

AGRESİF PERİODONTİTİSLİ BİREYLERDE NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B AKTİVASYONUN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ: STEREOLOJİK ÇALIŞMA

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B ACTIVATION IN INDIVIDUALS WITH AGGRESSIVE PERIODONTITIS: STEREOLOGIC STUDY

Yard. Doç. Dr. Taner ARABACI*

Doç. Dr. Yasin ÇİÇEK*

Uzm. Mevlüt ALBAYRAK**

Arş. Gör. Osman Nuri KELEŞ***

Makale Kodu/Article code: 170

Makale Gönderilme tarihi: 17.03.2010

Kabul Tarihi: 12.05.2010

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; agresif periodontitisi bireylerin diş eti dokularında Nükleer Faktör kapa B (NF- κ B) proteinlerinden p50 ve p65 alt ünitelerinin çekirdek ve sitoplazmik ekspresyonunun ve NF- κ B inhibitörü olan İnhibitör kapa B'nin (I κ B) sitoplazmik ekspresyonunun immunohistokimyasal ve stereolojik olarak araştırılmasıdır.

Çalışma popülasyonunu, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine 2006-2007 yılları arasında değişik nedenlerle müracaat eden 30 birey (15'i agresif periodontitisi ve 15'i periodontal olarak sağlıklı) oluşturdu. Tüm bireylerden lokal anestezi altında dişlerin bukkal dişeti bölgesinden biyopsi ile 1-2 mm diş eti dokusu alındı. Alınan dişeti dokuları hemen % 10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde konuldu ve sonra immunohistokimyasal boyamaya gönderildi. Elde edilen kesitler elektron mikroskobu altında incelendi ve stereolojik yöntem kullanılarak boyanan hücre sayısal değerleri hesaplandı. Grupların birbirleri ile karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi ve Çoklu karşılaştırmalı en küçük önemli fark (LSD) testi ($p=0.05$) kullanıldı.

Çalışma sonuçlarına göre p50 ve p65 ile hem çekirdek hem de sitoplazmada pozitif boyanan hücre sayısı açısından agresif periodontitis grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.01$). Bunun yanı sıra agresif periodontitisi grupta tüm immunohistokimyasal bulgular ile klinik skorlar (Sondalanabilir cep derinliği ve klinik ataşman seviyesi) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi.

Sonuç olarak, NF- κ B aktivasyonu agresif periodontitisi bireylerde oldukça anlamlı bulunmuştur. Bu çalışma periodontitisin ilerleyişini önlemek için NF κ B inhibisyonunda kullanılmak üzere spesifik inhibitörlerin üretileceği gelecek stratejilere temel oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Agresif periodontitis, nükleer faktör-kappa B, stereoloji

ABSTRACT

The purpose of this study was immunohistochemical and stereologic investigation of nuclear and cytoplasmic expression of p50 and p65 subunits of Nuclear Factor kapa B (NF- κ B) and the cytoplasmic expression of Inhibitor kapa B (I κ B), the inhibitor of NF- κ B, in the gingival tissues of subjects with aggressive periodontitis.

The study population was consisted of 30 individuals (15 aggressive periodontitis and 15 control) which were referred with different complaints to Ataturk University, Faculty of Dentistry between 2006 and 2007 years. 1 to 2 mm of gingival tissue was biopsied from the buccal side of the teeth of all individuals. Tissues were immediately transferred to 10% neutral buffered formalin and were then sent to immunohistochemical staining. The sections were examined under electron microscope and the numerical values of the stained cells were computed using stereologic method. One-way analysis of variance (ANOVA) and Multiple Range least significant difference (LSD) was used for intergroup comparison ($p=0.05$).

According to the findings of this study, statistically significant differences were found in the number of cytoplasmic and nuclear positive stained cells with p65 and p50 in aggressive periodontitis group compared to control group ($p<0.01$). However, statistically significant positive correlations were found between laboratory findings and clinical scores (probing depth and clinical attachment level) in aggressive periodontitis group.

In conclusion, it was found that NF- κ B activation was highly important in patients with aggressive periodontitis. The present study forms the basis for future strategies that will generate specific inhibitors for using NF- κ B inhibition to prevent the progressing of periodontitis.

Keywords: Aggressive periodontitis, nuclear factor-kappa B, stereology

* Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji AD, Erzurum, Türkiye

** Atatürk Üniversitesi TIP Fakültesi, Patoloji AD, Erzurum, Türkiye

*** Atatürk Üniversitesi TIP Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Erzurum, Türkiye



GİRİŞ

Agresif periodontitis (AgP) farklı klinik, radyografik ve laboratuvar bulgularıyla açıkça teşhis edilebilen spesifik bir periodontal hastalıktır.¹⁻⁴ Özellikle hızlı ataşman kaybı ve kemik yıkımı, ailesel yatkınlık, Aa'nın (Aggregatibacter actinomycetemcomitans) sayıca fazla olması, fagositoz bozukluğu ve artmış makrofaj cevabı gibi bulgularla karakterizedir.^{5,6} Mikrobiyal dental plak ve periodontal yıkımın birbiri ile uyumlu olmayışı da agresif periodontitisli bireylerde dikkat çekici bir özelliktir.¹ Hastalığın ilerlemesinde patojenik bakteriler primer etiyolojik ajanlar olarak bilirse de, konak doku cevabının genetik özellikler ve çevresel risk faktörlerine bağlı olarak etkilenmesi de önemli bir unsurdur.⁷

Bir çok iltihabi hastalıkta olduğu gibi agresif periodontitiste de genetik ve çevresel faktörlerin birbirleriyle olan ilişkileri hastalık patogeneğinde önemli rol alır. Özellikle genlere spesifik transkripsiyon faktörleri genetik ve çevresel faktörlerle ilişkili olarak konak enflamatuvar cevabında önemli rol almaktadırlar.⁸ Bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör-kappa B (NF- κ B) enfeksiyona karşı hem doğal ve kazanılmış immun cevapta hem de enflamatuvar cevapta çok çeşitli gen ekspresyonunun koordine edilmesinde anahtar rol oynayan bir moleküldür.^{9,10} Nükleer Faktör kappa B, ilk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından B lenfositlerin gelişimini module eden transkripsiyon faktörlerinin araştırılması sırasında immünglobulin kappa hafif zincir genindeki, genin transkripsiyonunu artıran regülatör DNA dizisine bağlanan bir nükleo-protein olarak keşfedilmiştir.¹¹ Rel ailesi diye adlandırılan bir grup proteinin üyesi olan NF- κ B dimerik proteinler şeklinde DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktör kompleksleridir. Memelilerde NF- κ B ailesi NF- κ B1 (p50=p105), NF- κ B2 (p52=p100), RelA (p65), RelB ve cRel olmak üzere 5 grup alt ünitelerden ibarettir.⁸ Aktif NF- κ B bu proteinlerin homodimer veya heterodimer kompleksler şeklinde bir araya gelmesiyle oluşur.¹² NF- κ B'nin asıl aktif formu, p65 alt ünitesinin p50 ya da p52 alt üniteleri ile oluşturduğu heterodimer yapısıdır.¹³ p50 ve p65 proteinleri tanımlanan ilk NF- κ B proteinleri olup oluşturdukları p50/p65 kompleksi çeşitli hücre tiplerinde en fazla görülen tiptir.

NF- κ B molekülleri bakteri ve virüsler gibi patojenler, büyüme faktörleri, kemoterapotik ajanlar, iyonize radyasyon, interlökinler, lipopolisakaritler

(LPS), immunoglobulinler, reaktif oksijen türleri ile psikolojik, fizyolojik ve oksidatif farklı stres uyaranlarını içine alan çok geniş kitlede ekstraselüler uyaranlara karşı oluşacak cevapta hızlı bir şekilde aktive edilirler.^{14,15} NF- κ B'nin nükleer translokasyonu ve aktivasyonu özellikle pro-enflamatuvar genlerin transkripsiyonunu indüklediği için enflamasyonda merkezi bir rol oynar.^{16,17}

Periodonsiyumun yıkımında, lipopolisakaritler ve endotoksinler gibi bakteriyel ürünlere verilen cevapta konak doku monosit ve makrofajlarından salgılanan iltihabi sitokinlerin oldukça önemli olduğunu gösteren deliller vardır.¹⁸⁻²¹ NF- κ B tarafından regüle edilen çoğu genin periodontal hastalığın ilerleyişini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir.²² Bununla birlikte, son dönemlerde NF- κ B'nin direk veya indirek yoldan bazı iltihabi sitokinlerin üretimini etkileyerek periodontal hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceği de belirtilmiştir.^{23,24} Bu nedenle bu çalışmada agresif periodontitisli ve periodontal olarak sağlıklı hastaların diş eti dokularındaki NF- κ B ünitelerinin aktivasyonlarının araştırılması amaçlandı. Bu amaçla sağlıklı ve hastalıklı gruplarda NF- κ B proteinlerinden p50 ve p65 komplekslerinin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu ve NF- κ B'nin inhibitörü olan (İnhibitör kappa B) I κ B'nin sitoplazmik ekspresyonu immunohistokimyasal ve stereolojik olarak incelenerek değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Seçimi

Çalışma popülasyonunu, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine 2006-2007 yılları arasında değişik nedenlerle müracaat eden 18-37 yaş arası 30 birey (15'i agresif periodontitisli ve 15'i periodontal olarak sağlıklı) oluşturdu. Çalışmaya herhangi bir sistemik hastalığı olan, sigara kullanan ve son 6 ay içinde medikal veya periodontal tedavi alan hastalar dahil edilmedi. Araştırmaya katılan tüm bireylere çalışmanın yöntem ve amacı hakkında sözlü ve yazılı bilgi verildikten sonra katılım için onamları alındı.

Klinik ve Radyografik Değerlendirme

Öncelikle araştırma kapsamına alınan tüm bireylerin klinik muayeneleri yapıldı. Klinik muayenede her bir bireyin periodontal durumunu saptamak amacıyla Silness ve Loe'nin Plak İndeksi (Pİ)²⁵, Loe ve Silness'in Gingival İndeksi (Gİ)²⁶ kullanıldı. Ayrıca her



bir hasta için klinik ataşman seviyesi (KAS) ve sondalanabilir cep derinliği (SD) değerleri kayıt altına alındı. Ayrıca tüm hastalardan teşhis amacıyla panoramik radyografiler alındı. Radyografide alveoler kemik yıkımı varlığı ve şekli, dişlerin durumları ve patolojik durumlar değerlendirildi.

Dişeti Dokusu Örneklerinin Toplanması

Araştırmaya katılan bireylerden lokal anestezi altında dişlerin bukkal dişeti bölgesinden 1–2 mm diş eti dokusu alındı. Biyopsiler hastalıklı gruplarda klinik olarak hastalığın teşhis edilebildiği bölgelerden alınmıştır. Biyopsi işlemi kontrol grubunda (I. Grup) periodontal problemler dışında çekimi gereken dişlerin çekimleri esnasında gerçekleştirilirken, agresif periodontitisli grupta (II. Grup) periodontal problemlere bağlı çekimi gereken dişlerin çekimleri esnasında gerçekleştirildi. Diş eti dokuları alındıktan sonra hemen % 10'luk nötral tamponlu formalin içine konuldu ve çalışmanın geri kalan kısmı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Histolojik İşlemler

Alınan dokular dereceli alkol serilerinde (Pelco) dehidratasyona tabi tutulduktan sonra ksilen serileri (Merc) ile muamele edilerek şeffaflaştırma işlemi yapıldı. 10 mikron kalınlığında kesitler alındıktan sonra 70 °C de 15 dakika inkübe edildi. Bütün kesitler dereceli ksilen serilerinden geçirilerek deparafinize edildikten sonra alkolle dehidrate edilip distile suyla çalkalandı. Antijen retrieval işleminden sonra kesitler % 3 lük H₂O₂ ile inkübe edildi. Kesitler PBS (Phosphate-Buffered-Saline (PBS/ pH=7.4)) ile yıkandıktan sonra elde edilen üç farklı kesite p65 (1:50), p50 (1:150) ve IκBα (1:50) primer antikorları (DAKO, Glostrup, Danimarka) damlatıldı. İmmunohistokimyasal boyama işlemi için sırasıyla sekonder antikor, Streptoavidin peroksidase ve DAB+chromogen damlatıldı.

Stereolojik İşlemler

Bu çalışmada kesitler üzerinde epitelyum ve bağ dokusunda boyanan hücre sayısal değerleri stereolojik metotlardan birisi olan *optik parçalama* ile *optik disektör* kombinasyonu kullanarak mikroskopik olarak hesaplandı. Optik parçalama ve optik disektör metodu doku veya organların boyanmış hücre, çekirdek gibi yapılarının sayısal değerlerini hesaplamak için kullanılan bir metottur.²⁷ Bu çalışmada, optik

parçalama metodu ile sayım hesaplaması yapılan optik disektörler içeren özel bir yazılım olan Stereo- Investigator (sürüm 6.0, Microbrightfield, Colchester, VT) kullanıldı. Stereolojik işlemde, dokular üzerinde boyanan hücrelerin sayımı Sistematik Rastgele Örnekleme (SRÖ) metodu ile yapıldı. Sistematik rasgele örneklemenin temel özelliği, incelenecek olan yapıdan örnekler almanın gerekli olduğu durumlarda, alınan örneklerin yapının tamamını temsil ediyor olmasıdır. SRÖ, pilot bir çalışmayla belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlanarak, ilgilenilen yapının tamamının etkin bir şekilde örneklenmesini içerir. Örneklemenin sistematik kısmını, pilot çalışmayla belirlenen örnekleme aralığı, örneklemenin rasgelelik özelliğini ise ilk aralık içinde rasgele bir noktadan başlanması oluşturmaktadır. İstatistiksel açıdan, bu tip bir örneklemede, yapının üzerinde örnekleme sayısı ne kadar artarsa gerçek değere o kadar yaklaştığı için homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansı da o kadar artar.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS® 13,0 for Windows® programı ile yapıldı. Gruplar arası klinik bulguların kıyaslanmasında Student-*t* testi kullanıldı. Stereolojik bulguların değerlendirilmesinde ise grupların birbirleri ile karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi ve Çoklu karşılaştırmalı en küçük önemli fark (LSD) testi ($p=0.05$) kullanıldı.

BULGULAR

Grup I'e dahil edilen yaşları 18-32 arasında değişen 15 bireyin (9'u bayan, 6'sı erkek) yaş ortalamaları 28.87±4.77 idi. Grup II'de 24-37 yaş aralığındaki 15 hastanın (8'i bayan, 7'si erkek) yaş ortalamaları 30.93±4.36 idi.

Araştırmamızda elde edilen bulgular hem klinik hem de laboratuvar verileri bakımından incelenmiştir. Ayrıca bu bulgular gruplar arasında karşılaştırılmalı olarak da değerlendirilmiştir.

Klinik Bulgular

Hastalıklı ve sağlıklı gruplardan elde edilen Pİ, Gİ ve SD gibi klinik parametreler ve bunların gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmaları Tablo I'de verilmiştir. Ortalama Pİ Grup I'de 0.31±0.15 iken

Grup II'de 2.63 ± 0.33 olarak saptanmıştır. Plak indeksi gruplar arasında değerlendirildiğinde Grup I ile Grup II arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.001$). Ortalama Gİ değerleri Grup I'de $0,26 \pm 0,08$ iken Grup II'de $2,26 \pm 0,47$ olarak saptandı. Gingival indeks gruplar arasında değerlendirildiğinde Grup I ile Grup II arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.001$). SD değerlendirmesinde, ortalama cep derinliği Grup I'de 1.23 ± 0.26 mm ve Grup II'de 5.49 ± 1.39 mm olarak bulunurken, gruplar arası fark istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ($p < 0.01$). KAS değerlendirildiğinde Grup II'de 5.32 ± 1.36 mm'lik ortalama bir ataşman kaybı saptandı. Grup I ile Grup II arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

Tablo I. Agresif periodontitis ve kontrol grubu hastalarının Pİ, Gİ, KAS ve SD ortalama değerleri ve istatistiksel karşılaştırmaları

Klinik parametre	Sağlıklı (I.Grup) $\bar{X} \pm SS$	Agresif periodontitis (II.Grup) $\bar{X} \pm SS$	p değeri
Pİ	$0,31 \pm 0,15^a$	$2,63 \pm 0,33^b$	$p < 0.001$
Gİ	$0,26 \pm 0,08^a$	$2,26 \pm 0,47^b$	$p < 0.001$
SD	$1,23 \pm 0,26^a$	$5,49 \pm 1,39^b$	$p < 0.001$
KAS	0.00 ± 0.00^a	$5,32 \pm 1,36^b$	$p < 0.001$

> 0.05 istatistiksel olarak önemsiz
** < 0.01 istatistiksel olarak çok önemli
*** < 0.001 istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli
Her bir satırdaki farklı harf istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

İmmunohistokimyasal Bulgular

Grupların stereolojik olarak incelenmesinde NF- κ B alt üniteleri p50 ve p65 ile sitoplazmik ve çekirdek boyanma gösteren ve I κ B ile sitoplazmik boyanma gösteren hücre sayısal değerleri Tablo II ve Şekil 1'de belirtildi. LSD çoklu karşılaştırma testine göre p50 ve p65 ile hem çekirdek hem de sitoplazmada pozitif boyanan hücre sayısal değerleri açısından Grup I ve Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlıydı ($p < 0.01$). LSD çoklu karşılaştırma testine göre I κ B ile sitoplazmik pozitif boyanan hücre sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$).

Tablo II. Sağlıklı ve agresif periodontitisli kişilere ait dişeti dokularında p65 ve p50 alt ünitelerinin çekirdek ve sitoplazma aktivasyonu ile I κ B'nin sitoplazma aktivasyonunu gösteren hücre sayısal değerleri ve tanımsal istatistiksel verileri

	PI	GI	SD	KAS
	--	--	0.885**	0.928**
Sit-p50	--	--	0.501*	0.577*
Çek-p50	--	--	0.718**	0.765**
Sit-p65	--	--	0.591*	0.625*
Çek-p65	--	--	0.774**	0.861**
I κ B				

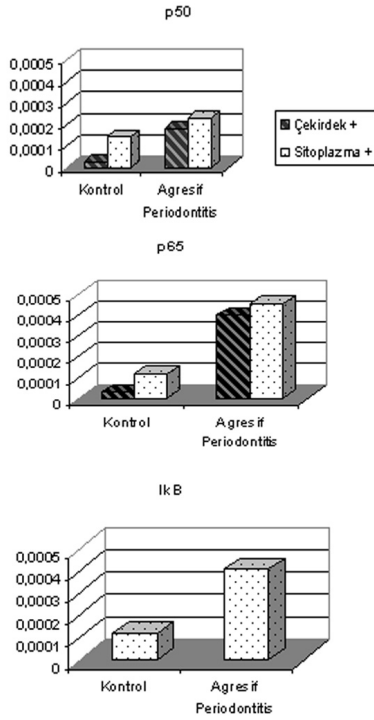
> 0.05 istatistiksel olarak önemsiz
** < 0.01 istatistiksel olarak çok önemli
*** < 0.001 istatistiksel olarak ileri düzeyde önemli
Her bir satırdaki farklı harf istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

Grup II'de laboratuvar bulguları ile klinik parametreler arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon katsayıları ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo III'de verilmiştir. Bu verilere göre p50, p65 ve I κ B boyanmaları ile edilen immunohistokimyasal bulgular ile SD ve KAS arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edildi ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Diğer korelasyonların istatistiksel olarak anlamsız olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tablo III. Agresif periodontitisli grupta laboratuvar bulguları ile klinik parametreler arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon katsayıları

	Ortalama Boyanan Hücre Sayısı		p değeri	
	Grup I	Grup II		
p65	Çekirdek	$0,00003^a$	$0,00040^b$	$p < 0.01$
	Sitoplazma	$0,00012^a$	$0,00046^b$	$p < 0.01$
p50	Çekirdek	$0,00003^a$	$0,00018^b$	$p < 0.01$
	Sitoplazma	$0,00014^a$	$0,00023^b$	$p < 0.01$
I κ B	Sitoplazma	$0,00012^a$	$0,00041^b$	$p < 0.001$

>0.05 istatistiksel olarak anlamsız
* < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı
** < 0.01 istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı



Şekil 1. Agresif periodontitisli ve kontrol gruplarında p65 ve p50 alt ünitelerinin çekirdek ve sitoplazma aktivasyonu ile IκB'nin sitoplazma aktivasyonunu gösteren hücre sayısal yoğunluk değerleri

TARTIŞMA

AgP gençlerde ve genç erişkinlerde görülen, hızla ilerleyerek erken yaşta fonksiyon, ataşman ve estetik kaybına neden olan iltihabi ve yıkıcı bir periodontal hastalıktır.²⁸ AgP'li bireylerde sistemik faktörler, immün defektler, genetik farklılıklar ve mikrobiyal flora gibi kompleks faktörler hastalığın oluşumunda birlikte rol oynayarak hastalığın şiddetini ve tedaviye verilen cevabı etkiler.^{2,3} Doku yıkımının şiddeti, ilerleme hızı, tedaviye yanıt ile etiyolojik ve genetik yatkınlık kriterleri açısından diğer periodontal hastalıklardan önemli farklılıklar izlenir.⁴ Agresif periodontitisin etiyolojisi ve patogenezinde diğer periodontal hastalıklarda olduğu gibi bakteri-konak etkileşimi çok önemli rol oynar. Konak savunma sistemi çeşitli ekzojen ve endojen etkenler ile savaşmak için hücreler ve mediyatörleri kullanan kompleks bir sistemdir. Konak bu savunmayı doğal ve kazanılmış immün yanıt mekanizmaları ile gerçekleştirir.²⁹ Diğer kronik enflamatuar hastalıklarda olduğu gibi periodontitiste de konak cevabıyla ilişkili moleküler değişiklikler hakkındaki bilginin çok az olmasından dolayı hastalığın

asıl etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu yüzden son dönemlerdeki çalışmalar mikroorganizmaların neden olduğu asıl yıkımdan çok hastalığın patogenezinde konak cevabının rolünü açığa kavuşturmaya yöneliktir.³⁰

Bir çok hastalığın başlaması ve ilerlemesinde hücrel gen aktivasyonlarının ve ekspresyonlarının önemli rol oynadığı iddia edilmiştir.³¹⁻³³ Fizyolojik ortamda durağan olan veya minimal aktivite gösteren bu genler patolojik durumlarda hastalık patogenezinin başlaması veya ilerlemesi için gerekli olan mekanizmaların tetiklendiği aşırı aktivite gösterirler.³⁴ Özellikle immün ve enflamatuar cevaplarda birçok genin ekspresyonu NF-κB tarafından düzenlenir. Bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB enfeksiyona karşı hem hücrel hem de humoral seviyede faaliyet göstererek konak dokuda yıkıma neden olabilecek enflamatuar cevabın aktivasyonunda rol alabilen bir moleküldür.³⁰ NF-κB, direk veya indirek yoldan Tümör Nekrotizan Faktör-α (TNFα), İnterlökin 1β (IL-1β) gibi bazı iltihabi sitokinlerin ve periodontal doku yıkımından sorumlu olduğu bilinen matris metallo proteinazlar (MMP) gibi proteinazların üretimini etkileyerek periodontal hastalıkların patogenezinde rol oynayabilir.^{23,34}

Bu çalışmada agresif periodontitisli hastaların dişeti dokusunda NF-κB proteinlerinden p50 ve p65 alt ünitelerinin çekirdek ve sitoplazmadaki aktivasyonlarının incelenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda periodontal olarak sağlıklı bireyler ve agresif periodontitisli hastalardan dişeti dokusu örnekleri toplandı. Çalışmaya katılan tüm bireylerin sigara ve alkol gibi zararlı alışkanlıklar ve sistemik problemler gibi NF-κB aktivasyonunu etkileyen faktörlerden bağımsız olmasına dikkat edildi. Bahsettiğimiz gibi dokularda en çok görülen NF-κB kompleksi p50 ve p65 alt ünitelerinin oluşturduğu heterodimer kompleksi olup bu kompleksin inhibisyonunda en önemli rolü alan IκB proteini IκBα'dır. Bu nedenle çalışmamızda farklı hastalık gruplarına ait dişeti dokularında p50 ve p65 alt ünitelerinin çekirdek ve sitoplazmik ekspresyonu ile IκBα'nın sitoplazmik ekspresyonu incelendi.

Yaptığımız literatür taramalarına göre, bu immünohistokimyasal çalışma periodontal hastalıklarda ve diğer tıp alanlarında NF-κB'nin rolünü incelemeyi amaçlayan ilk stereolojik çalışmadır. Bilimsel çalışmalarda tarafsızlık ve etkinlik oldukça önemlidir. Stereolojide kullanılan SRÖ stratejisi etkinlik ve tarafsızlık prensibine dayanmaktadır. Bu nedenle

çalışmamızda yaptığımız incelemelerin sonucunda tarafsız veriler elde edebilmemiz için stereoloji yöntemi kullanıldı.

Yapılan incelemelerde p50, p65 ve IκB sitoplazmik pozitif boyanan hücre sayısal değerleri hastalıklı grupta kontrol grubundan daha fazla izlenmiştir. Grup II'de Grup I'e kıyasla p65 ile çekirdek pozitif boyanma gösteren hücre sayısında istatistiksel olarak tespit edilen artışın, bu hastalığın klinik seyri açısından kontrol grubuyla arasındaki farkla uyumlu olması oldukça anlamlıydı. Bu sonuç p65 alt ünitelerinin periodontitiste daha fazla çekirdeğe geçtiğinin dolayısıyla aktive olduğunun açık bir göstergesidir. p50 boyamalarında gruplar arasında ortaya çıkan farklılık NF-κB kompleksinin diğer parçası olan p65 ile paralel sonuç göstermesi bu iki alt ünitenin aktivasyon süreçlerinin birlikte yürümesinden dolayı oldukça anlamlı bir veri olarak göze çarpmaktadır.

Belirtildiği gibi NF-κB çekirdeğe geçince aktif hale gelir ve transkripsiyon işlemi başlatılır. NF-κB'nin aktif hale geçebilmesi için çeşitli çevresel uyarıların oluşması gereklidir. Bu uyarıların en önemlileri LPS, TNF-α ve IL-1β'dir. Yapılan çalışmalarda NF-κB'nin aktivasyonunda önemi kanıtlanmış diğer bir faktör olan RANKL proteinlerinin TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi uyarılarla sürekli bir tetikleyici döngü içerisinde olduğu ve RANKL aracılıklı osteoklastogenezin enflamatuar kemik yıkımında öncülük ettiği belirtilmiştir.^{32-34,35} Kawai ve arkadaşları³⁴ hastalıklı dişeti dokularında RANKL ve IL-1β konsantrasyonlarının önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. Yapılan birçok çalışmada yıkım lezyonu oluşan periodontitis vakalarında bol miktarda bulunduğu ispatlanmış bu moleküllerin NF-κB'nin güçlü aktivatörleri olduğu belirtilmiştir.^{36,38,39}

Bilindiği üzere Aa agresif periodontitis gruplarında yoğun olarak bulunan bir etiyolojik ajandır ve literatürde B lenfositlerde RANKL ekspresyonunun Aa'ya ait spesifik antijenler tarafından düzenlendiği bildirilmektedir.⁴⁰ RANKL NF-κB'yi aktive ederek çekirdeğe geçmesini sağladığı için hücrelerde IL-6, IL-1β ve TNF-α gibi enflamatuar sitokinleri artırarak osteoblast kaynaklı veya osteoblast kaynaklı olmadan osteoklastların olgunlaşmasını sağlayarak kemik rezorpsiyonuna sebep olur.^{36,39} Yukarıdaki varsayımlarımıza göre, agresif periodontitiste meydana gelen kemik yıkımının kronik periodontitisten daha hızlı olmasında artmış RANKL ekspresyonunun NF-κB'yi aktif hale

geçirerek osteoklast olgunlaşmasını hızlandırmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Son dönemlerde yapılan çalışmalar NF-κB'nin aktivasyonunu inhibe etmek üzere NF-κB inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelmiştir.^{41,43} Periodontitisli hastalara verilen nonsteroid antiinflamatuar ilaçları da içine alan pek çok antiinflamatuar ajanlar, glukokortikoidler ile curcumin, yeşil çay polifenol gibi doğal ajanlar birer NF-κB inhibitörü olmalarına rağmen olayın gerçek moleküler mekanizmasıyla ilgili görüş ayrılıkları vardır.^{42,44} Bu tip ajanların etkilerinin spesifik olmadığı ve uzun süre kullanımlarının da immün sistemin baskılanması gibi yan etkiler oluşturabileceği düşünülmektedir. Periodontal hastalıkların tedavisinde mekanik temizliğin önemi her ne kadar küçümsenemez olsa da, tedavi aynı zamanda konak doku cevabını değiştirmeye yönelik olmalıdır. Son zamanlarda NBD-peptit, IκBa süper repressör gibi spesifik NF-κB inhibitörleri geliştirilmektedir.⁴⁵ Bunların romatoid artrit, iltihabi bağırsak hastalıkları gibi kronik iltihabi hastalıklarda etkin olduğu ispatlanmıştır.⁴³ Anti-NF-κB terapilerinin öne sürülen en önemli avantajı, birçok enflamatuar medyatörün ekspresyonlarının eş zamanlı olarak inhibe edilebilir olmasıdır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, periodontal hastalıklarda NF-κB nötralizasyonu ile etkili tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği fikrini öne sürmekte ve hastalığın ilerleyişini önlemede spesifik inhibitörlerin üretilmesinde gelecek stratejilere temel oluşturmaktadır. Periodontal hastalıklarda NF-κB sinyal iletim mekanizmalarının anlaşılması ve spesifik NF-κB inhibitörlerinin yararlılığının tanımlanmasında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulacaktır.

KAYNAKLAR

1. American Academy of Periodontology: Parameter on aggressive periodontitis. J Periodontol., 2000; 71 (Suppl.): 867-869.
2. Barrington EP, Nevins M. Diagnosing periodontal diseases. J Am Dent Assoc 1990; 121: 460-464.
3. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Ann Periodontol 1999; 4: 39-52.
4. American Academy of Periodontology. The new classification for periodontal disease and conditions. Ann Periodontol 1999; 4: 1-108.
5. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 1997; 14: 12-32.



6. Daniel MA, Van Dyke TE. Alterations in phagocyte function and periodontal infection. *J Periodontol* 1996; 67: 1070-1075.
7. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000 2007; 43: 102-132.
8. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immun system. *Nature Reviews* 2002; 2: 725- 735.
9. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 9: 2723-2735.
10. Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science* 2006; 90: 519-531.
11. Sen R, Baltimore D. Inducibility of immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47: 921-928.
12. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
13. Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF- κ B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1999; 290: 297-308.
14. Yıldız OG, Soyuer S, Soyuer I, Uçar K, Gundoğ M, Kaplan B, Özkan M. Gastrektomi sonrası adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide karsinomlu olgularda NF- κ B'nin prognostik önemi. *Türk Onkoloji Dergisi* 2007; 22: 69-73.
15. Imler JL, Hoffmann JA. Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors family signaling infection. *Rev. Immunogenet.* 2000; 2: 294-304.
16. Ghosh S, May MJ, Koop EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260.
17. Barnes PJ, Karin M. NF- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
18. Celancy RM, Amin AR, Abromson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis&Rheumatism* 1998; 41:1141-1151.
19. Informational paper. Modulation of host response in periodontal therapy. *J Periodontol* 2002; 73:460-470.
20. Ataoğlu H, Alptekin NO, Haliloğlu S, Gürsel M, Ataoğlu T, Serpek B, Durmuş E. Interleukin 1 β , tumor necrosis factor- α levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 470-476.
21. Erdemir EO, Duran I, Haliloğlu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 99-104.
22. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.
23. Milward MR, Chapple ILC, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB, Cooper PR. Differential activation of NF- κ B and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clinical and Experimental immunology* 2007; 148: 307-324.
24. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Jhonson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366: 1809-1820.
25. Sillness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation of between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964; 22: 121-135.
26. Löe H, Sillness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalance and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963; 21: 531-551.
27. West MJ. The new stereological tools: Disector, Fractionator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 1988; 96: 857-881.
28. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Consensus report on aggressive periodontitis. *Ann. Periodontol.*, 4: 53, 1999.
29. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol.* 2000 1999; 20: 239-288.
30. Ambili R, Santhi WS, Janam P, Nandakumar K, Pillai RM. Expression of activated transcription factor Nuclear Factor- κ B in periodontally diseased tissues. *J Periodontol* 2005; 76: 1148-1153.



31. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. Philadelphia London New York St Louis Sydney Toronto: W.B Saunders Company, 2002: 398-402.
32. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. Ann Periodontol 1999; 4: 1-6.
33. Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol 1999; 4: 32-37.
34. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase- 8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. J Clin Periodontol 2000; 27: 366-369.
35. Vis M, Havaardsholm EA, Haugeberg G, Uhlig T, Voskuyl AE, van de Stadt RJ, Dijkmans BAC, Woolf AD, Kvien TK, Lems WF. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2006; 65: 1495-1499.
36. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine & Growth Factor Reviews 2004; 15: 49-60.
37. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CWO, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. The American Journal of Pathology 2006; 169: 987-998.
38. Ferrer I, Marti E, Lopez E, Tortosa A. NF-kB immunoreactivity is observed in association with β A4 diffuse plaques in patients with Alzheimer's disease. Neuropathology and Applied Neurobiology 1998; 24: 271-277.
39. Aggarwal BB. Nuclear factor-kB: The enemy within. Cancer Cell 2004; 6: 203-208.
40. Belibasakis G.N., Johansson A., Wang Y, Chen C, Lagergard T, Kalfas S, Lerner U.H. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin. Cytokine 2005; 30: 56-63.
41. Epinat JC, Gilmore TD. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kB signal transduction pathway. Oncogene 1999; 18: 6896-6909.
42. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . Nature 1998; 396: 77-80.
43. Makarov S. NF-kB as a therapeutic target in chronic inflammation: Recent advances. Mol Med Today 2000; 6: 441-448.
44. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study. J Periodont Res 2002; 37: 433-438.
45. May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappa B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I kappa B kinase complex. Science 2000; 289: 1550-1554.

Yazışma Adresi

Arş. Gör. Dt. Taner ARABACI
Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
25240, Erzurum, Turkey.
Fax: +90 442 2360945
E-mail: t-arabaci@hotmail.com

