Clin Immunol,* 127(5), 1302-4 e1.

453. Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M. and Bartlett, J. G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(5), 657-668.

454. Gordon, Y.J., E.G. Romanowski, and A.M. McDermott .(2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 30(7), 505-15.

455. Raqib, R., Sarker, P., Bergman, P., Ara, G., Lindh, M., Sack, D. A. and Agerberth, B. (2006). Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), 9178-9183.

456. Roelandts, R. (2002). The history of phototherapy: something new under the sun? *Journal Am Acad Dermatol,* 46(6), 926-30.

457. Ala-Houhala, M.J. (2014) Narrow-band ultraviolet B treatment boosts serum 25-hydroxyvitamin D in patients with psoriasis on oral vitamin D supplementation. *Acta Derm Venereol,* 94(2), 146-51.

458. Hancock, R.E., R. Lehrer.(1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol,* 16(2), 82-8.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Raporu

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı

SAYI : B.30.2.ANK.0.21.63.00/824-02/9-8/ 121 /2538 — **05.10.2011**
KONU : Araştırma Hk.

Sayın
Prof. Dr. Gülay TÜTER

Fakültemiz Araştırma Etik Kurulunun 04.10.2011 tarihli toplantısında alınan 21/1 sayılı kararı aşağıya çıkarılmıştır.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim

Doç. Dr. Arzu MÜJDECİ
Dekan V.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU KARARLARI

Karar tarihi : 04.10.2011
Toplantı sayısı ; 21
Karar sayısı : 1

1- Prof. Dr. Gülay TÜTER başkanlığında yürütülecek olan, "Dişeti Olgu Sıvısı (DOS) LL-37 ve Serum Vitamin D_3 Seviyelerinin Sigara İçen ve İçmeyen Kronik Periodontitisli Hastalarda Değerlendirilmesi" konulu araştırmanın, etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Tamer YILMAZ
Başkan

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı
06500 Beşevler / Ankara / Türkiye
Telefon: (0312) 296 55 55 Faks: (0312) 212 39 54
E-Posta:dekanlik@dentistry.ankara.edu.tr Web: http://www.dentistry.ankara.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi için:

Ek-2. Hasta anamnez formu

HASTA ANAMNEZ FORMU

Tarih :……..

Hastanın Adı-Soyadı:

Doğum Tarihi:

Kliniğe Başvuru Nedeni:

Adres:

Telefon: Ev:

İş:

GSM:

Sigara Alışkanlığı: ☐ Hiç sigara kullanmamış

☐ Sigara kullanıp bırakmış

☐ Halen sigara kullanıyor Adet/Gün:

SİSTEMİK ANAMNEZ:

Kalp:

Tansiyon:

Diabet:

Kanama bozukluklarına yol açacak hastalıklar:

Akciğer ile ilgili hastalıklar:

Astım v.b solunum yolu hastalıkları:

Antikoagülan ilaç kullanımı:

Hamilelik, bebek emzirme:

Karaciğer rahatsızlıkları:

Gastrit ya da ülser gibi mide ile ilgili hastalıklar:

Sindirim sistemi ile ilgili hastalıklar:

Psikolojik destek alınması/ ilaç kullanımı:

Ek-2. (devam) Hasta anamnez formu

Hepatit, HIV varlığı:

Daha önce görülen tedaviler ve kullanılan ilaçlar:

DENTAL ANAMNEZ:

Dental Vizit Sıklığı: ☐ Yılda 1 kez

☐ 2 yılda 1 kez

☐ 2 yıldan uzun süredir gelmedim

☐ Sadece ağrı şikayetim olduğunda

☐ Hiçbir zaman

Diş Fırçalama Sıklığı:

Diş ipi Kullanma Sıklığı:

Aşağıdakilerle ilgili bir sorununuz var mı?

☐ Ağız kokusu

☐ Dişetinde kanama

☐ Diş gıcırdatma

☐ Soğuğa hassasiyet

☐ Dişler arasında gıda birikimi

☐ Dişlerde sallanma

☐ Çene eklemlerinde problem

☐ Sıcağa hassasiyet

☐ Tatlıya hassasiyet

☐ Çiğnemede hassasiyet

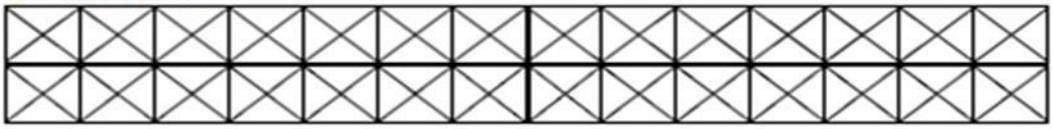
☐ Dişeti büyümesi

Ek-3. Periodontal Klinik İndeks Formu

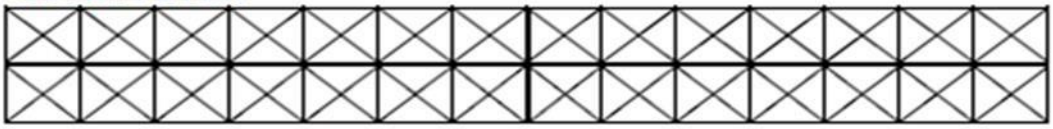
PERİODONTAL İNDEKSLER:

TARİH:
HASTA ADI SOYADI
CİNSİYET:
YAŞ:
TEL:

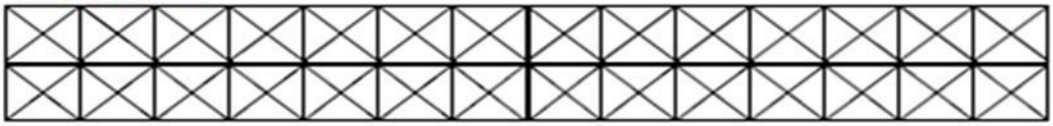
PLAK İNDEKSİ



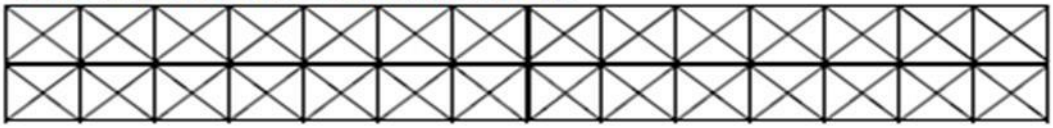
GİNGİVAL İNDEKS



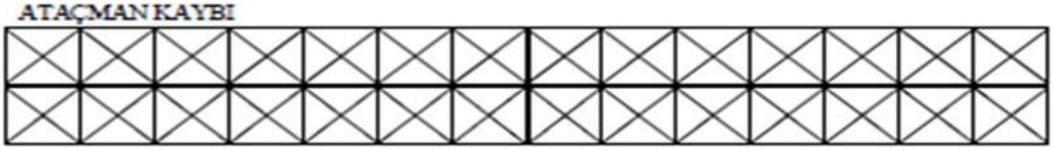
CEP DERİNLİĞİ



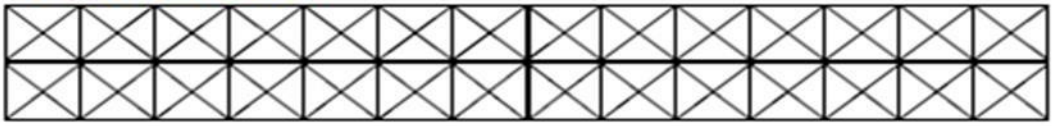
MİNE-SEMENT HUDUDU.....GİNGİVAL KENAR



ATAÇMAN KAYBI



SONDLAMADA KANAMA



Ek-4. Hasta onam formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA ONAM FORMU

Araştırmanın Adı: Dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37, serum vitamin D3 seviyelerinin sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda değerlendirilmesi'

Sorumlu Araştırmacı Adı: Dt.Elifcan KIVRAK

G.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji A.D.'da yürütülmekte olan "Dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37, serum vitamin D3 seviyelerinin sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda değerlendirilmesi" konulu araştırmaya katılmanız istenmektedir.

Bu çalışmada periodontal hastalığı olan ve sağlıklı bireylerde dişetinde antimikrobik etkili savunma peptitler ile vitamin D seviyeleri arasındaki ilişki ve sigara içmenin bunlar üzerindeki etkisini incelemek hedeflenmiştir. Çalışmaya katılacak hastalarımızda, ilk randevuda klinik ölçümler kaydedilecektir. Daha sonra ikinci randevuda dişeti oluğu sıvısı örnekleri özel kağıtlara emdirilerek alınacaktır. Aynı seansta vitamin D tayini için bireylere ait kan örnekleri alınacaktır. Örnek alma işleminin hasta sağlığı açısından herhangi bir sakıncası bulunmamaktadır. Her aşamada elde edilen bilgiler katılımcılar ile paylaşılacaktır. Çalışmaya katılan hastalarımızın örnek alımı sonrasında periodontal tedavi açısından tüm gereksinimleri kliniğimizde karşılanacaktır. Araştırmayı reddetme hakkına sahipsiniz.

Yukarıda tarafıma araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Çalışmanın amacı, uygulanması planlanan tedavi tüm detaylarıyla Dt.Elifcan KIVRAK tarafından anlatıldı, tam olarak bilgilendirildim. Çalışma sırasında ve sonrasında ortaya çıkabilecek istenmeyen sıkıntı ve zararlar belirtildi. Çalışma sırasında, sonrasında ve kontrollerde; röntgen, klinik ölçümler, DOS örnekleri gibi tedavi ile ilgili her türlü kaydın alınabileceği ve kişilik haklarıma saygı göstermek koşuluyla bilimsel olarak kullanılabileceğini karşılıksız olarak kabul ettim.

Ek-4. (Devam) Hasta onam formu

Katılımcı:

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Kıvrak, Elifcan

Uyruğu : T.C

Doğum tarihi ve yeri : 1985, Ankara

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (312) 203 42 45

Faks : 0 (312) 203 42 45

e-mail : dtelfjan85@yahoo.com

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji ABD.	2009-Halen
Lisans	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2003-2008
Lise-Ortaokul	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi- Ankara	1996-2003
İlkokul	Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu Ankara	1991-1996

Yabancı Dil: İngilizce (ÜDS), İspanyolca

Bilimsel Toplantı ve Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 39. Bilimsel Kongresi - 19. Bilimsel Sempozyumu (29-31 Ekim 2009- ANKARA)

SÖZLÜ TEBLİĞ: Farklı periodontal hastalıklara sahip bireylerin dişeti oluğu sıvısı doku tip plazminojen aktivatör, plazminojen aktivatör inhibitör 2, matriks metalloproteinaz 3 ve interlökin 1 beta düzeylerinin değerlendirilmesi- Dt. Utku TOYMAN, Prof.Dr. Gülay TÜTER, Prof.Dr. Bülent KURTİŞ, Prof.Dr. Muhittin SERDAR, Dt. Selin PINAR, Dt. Elifcan KIVRAK, Doç.Dr. Ayşegül ATAK

POSTER BİLDİRİSİ : Periferal Ossifying Fibroma - Dt. Pelin GÖKALP, Dt. Elifcan KIVRAK, Dt. Emre BARIŞ

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 40. Bilimsel Kongresi (14-16 Mayıs 2010- İzmir)

POSTER BİLDİRİSİ: Lignöz Periodontitis : Vaka Sunumu- Prof.Dr.Gülay Tüter, Dt.Elifcan Kıvrak, Yrd.Doç.Dr.Benay Tokman, Dr.Dt.Burcu Sengüven

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 41. Bilimsel Kongresi ve 21. Bilimsel Sempozyumu (20-22 Mayıs 2011- İSTANBUL)

POSTER BİLDİRİSİ: Piyojenik Granülom: Vaka Sunumu- Dt.Elifcan KIVRAK, Dt. Rana Çulhaoğlu, Dt.Emre Barış

- ✓ EUROPERIO 7 kongresi- (7th Conference of The European Federation of Periodontology)- (6-9 Haziran 2012 - Viyana- Avusturya)

POSTER BİLDİRİSİ: Ligneous Periodontitis : A Case Report - Prof.Dr. Gülay Tüter, Dt. Elifcan Kıvrak, Yrd.Doç.Dr. Benay Tokman, Dr.Dt. Burcu Sengüven

POSTER BİLDİRİSİ: Bozkurt S, Kurtiş B. M, Tüter G, Serdar M, Dikmen M , Karakış S , Kıvrak E Comparison of PeriImplant Parameters and PeriImplant Crevicular Fluid Level of Tumor Necrosis Factor Alfa (Tnf-A) in Patients with Type- 2 Diabetes Mellitus and SystemicallyHealthy Subjects Following the Dental Implant Placement

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22.Bilimsel Sempozyumu (8-10 Kasım 2012- ANKARA)

POSTER BİLDİRİSİ: Bir Kronik Periodontitis Vakasının Periodontal Tedavi, İleri Cerrahi Teknikler ve Dental İmplant Uygulamalarıyla Tedavisi: Olgu – Dt. Elifcan KIVRAK, Prof.Dr.Gülay TÜTER

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 43. Bilimsel Kongresi (9-11 Mayıs 2013- İzmir)

SÖZLÜ TEBLİĞ: Dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37 ve serum vitamin D3 seviyelerinin sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda değerlendirilmesi – Dt. Elifcan KIVRAK, Prof.Dr.Gülay TÜTER, Doç.Dr. Muhittin SERDAR, Prof.Dr. Bülent KURTİŞ, Dr.Erdim SERTOĞLU

- ✓ FDI 2013- 101. Dünya Diş Hekimliği Kongresi (28-31 Ağustos 2013- İstanbul)

POSTER BİLDİRİSİ: Evaluation of gingival crevicular fluid (GCF) levels of LL-37 and serum vitamin D3 levels in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis – Dt. Elifcan KIVRAK, Prof.Dr.Gülay TÜTER, Doç.Dr. Muhittin SERDAR, Prof.Dr. Bülent KURTİŞ, Dr. Erdim SERTOĞLU

- ✓ Türk Periodontoloji Derneği 44. Bilimsel Sempozyumu- 09-10 MAYIS 2014- İSTANBUL

Yurtiçi ve Yurtdışı Yayınlar

1- *Evaluation of gingival crevicular fluid levels of tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 2, matrix metalloproteinase-3 and interleukin 1-β in patients with different periodontal diseases.* Toyman U, Tüter G, Kurtiş B, Kıvrak E, Bozkurt Ş, Yücel AA, Serdar M.J Periodontal Res. 2015 Feb;50(1):44-51

2- *Ligneous periodontitis and different, but failed, treatment approaches : A case report with six years follow-up*. Tuter G, Kıvrak E, Tokman B.- Yayına hazırlık aşamasındadır.

Bilimsel Araştırma Projeleri

1- Dişeti oluğu sıvısı (DOS) LL-37 ve serum vitamin D_3 seviyelerinin sigara içen ve içmeyen kronik periodontitisli hastalarda değerlendirilmesi- BAP Projesi-(2011)- (Araştırmacı)
2- Tip 2 diabetli ve sistemik sağlıklı bireylerde uygulanan kemik içi dental implantlarda peri-implant oluk sıvısı (PIOS) Interlökin-1beta (IL-1β) ve Tümor Nekroz Faktör-alfa (TNF-α) ve peri-implant doku parametrelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi-(2013)-(Araştırmacı)
3- Peri-implant oluk sıvısı IL-1β ve kemik alkalen fosfataz (BALP) seviyelerinin sigara içen ve içmeyen hastalarda değerlendirilmesi- (2013)-(Araştırmacı)



GAZİ GELECEKTİR..

