

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**DİŞ ÇEKİMİ SONRASI ÇEKİM SOKETLERİNDE TREPONEMA
DENTİCOLA VE PORPHYROMONAS GİNGİVALİS BAKTERİ
TÜRLERİNİN PZR ANALİZİ İLE İNCELENEREK KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dt. Ali Mert ARIK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Derviş YILMAZ

ANKARA

Temmuz 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**DİŞ ÇEKİMİ SONRASI ÇEKİM SOKETLERİNDE TREPONEMA
DENTİCOLA VE PORPHYROMONAS GİNGİVALİS BAKTERİ
TÜRLERİNİN PZR ANALİZİ İLE İNCELENEREK KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dt. Ali Mert ARIK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Derviş YILMAZ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
03/2008-02 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Temmuz 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 07/07/2010

**İmza
Prof.Dr. Derviş YILMAZ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**İmza
Prof.Dr. Nadir GÜNGÖR
Gazi Üniversitesi**

**İmza
Prof.Dr. Nedim SULTAN
Gazi Üniversitesi**

**İmza
Prof.Dr. Muzaffer TUNCER
Hacettepe Üniversitesi**

**İmza
Prof.Dr. Nur MOLLAOĞLU
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Resimler, Grafikler	iv
Tablolar	v
Semboller, Kısaltmalar	vii
Önsöz	ix

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Oral Flora

2.2 Oral Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

2.2.1 Gram Pozitif Koklar

2.2.2. Gram Pozitif Çomaklar ve Filamanlar

2.2.3. Gram Negatif Koklar

2.2.4. Gram Negatif Çomaklar

2.3 Treponema denticola

2.3.1 Treponema denticola'nın Virülans Faktörleri

2.4 Porphyromonas gingivalis

2.4.1 Porphyromonas gingivalis'in Virülans Faktörleri

2.5 Oral Mikroorganizmalarda Fibrinolitik ve Fibrinolitik Aktivite

2.5.1 İnhibitör Mekanizmalar

2.5.2 Fibrinolizis

2.6 Alveolit

2.6.1 Alveolitin Patogenezi

2.7 Bakteri Genetiği

2.8 PZR (Polimerize Zincir Reaksiyonu)

2.8.1 PZR'ın Kullanım Alanları

2.8.2 PZRda Kullanılan Başlıca Bileşenler

2.8.3 PZR'ın Kùltür Yöntemine Göre Sağladığı Avantajlar

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Seçimi

3.2. Diş Çekim Soketlerinden Örnek Alınması

3.3 Örneklerin PCR İncelemesi

4. BULGULAR

5. TARTIŞMA

6. SONUÇLAR

7. ÖZET

8. SUMMARY

9. KAYNAKLAR

10.ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Resimler

Resim1: *Treponema denticola*'nın elektron mikroskop görüntüsü.

Resim 2 : *P.gingivalis* elektron mikroskop görüntüsü.

Resim 3 : Diş çekimi sonrası sağlıklı iyileşme gösteren çekim soketi.

Resim 4 : Diş çekimi sonrası alveolit vakası

Resim 5: Diş çekim soketinden örnek alınması

Resim 6 : 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde doku örnekleri

Resim 7 : DNA ekstraksiyonu sırasında gerçekleştirilen santrifüj

Resim 8 : DNA ekstraksiyonu sırasında gerçekleştirilen inkübasyon.

Resim 9 : Gerçek zamanlı florometrik PZR cihazı

Şekiller

Şekil 1 : İntrinsik ve ekstrinsik yolun şematik görünümü

Şekil 2 : Çift sarmallı DNA molekül yapısı

Şekil 3: Polimerize zincir reaksiyonunda gerçekleşen basamaklar.

Şekil 4 : Diş çekim soketlerinden alınan örneklerde *Tr. Denticola*'nın negatif sonucu.

Şekil 5 : Diş çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. Gingivalis*'in pozitif sonucu.

Tablolar

Tablo1:Dişeti oluşu sıvısından izole edilen mikroorganizmalar

Tablo 2 : Dil florasını oluşturan mikroorganizmalar

Tablo 3 : Diş plağı florasını oluşturan mikroorganizmalar

Tablo 4 : Tanımlanmış oral streptokok türleri

Tablo 5 : Tanımlanmış Actinomyces türleri

Tablo 6 : Siyah pigmentli Bacteroides türleri ve yeni sınıflandırmadaki adları

Tablo 7 : Pigmentsiz oral Bacteroides türleri

Tablo 8 : Besin gereksinimlerine göre oral treponema türleri

Tablo 9 :Eş zamanlı Polimerize zincir tepkimesi (PZT) deneylerinde kullanılan oligonükleotid primer ve floresan işaretli 5' hidroliz problemleri.

Tablo 10 : Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *T. denticola* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Tablo 11 : Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *P. Gingivalis* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Tablo 12 : Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Tablo 13: Alveolit olgularının cinsiyete göre dağılımı

Tablo 14: Alveolit olgularının yaşlara göre sıklığı ve dağılımı

Tablo 15: Alveolit olgularının diş çekim bölgelerine göre dağılımı

Tablo 16: Alveolit olgularının çekim zorluğuna göre dağılımı

Tablo 17: Alveolit olgularının sigara alışkanlığına göre dağılımı

Tablo 18: Alveolit olgularında *T.denticola* varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 19: Alveolit olgularında *P.gingivalis* varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 20: Alveolit olgularında *P.gingivalis* ve *T.denticola*'nın birlikte varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 21: Alveolit olgularında ağrı semptomu ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 22: Alveolit olgularında ağız kokusu ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 23: Alveolit olgularında pıhtı kaybı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Tablo 24: Alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde bulunan *P.gingivalis* bakteri türü arasındaki ilişki

Tablo 25: Alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde *P.gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin bulunması arasındaki ilişki

Tablo 26: Alveoilıt olgularında çekim şekli ile *T.denticola* varlığı arasındaki ilişki

Tablo 27: Alveoilıt olgularında çekim şekli ile *P.gingivalis* varlığı arasındaki ilişki

Tablo 28: Alveoilıt olgularında çekim şekli ile *P.gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin birden bulunması arasındaki ilişki

Semboller Kısaltmalar

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

DNA: Deoksiribo nükleik asit

RNA: Reoksi nükleik asit

S: Streptokokus

Gr(-): Gram negatif

Gr(+): Gram pozitif

V: Veillonellae

H: Haemophilus

C: Capnocytophaga

A : Actinobacillus

B : Bacteroides

F: Fusobacterium

Msp: Major Surface Protein -Ana Yüzey Proteini

CTLP: kemotripsin benzeri proteaz kompleksi

Hemin: (haemin-ferriprotophyrin IX),

CHX: klorhekzidin

CPS: kapsüler polisakkarit

prtC: Kollajenaz

IL-6: interlökin-6

Lgp: Lysgingipain

FIIa:Trombin

FXIII : Fibrin stabilize edici faktör

FII : Protrombin

FX: Faktör on

FXa : Aktif faktör on

FV : Faktör beş

TF : Doku faktörü

FVII : Faktör yedi

FVIIa : Aktif faktör yedi

FXII : Faktör oniki - Hageman faktör

FXI : Faktör onbir

FXIa: Aktif faktör onbir

FIX: Faktör dokuz

FVIII: Faktör sekiz (FVIII)

TFPI: Doku Faktör Yolu İnhibitörü - Tissue factor Pathway İnhibitor

uPA: ürokinaz-plazminojen aktivatör

tPA: doku-plazminojen aktivatörü

B: Bacterioides

A: Adenin

G: Guanin

T: Timin

U: Urasil

S: Sitozin

dNTP: deoksiribonükleotid trifosfat

Real-time PZR: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restriction fragment length polimorfizm

SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism

Q-PCR: Quantitive PCR

FRET: Floresans rezonans enerji transferi

T: Treponema

P: Porphyromonas

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde yardımını esirgemeyen ve doktora eğitimim boyunca desteği ve anlayışı için tez danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Derviş YILMAZ'a, anlayış ve desteği için bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Ergun YÜCEL'e katkı ve yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN'a, tez süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nur MOLLAOĞLUN'a, Prof.Dr. Muzaffer TUNCER'e, Prof. Dr. Nadir GÜNGÖR'e ve kendilerinin şahsında tüm değerli hocalarıma,

Asistanlığım boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim Doç.Dr.Mustafa ATAÇ'a, Dr.Süleyman BOZKAYA'ya ve Dr.Sevil KAHRAMAN'a,

Dönem arkadaşlarım Dr.Wael AL-SHABANI, Dr.Yavuz KORKMAZ, Dr.Fatma ZOR 'a, Dt. Esmâ BOYSAN'a ve Dt.Emre ÇOLAK'a ve tüm klinik çalışma arkadaşlarıma ve değerli dostum Dr.Kıvanç KARADAYI'ya,

Ömrüm boyunca varlıkları ve desteklerini hep arkamda hissettiğim aileme sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkürler.

Ali Mert ARIK

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alveolit diş çekimi sonrasında en sık karşılaşılan komplikasyonlardan biridir. Alveolit alt çenede kulağa ve şakak bölgesine, üst çenede alın ve göz çevresine yayılan ağrılara neden olur. Bitkinlik ve huzursuzluğa sebep olma, diş çekiminden 1 - 3 gün sonra ortaya çıkma, kısmen veya tamamen bozulmuş pıhtı, kötü ağız kokusu ve ağrı kesiciler ile hafifletilemeyen şiddetli ağrı tablosu ile karakterizedir.^{1, 2, 3, 4}

Alveolite, halitosis de eşlik edebilir. Hastalar kötü tattan da şikayetçi olabilirler. Şiddetine bağlı olarak süresi 7 ile 10 gün arasında değişebilir. Alveolar osteit, fibrinolitik alveolit veya dry soket olarak da bilinen alveolitin görülme sıklığı %2 – 5,3 arasındadır. Ancak molar dişlerin çekimini takiben bu oranın %20 – 35'e kadar yükselebildiği rapor edilmiştir.^{5, 6, 7, 4} Etiyolojisinde oral bakterilerin varlığı (*T. denticola* çoğunlukta olmak üzere), kötü oral hijyen, perikoronitis veya ileri periodontal hastalık gibi lokal enfeksiyonların varlığı zorlu çekimler ve travma, çekim kavitesinde artık kalmış olan kök veya kemik parçacıklarının varlığı, çekim sonrasında soketin aşırı kürete edilmesi, oluşan pıhtının yerinden oynaması; oral kontraseptif veya sigara kullanımı gibi etkenler üzerinde durulmaktadır.^{7,8,4}

Oral kavitede alveolite neden olabilen fibrinolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar da mevcuttur. Fibrinolitik aktivite, *Phorphyromonans gingivalis* (*P. gingivalis*) ve *Treponema denticola* (*T. denticola*) varlığında da gözlemlenmiştir. *T. denticola* plazmin benzeri fibrinolitik aktivite uygulayarak alveolit oluşumuna neden olabilmektedir. Fibrinolitik ve fibrinolitik aktivite ya da her ikisini de gösteren mikroorganizmalar sırasıyla *Actinomyces* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Propionibacterium* sp. ve *Staphylococcus aureus*'tur.⁹

İlk kez 1985 yılında bilim dünyasına sunulduğundan itibaren 'polimeraz zincir reaksiyonu' (PZR), hem araştırmalarda hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığır açmıştır. Metot, nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanan bir çeşit "in vitro klonlama"dır.¹⁰ PZR, reaksiyonu Deoksiribonükleik asitin (DNA) iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu), sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) ,çift iplikçili DNA'ların sentezi ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanma ve DNA sentezi) bir PZR siklusunu oluşturmaktadır. Her adım farklı ısılarda gerçekleşir (sırasıyla 94°C–98°C; 37°C–65°C; 72°C). PZR tekniği tek veya çift iplikçili DNA'yı, Ribonükleik asite (RNA) hedef olarak kullanabilir. Bu metotla bir DNA hedefini 106 ila 1012 arasında çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18–20 baz uzunluğunda) kullanarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır.¹⁰ PZR, çok az miktarda elde edilebilen DNA örnekleri ile bile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PZR laboratuvar tanılarında çok büyük bir hız ve kesinliğe sebep olmuştur. Anaerobik bakteriler, geleneksel kültür yöntemleri kullanıldığında, 7-14 günde tanımlanırken, PZR ile yalnızca birkaç saatte tanımlanabilmektedir. Bakterilerin tanımlanmasında genellikle temel PZR yöntemleri yeterlidir. Bunun yanında, "nested PZR", "mültipleks PZR", "Real-time PZR" gibi varyasyonlarına da başvurulmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu niteliksel veya yarı nicelikseldir. Real-time PZR, reaksiyon boyunca ürünlerin devamlı olarak ölçülmesi ile karakterizedir ve diğer PZR yöntemlerine göre daha pratik ve hassas ölçü yapmaktadır.

Alveolit olgularının meydana gelmesinde bakterilerin rolü önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak, literatürler gözden geçirildiğinde bakterilerin virölans faktörlerinin Real-time PZR kullanılarak saptandığı bir çalışmaya henüz rastlanılmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, sağlıklı bir şekilde iyileşmekte olan diş çekimi soketleri ile alveolit olgularından elde edilen örneklerde, karşılaştırmalı olarak *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın varlığı ile prevalanslarının hassas bir moleküler teknik olan Real-time PZR yöntemini kullanarak incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Oral flora

Yenidoğanlarda ağız florası genellikle annenin doğum kanalı florası ile kaplanır. Bunlar genellikle Laktobasiller, Stafilokoklar, Mikrokoklar, Korinebakteriler, Enterik bakteriler, mayalar ile aerob, anaerob ve fakültatif Streptokoklardır. Bunlar birkaç gün içerisinde değişerek annenin ağız, el ve meme derisi florasını andırırlar. Anaerob bakteriler, özellikle diş sürme döneminde damağın ilk yarılarak açılması esnasında yerleşmeye başlarlar.¹¹

Ağız içi dokular, dişler, mukoza, dişeti, dişeti oluşu vb yüzeyler, aerob ve anaerob birçok mikroorganizmayı barındırırlar. Ağız içerisinde en fazla karşılaşılan mikroorganizma cinsi *Viridans Streptokoklardır* (%30 - 60). Dişsiz ağızda *Streptokokus (S.) mutans* ve *S. sanguis*'e rastlanmazken, çocuklarda gençlerde ve erişkin ağızlarında en yaygın cins ve sayıca da en fazla olan bakteri olması sebebiyle dişler, bu bakteri cinsinin yerleşmesi bakımından oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır. Diş plağında *S. salivarius*'a, *Lactobasilus*'lara, *Bacteroides melaninogenicus*'a (%1'den az) ve *Treponemalara* (%0,1) rastlanmaktadır. Bakteri plaklarında erken dönemlerde anaeroblar bulunmazken plağın zamanla kalınlaşmasıyla aerobların ve fakültatif anaerobların üreyip oksijeni azaltarak ve plak altı kısımlarda anaerob ortamın hazırlanmasıyla, anaerobların da üremeye başladığı tespit edilmiştir. İnsanda diş, dişeti ve tükürüğe temas etmeden dişeti olduğundan saf örnek alabilmek her ne kadar zor olsa da, özel steril konik kağıtlarla alınan örnek ve yapılan çalışmalarda üretilen mikroorganizmalar Tablo 1'de gösterildiği gibidir.¹¹

Tablo 1 : Dişeti oluğu sıvısından izole edilen mikroorganizmalar

Grup	Cins ve/veya tür	Üretilme oranı (%)
Gr(+) fakültatif koklar	Stafilokoklar,Enterokoklar, <i>Str.mutans</i> , <i>Str.sanguis</i> , <i>Str.mitis</i> , <i>S.slivarius</i>	28.8
Gr(+) anaerob koklar	Peptostreptokokuslar	7.4
Gr(+) fakültatif basiller	Korinebakteriler, Laktobasiller Nokardialer	15.3
Gr(+) anaerob basiller	<i>Aktinomyces bifidus</i> , <i>A. İsrailii</i> <i>A.naeslundii</i> , <i>A.odontolyticus</i> , <i>P.acnes</i> , <i>Laktobacillus buccalis</i> , Korinebakteriler	20.2
Gr(-) fakültatif koklar	Neisseria sp.	0.4
Gr(-) anaerob koklar	<i>Veilonella parvula</i> , <i>V. alcalescens</i>	8,7
Gr (-) anaerob basiller	<i>Porphyromonans melaninogenicus</i> , <i>B.oralis</i> , <i>V.sputorum</i> , <i>E.nucleatum</i> , <i>S.sputigenum</i>	17.3
Spiroketler	<i>T. denticola</i> , <i>T.oralis</i> , <i>T.macrodentium</i> <i>B.vincenti</i>	1,9

Tablo 2 : Dil florasını oluşturan mikroorganizmalar

<i>Mikroorganizma Grubu/Cinsi</i>	<i>İzolasyon oranı</i>
Fakültatif Streptokoklar	38.3
Veillonella'lar	14.3
Fakültatif Difteroidler	13.0
Anaerob Difteroidler	7.4
Stafilokoklar-Mikrokoklar	6.5
Bacteroidesler	5.3
Peptostreptokoklar-Peptokoklar	4.2
Neisseria'lar	2.3
Vibriolar/Campylobacterler	2.1
Fusobacterium'lar	0.8
Tanımlanamayan Gr (-) basiller	3.2
Tanımlanamayan Gr (+) koklar	2.6

Tablo 3 : Diş plağı florasını oluşturan mikroorganizmalar

Fakültatif Streptokoklar	27
Fakültatif Difteroidler	23
Anaerob Difteroidler	18
Peptostreptokoklar-Peptokoklar	13
Veillonella'lar	6
Bacteroidesler	4
Fusobacterium'lar	4
Neisseria'lar	3
Vibriolar/Campylobacterler	2
Fusobacterium'lar	0.8
Tanımlanamayan Gr (-) basiller	3.2
Tanımlanamayan Gr (+) koklar	2.6

Dil florası ile diş yüzeyinde oluşan bakteri plağı mukayese edildiğinde pek çok mikroorganizmanın benzer cins ve türden olduğu gözlenmiştir. Belli bir ortamda aynı cins veya türde mikroorganizmanın sayıca artması mikrobiyolojik olarak enfeksiyon bulgusudur. Ancak, periodontal enfeksiyonlarda Spiroketlerin artışı dışında diğer bakterilerin sağlıklı ve hasta bireylerde de benzer cins ve türde olması mikrobiyolojik teşhisi güçleştirmektedir.¹¹

2.2 Oral mikroorganizmaların sınıflandırılması

Bakteriler, mikroskobik morfolojilerine göre; 3'e ayrılırlar.

1-Yuvarlak şekilli bakteriler: Bunlara kok "coccus"lar denilir. Taze üretilmiş kültürlerde, ortalama 0,8 – 1,0 mcm çapında yuvarlak bakteriler olup, sıvı besi yerlerinden yapılan mikroskobik muayenelerde, "üzüm salkımı", "tespih dizilişi", "ikili kahve çekirdekleri", "küp", vs şekillerinde görülürler.

Örneğin, Stafilokokus, Streptokokus, Mikrokokus, Peptokokus, Peptostreptokokus, Neisseria, Sarcinia, Gafkya, cinsi bakterilerdir.¹¹

2-Çubuk/Çomak şekilli bakteriler: Bunlara "basiller" denilir. Boyutları (en ve boyları) oldukça farklılık gösterirler. Bakteri cinslerinin büyük çoğunluğu bu şekillerde görülür. Bazıları küçük basiller (en 0,5 mcm x boy 1,5 mcm) halinde iken bazıları (0,7mcm x 5-10 mcm) daha uzun olabilmektedir. Kimi durumlarda bölünen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve çok daha uzun görülebilir.¹¹

Örneğin, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Listeria sp.*, *Branhamella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Actinomyces sp.*,

Actinobacillus sp., *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Providencia sp.*, *Veillonella sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pasteurella sp.*, *Shigella sp.*, *Kingella sp.*, *Francisella sp.*, *Brucella sp.*, *Yersinia sp.*, *Legionella sp.*, *Haemophilus sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Ureoplasma sp.*, *Vibrio sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, vb cinsi bakteriler.¹¹

3-Spiral şekilli bakteriler: Aksial filamentli spiral şekilli bakteriler, kendi eksenleri etrafında helezonik kıvrımlar bulunan, mikroskopta burğu veya yay şeklinde görülürler. Sporsuzdurlar ve Gram boyama özellikleri zayıf olmakla birlikte negatiftirler.¹¹

Bakterilerin farklı hücre yapıları nedeniyle, çeşitli kimyasallarla farklı renklerde boyanmasına 'Gram boyama' denir.¹² Gram pozitif (+) bakterilerin hücre duvarlarında bulunan peptidoglikan (mukopeptid) tabakası daha kalındır ve Gram negatif (-) bakterilerde bulunmayan teikoik asit içermektedir. Gram (-) bakterilerin hücre duvarı ise lipopolisakkaritten oluşmuştur. Kristal viyole ve lügol boyaları, hücre duvarlarından geçerek bakterileri boyamaktadır. Gram (+) bakterilerde bu boyalar, hücre çeperinden zor ayrılan bileşikler yaparak alkol uygulandığında mor renklerini kaybetmezler. Gram (-) bakterilerde ise hücre çeperinde bulunan lipitler, alkolle çözünerek, boyanırlar. Bu tür bakteriler fuksinle boyandıklarında pembe-kırmızı renge boyanırlar.¹²

2.2.1 Gram (+) koklar

Odontojenik enfeksiyondaki bakteriler normalde bireyin vücudunda yaşayan canlılardır. Ağız florasını oluşturan plakta, mukoza yüzeylerinde, gingival sulkusta bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler aerobik

gram pozitif koklar ve anaerobik gram negatif çubuklardır.²⁸ Alveolit olgularında oral bakterilerin özellikle Gr (+) kokların etkin olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir.^{14,15,16,17,18,19,20,21}

a) Streptokoklar

Oral mikrofloranın büyük bir çoğunluğunu streptokoklar oluştururlar ve ağzın tüm bölgelerinden izole edilebilirler. Geleneksel olarak oral streptokoklar, basit biyokimyasal ve fizyolojik testlerle sınıflandırılabilmekte ve birbirinden ayrılabilir. Günümüze kadar oral florada tanımlanmış olan oral streptokoklar Tablo 4’de gösterildiği gibidir.²⁸

Tablo 4: Tanımlanmış oral streptokok türleri

Grup	Tür
Mutans grubu	<i>S.mutans</i> , serotip c,e,f <i>S.sabrinus</i> serotip d,g <i>S.cricetus</i> serotip a <i>S.rattus</i> serotip b <i>S.ferus</i> <i>S.macacae</i> <i>S.downei</i> serotip 4
Salivarius grubu	<i>S.salivarius</i> <i>S.vestibularis</i>
Anginosus grubu	<i>S.constellatus</i> <i>S.intermedius</i> <i>S.anginosus</i>

Mitis grubu	<i>S.sangius</i> <i>S.gordonii</i> <i>S.parasonguis</i> <i>S.oralis</i> <i>S.mitis</i> <i>S.crista</i>
-------------	---

Diğer oral streptokoklar *S. pyogens*, *Peptostreptokok micros*, *Peptostreptokok magnus*, *Peptostreptokok anaerobius*'tur.

b) Stafilokoklar, Mikrokoklar ve Stomatokoklar

Bu gruptaki mikroorganizmalar, sağlıklı bireylerde oral kaviteden izole edilmeleri oldukça nadir görülür. Ancak, protez kullanan hastalarda, çeşitli oral enfeksiyon varlığında ve immün olarak baskılanmış hastalardan elde edilen dental plak örneklerinde stafilokoklara saptandığı bildirilmiştir.²⁸

2.2.2. Gram (+) çomaklar ve filamanlar

Genellikle dental plaktan izole edilebilirler. Bu bakterilerin sınıflandırılmasında kemotaksonomik metotlar ve serolojik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bakterilerin sınıflandırılmasında kemotaksonomi faktörü önemlidir. Daha az oranda spesifitesi olan ve bakterilerin kimyasal yapılarını esas alan bu sınıflama da, bakterilerde çok değişken olan yapısal özellikler nedeniyle genetik sınıflama kadar tutarlı bulunmamaktadır.²⁸ Bakterilerin kimyasal yapıları her ne kadar genetik bir özellik gösterse de, bunların yetiştiği veya ürettiği besi yerinin kimyasal yapısı, osmotik basıncı, pH, vs. gibi çevresel koşullar da oldukça etkili olabilmektedir. *Actinomyces sp.*, *Eubacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*,

Propionibacterium sp. bu gruba dahil edilmektedir. *Actinomyces sp.* grubunun türleri Tablo 5’ de gösterilmektedir.²⁸

Tablo 5 : Tanımlanmış Aktinomiçes türleri

Günümüzdeki ismi	Önceki Sınıflama
<i>Actinomyces georgiae</i>	<i>Subgingival Actinomyces sp.</i>
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>A. israelii</i> serotip 2
<i>A. israelii</i>	<i>A. israelii</i> serotip 1
<i>A. odontolyticus</i>	<i>A. odontolyticus</i>
<i>A. naeslundii</i> genotipler 1	<i>A. naeslundii</i> serotip 1
<i>A. naeslundii</i> genotipler 2	<i>A. naeslundii</i> serotip 2 & 3
	<i>A. viscosus</i> serotip 2
	<i>A. meyeri</i>
<i>A. meyeri</i>	
<i>A. bernardiae</i>	
<i>A. radingae</i>	
<i>A. neuui</i>	
<i>A. europaeus</i>	
<i>A. graevenitzii</i>	
<i>A. turicensis</i>	

2.2.3. Gram (-) koklar

Bu grup bakteriler, Neisseriaceae ve Veillonellae familyasından gelmektedirler. *Neisseria sp.*, *Branhamella sp.*, *Moraxella sp.*, *Kingella sp.* ve *Actinobacter sp.* cinsleri Neisseriaceae familyasına dahil edilebilir.¹¹ Oral kavitenin birçok bölgesinde Veillonellae (V) familyası

izole edilmektedir. Ancak en çok dental plakta bulunmaktadır. Bu grup *V. parvula*, *V. dispar* ve *V. atypica* türlerinden oluşmaktadır.

2.2.4. Gram (-) çomaklar

a) Fakültatif anaeroblar Gr (-) rodlar

Oral bölgedeki fakültatif anaerob gram (-) rodların (Çubuk) çoğu, *Haemophilus* (*H*) genusuna aittir. Genellikle dental plak, saliva ve epitelyal bölgelerde bulunmaktadırlar. *H. parainfluenzae* (biyotip 1,2 ve 3), *H. segnis* (biyotip 5), *H. paraphrophilus* (biyotip 5), *H. aphrophilus* (biyotip 10), *H. haemolyticus* (biyotip 10,5), bu gruba dahil edilebilir. Bu türler, çene enfeksiyonları ve enfektif endokardit vakalarından izole edilmiştir ancak patojenik özellikleri oldukça düşüktür. Diğer fakültatif anaerob gram (-) çubuklar arasında bulunan *Eikenella corrodens*, enfektif endokardit, abse ve periodontal hastalıklı bölgelerden daha sıkça izole edilebilmektedir.¹¹

Gram (-) anaerob bir mikroorganizma olan *Simonsiella* ise insan ve hayvanlardaki oral kavitenin epitel yüzeylerinden izole edilebilmektedir.

Capnocytophaga (*C*), CO₂ bağımlı gram (-) bir çubuktur. Subgingival plak ve gingivitis vakalarından izole edilmektedir. Bu türlere, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. granulosa* ve *C. haemolytica* dahil edilebilir.

Actinobacillus (*A*) *actinomycetemcomitans*, adolosanlardaki agresif periodontal hasardan sorumludur. Mikroaerofilik, kapnofilik ve fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır. *A. actinomycetemcomitans*, lökotosin, kollajenaz ve proteaz gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir.

b) Zorunlu Anaerobik Gram (-) çubuklar

Süperoksit dizmutaz ve katalaz enzimine sahip olmayan mikroorganizmalar, bu gruba girmektedir.²² Zorunlu anaerobik gram (-) bakterilerin bazı türleri o kadar zor üremektedir ki, fermantasyon ve enzim aktivitesi gibi testlerde metabolitlerin konsantrasyonu memnun edici bir analiz için çok düşük olduğundan net sonuçlar elde edilememektedir. Bu mikroorganizmaların tanımlanabilmesinde geleneksel kültür yöntemleri kullanılamamaktadır. Ancak, moleküler mikrobiyolojik yöntemler ile tanımlanabilirler. Günümüzde laboratuvar koşullarında bile kültüre edilmesi güç olan yeni türler, PZR gibi DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA genin çoğaltılmasını esas alan yöntemlerle tanımlanabilmektedir. 16S rRNA geni her türe göre değişik dizinler içerdiğinden bakteriler arasındaki akrabalık ilişkilerinin çıkarılmasında bir moleküler saat olarak kullanılmaktadır.^{23,24,25,26}

Oral anaerobik gram (-) çubukların büyük çoğunluğu, *Bacteroides* sp. genusunun içinde yer almaktadır. Bu gruptaki bazı organizmalar, kanlı agarda üretildiklerinde karakteristik kahverengi veya siyah pigmentli koloniler meydana getirmektedir. Bu nedenle siyah pigmentli anaeroblar olarak bilinirler.^{22,27} İlk kez 1921'de Oliver ve Wherry bu mikroorganizmaları oral bölgeden izole etmişler ve başlangıçta bu siyah pigmentin 'melanin' olduğunu ileri sürmüşlerdir.²⁷ Ancak, yakın zamanda 'protoheme' olduğu anlaşılan bu pigmentin, oksijenin toksik etkilerinden hücreleri korumaya yardım eden bir defans mekanizması olarak görev aldığı saptanmıştır.^{28,22,27}

Tablo 6: Siyah pigmentli Bacteroides türleri ve yeni sınıflandırmadaki adları ²²

Porphyromonas: Siyah-pigmentli (asakkarolitik Bacteroides türleri)

Porphyromonas asaccharolyticus

Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas endodontalis

Prevotella: Siyah-pigmentli (sakkarolitik Bacteroides türleri)

Prevotella melaninogenica

Prevotella denticola

Prevotella loescheii

Prevotella intermedia

Prevotella nigrescens

Prevotella corporis

Prevotella tannerae

Pigmentsiz oral Bacteroides türler ve yeni sınıflandırmadaki adları ise Tablo 7' de gösterilmiştir.²²

Tablo 7: Pigmentsiz oral Bacteroides türleri

Prevotella: Pigmentsiz (sakkarolitik Bacteroides türleri)

Prevotella buccae

Prevotella bivia

Prevotella oralis

Prevotella oris

Prevotella oulorum

Prevotella ruminicola

Bacteroides (B) capillosus, B. forsythus, B. pneumosintes sakkarolitik pigmentsiz türler olarak tanımlanmaktadır. Ancak metabolik son ürünlerine, fermentasyon profillerine ve esas enzimlerine göre farklılaşma göstermektedirler.¹³ Yeni sınıflandırma ile B. forsythusun adı Tannerella forsythia; B. pneumosintes'in adı ise Dialister pneumosintes olarak değişmiştir.^{24,22} Zorunlu anaerob gram (-) bakterilerin bir başka ana grubu Fusobacterium sp. (F) genusuna ait bakterilerdir. Genellikle asakkarolitik olarak tanımlanmaktadır ve uzun filamanlar halinde bulunurlar. Bu hücreler;

Fusobacterium alocis,

F.sulci

F.periodonticum

F.nucleatum

Alt grupları;

F.subsp. nucleatum,

F.subsp. polymorphum,

F.subsp. fusiforme)

F.vincentii'i dir.

Diğer gram negatif anaerobik ve mikroaerofilik bakteriler;

Leptotrichia buccalis,

Wolinella succinogens

Campylobacter

Campylobacter concisus,

C. showae,

C. sputarum,

C. curvus, (*Wolinella curva*)

C. rectus (*Wolinella recta*)

C. gracilis'tir. (*Bacteroides gracilis*)

Siyah pigmentli mikroorganizmaların, kök kanal tedavisindeki akut alevlenmeler ve çevre dokulardaki yıkıcı harabiyetler ile ilgisi olduğu düşünülmektedir.

Prevotella sp. ve Porphyromonas sp. türleri gibi pulpal lezyonlarda var olan siyah pigmentli bakteriler, iltihabi mediatörlerin, doku yıkımı ve kemik rezorbsiyonunda rol oynayan yıkıcı enzimlerin aktivasyonu ile klinik semptomların gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar.^{29,30,31,32}

Socransky ve arkadaşları,³³ checkerboard DNA-DNA hibridizasyon metodunu kullanarak periodontal hasarın ciddiyeti ile en fazla ilişkili buldukları '*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *T. denticola*' üçlüsüne 'kırmızı kompleks (red complex)' adını vermişlerdir. Bu kompleks, aktif marjinal periodontitisin ilerlemesinde ve enfekte kök kanallarına bağlı periapikal hasarlarda önemli role sahiptir.^{34,35}

Siyah pigmentli anaerob çubuklar arasında olan *P.endodontalis*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P.nigrescens*, periapikal enfeksiyonlardan sorumludur.^{38,58} Siyah pigmentli bakterilere üye olmamasına karşın *T. denticola* kırmızı komplekse dahildir. *P. gingivalis* ile sinerjist ilişkisi bulunur ve bu sinerjinin akut periapikal semptomlarla yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{34,35,36,37}

T. denticola, *T. forsythia* ve *P. gingivalis*'in bir diğer özellikleri de geleneksel kültür yöntemleriyle kültüre edilmelerinin çok zor olmasıdır. Bu nedenle bu mikroorganizmalar 'zor üreyen' mikroorganizmalar olarak tarif edilmişlerdir.³⁸

2.3 *T. denticola*

Spiroketler (treponema), insan vücudunun birçok bölgesindeki enfeksiyonlarla ilişkili bulunmaktadır. Son yıllarda, spiroketlerin oral kavitede görülen hasarların gelişimindeki önemi ve patojenik potansiyeli üzerinde durulmuştur. Çoğu spiroket türünün, besin ve çevresel gereksinimlerinin sağlanması zordur, bu nedenle kültüre edilmelerinin çok zor, hatta bazen olanaksız olabileceği rapor edilmiştir.³⁹

Oral treponema türleri morfolojik özelliklerine ve besin gereksinimlerine göre sınıflandırılır. Morfolojik özelliklerine göre oral spiroketler genellikle küçük, orta ve büyük boy olarak sınıflandırılırken, besin gereksinimlerine göre oral treponema türleri; tablo 8'de gösterilmiştir.⁴⁰

Tablo 8: Besin gereksinimlerine göre oral treponema türleri

1. Sakkorallitik oral treponemalar:

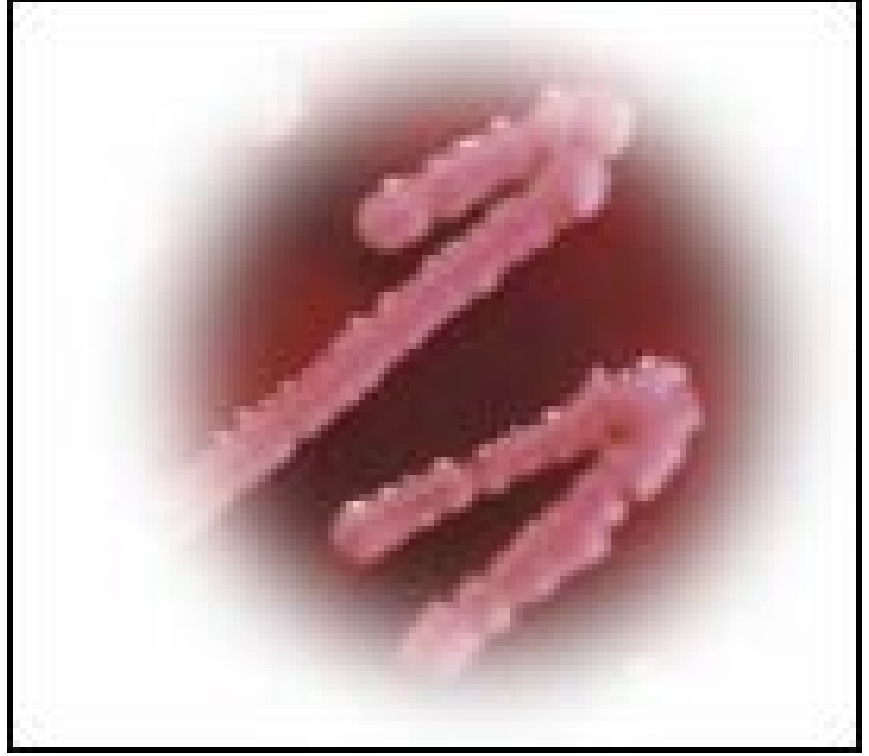
- T. pectinovorum*
- T. socranskii*
- T. amylovorum*
- T. lecithinolyticum*
- T. maltophilum*
- T. parvum*

2. Asakkorallitik oral treponemalar

- T. denticola*
- T. medium*
- T. vincentii*
- T. putidum*

Treponema hareketlilik özelliği yüksek, helezonik kıvrım gösteren asakkarolitik, anaerobik gram negatif bir bakteridir.^{41,42} Üretilen oral spiroket türlerinin en iyi karakterize edilebileni *T. denticola*'dır. Ancak bu bakterinin kültüre edilmesi çok zordur. Fibroblastlara, epitelyal hücrelere, eritrositlere, fibronektine, hyalürona, serum ve dişeti sıvısına bağlanabilme yeteneğine sahiptir.³⁹ *T. denticola*'nın patojenitesine katkıda bulunan birçok virülans faktör bulunmaktadır.

Sinerji, birden fazla mikroorganizmanın aynı ortamda bulunduklarında birbirlerinin etkilerini güçlendirmelerine verilen addır. Bakteri türleri arasındaki sinerji, bakterilerin yaşama şanslarını ve konak dokudaki zararlı etkilerini arttırmaktadır.³⁵ 'Kırmızı kompleks'in iki üyesi olan *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın arasındaki sinerji birçok çalışmada gösterilmiştir ve bu sinerjinin kök kanal enfeksiyonunun ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.^{34,35,43} Hatta bu sinerjinin bu bakterilerin sahip oldukları bazı virülans faktörlerinden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmektedir.⁴⁴



Resim 1 : *T. denticola* elektron mikroskop görünümü ⁴⁵

2.3.1 *T. denticola*'nın Virölans Faktörleri.

T. denticola'nın başlıca virölans faktörleri, Major Surface Protein (msp-Ana Yüzey Proteini) ve kemotripsin benzeri proteaz kompleksi (CTLP) gibi sitotoksik aktiviteli yüzey proteinleri; hücre dışı veya membranla ilişkili proteolitik, hidrolitik enzimler ve metabolitlerdir.⁴⁶ *T. denticola*'nın bazı yüzey proteinleri adeziv, sitotoksik etkiler gösterir ve doku yıkıcı aktivitelere sahiptir. Bu proteinlerin başlıcaları msp ve CTLP'dir.^{46,47}

a) Ana Yüzey Proteini (msp)

T. denticola'nın yüzey proteini ve antijeni major kılıf proteinidir. Major kılıf proteini (msp) *T. denticola*'nın farklı gruplarında farklı molekül ağırlığına sahiptir. 53kDa.luk msp proteini *T. denticola*'nın epitel hücrelerine, fibrinojen, fibronektin ve laminin aracılığıyla konak hücrelerine bağlanmasında önemli role sahiptir. Msp proteini epitel hücreleri ve eritrositlere karşı toksiktirler.²⁷ Ayrıca, 53 kDa.luk Msp proteini polimorfonükleer lökositlerin degranülasyonunu tetiklemesi ve MMP-8, MMP-9, kollajenaz ve jelatinazın spesifik salınımını sağlayarak enflamatuvar cevabı arttırır.⁴⁸ 64 kDa Msp proteini ise *T. denticola*'nın dişeti fibroblastlarına adezyonunda önemli role sahiptir.^{35,49}

Görevlerini sıralayacak olursak;

-*T. denticola*'nın konak hücrelere ve hücre dışı matrikse bağlanmasını düzenler.⁴⁹

- Bağlandığı yüzeylerde por oluşturuucu aktivite gösterir.^{49,50}

- Hücre iskeletinin düzenlenmesini sağlar.⁴⁷

-Hem epitelyal hücre yüzey reseptörlerine hem de sitoplazmik proteinlere bağlanır.⁵¹

-Epitelyal hücrelerin sitoplazmik membranlarındaki iyon kanallarını oluşturur.⁵¹

Bu özellikler, *T. denticola*'nın konak epitel hücrelerindeki sitopatik etkilerine yardımcı olur.

b) CTLP (Chymotrypsin-like protease complex) (Kemotripsin benzeri proteaz kompleksi)

Bu protein kompleksine 'dentilisin' adı da verilmektedir. Bazı *T. denticola* türlerinin dış membranlarında bulunur ve adezyonda etkili olmaktadır.^{52,53} Dentilisin;

- Jelatin, laminin, fibronektin, IgA, IgC, albümin, transferrin, fibrinojen ve diğer biyoaktif peptidleri salgılayan geniş bir substrata karşı enzimatik etki göstermektedir.

- Epitel hücrelerine bağlanmaktadır ve onların apoptozisini indüklediği bildirilmiştir.⁵⁴

- Doku yıkımına neden olan kollajenolitik konak enzimlerinin aktivasyonuna yol açabilmektedir.²⁷

- *T. denticola* msp'nin lokalizasyonuna ve oligomerleşmesine katkıda bulunur.²⁷

- Epitelyal yüzeylerin permeabilitelerinin artmasını sağlamaktadır.²⁷

- Spiroketlerin konak dokuya invazyonuna ve enfeksiyonu yaymalarına neden olmaktadır.⁴⁷

c) *T. denticola*'nın eritrositlerin bir araya gelmesini sağlayıcı etkileri ve hemolitik aktiviteleri bulunur.

d) Adezyon ve İnvazyon

T. denticola, konak hücrelere ve diğer doku elemanlarına adezyon gösterebilmekte ve hücrelere ve dokulara invaze olabilmektedir.⁴⁶ *T. denticola*, adezyon yeteneği ile konak hücrelerine tutunur ve onların harabiyetine neden olur. *T. denticola*'nın insan gingival fibroblastlarına adezyonunda fibronektin, çok önemli bir yer tutmaktadır. Ellen ve arkadaşları, anti fibronektin antikoru varlığında adezyonun engellediğini göstermiştir.⁵⁵ Ayrıca adezyon, mannoz ve galaktoz tarafından da engellenebilir.

e) *T. denticola*, immunomodüler (bağışıklık düzenleyici) özelliğe sahiptir. Polimorfonükleer lökositlerin degranülasyonunu sağlayarak, onların kollajenaz, jelatinaz ve elastaz salgılamalarına neden olur. Süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini engeller.

f) Flajella

Diş dokularında hasarın gelişiminde spiroketlerin hareket yeteneği, önemli rol oynamaktadır. Bu hareketliliği sağlayan flajella, önemli bir virülans faktörü olmakla beraber flajellaya sahip olmayan spiroketler konağı enfekte etmekte başarısız olmaktadır.⁴⁷ Flagellar filament 3 kor proteini FlaB1, FlaB2 ve FlaB3 ve bir major kılıf proteini FlaA dan oluşmaktadır. FlaA'nın fibronektine bağlanarak *T. denticola*'nın konak hücrelerine tutunmasında rol oynadığı düşünülmektedir.²⁹ *T. denticola* gibi spiroketlerin hareket sistemleri sadece flajellaya bağlı değildir. Bu tip spiroketler aynı zamanda kamçısal hareketi yöneten kemotaksis için de gereken genleri içermektedir.⁴⁷ *T. denticola*'nın epitelyal dokulara göçü, hareketlilik ve kemotaksise bağlıdır. *T. denticola*'nın, flgE, cheA, dmcA ve dmcB genlerinde mutasyon olması sonucunda, gingival epitelyal hücrelere penetrasyonunda etkisiz kaldığı gösterilmiştir.^{56,57}

g) Kısa zincirli yağ asitleri, uçucu sülfür bileşenleri, ekstrasellüler veya yüzey proteolitik ve hidrolitik enzimleri oral spiroketlerin diğer virölans faktörleri arasında sayılabilir.⁵⁸

T. denticola'nın 46 kDa ağırlığında sistalsin adı verilen antijenik proteini demir alışverişinde önemli rol oynadığı, eritrositlerin aglütinasyonu ve lizisi ve böylece hemoglobinin oksidasyon ve sülfürasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir.^{59,60} Bu hemolitik aktivite hücre dışı ortam ve hücrede olmaktadır. Hücre dışı aktivite ağırlığı < 1000 Da küçük olan moleküller ile ilişkilidir ve aktivite sisteinden bağımsızdır. Hücredeki aktivite ise molekül ağırlığı >10 kDa dan büyük olan ve sisteine ile ilişkilidir. Elektron mikroskopisinde eritrosit membranında erken etkileşimde membran protrüzyonu, sonra membranda düzensiz delikler ve sonunda membranın tamamen kaybolduğu şekilde progresif destrüksiyon izlenmiştir.⁶¹

T. denticola'nın dış zarı diğer gram (-) bakterilere benzerken, dış membrandaki lipit kompozisyonu gram (+) bakterilere (lipoteikoik asit tabakasının bulunması nedeniyle) benzemektedir. *T. denticola*'nın pürüfiye edilmiş dış membran lipidi ve zenginleştirilmiş dış membran lipoprotein preperasyonunun murin makrofajlarından IL-1, TNF-F ve Nitrik oksit salınımını indüklediği rapor edilmiştir.⁶²

2.4 *Porphyromonas gingivalis*

1994'te *Bacteroidaceae* üyelerinin 16S ribozomal protein ünitelerindeki baz sıralamasına bakılarak *Porphyromonas* genusu *Bacteroidaceae* ailesi içerisinde ayrılmış 6-8 üyeden ibaret ayrı bir genus haline getirilmiştir. *Bacteroides levii*, *B. macacae* ve *B. forsythus* isimli bakteriler *Porphyromonas* üyeleri ile benzer biyokimyasal özellikler göstermesine rağmen baz sıralaması farklı olduğu için *Porphyromonas* genusuna dahil edilmemiştir. Bu genusun en bilinen üyeleri: *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. circumdentaria* ve *P. salivosa*'dır. İnsan ağız florasında bulunabilen ve hastalık yapabilen Porphyromonansların ortak özellikleri katalaz pozitif olmalarıdır. Buna karşın insan patojeni olan iki tane *P. gingivalis* suşu katalaz negatiftir. İki tane de katalaz pozitif olmasına rağmen insan patojeni olmayan hayvan kökenli *P. gingivalis* suşu tespit edilmiştir.⁶³

En iyi bilinen periodontal patojen suşlar; *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* 17A3 ve *P. gingivalis* W83 tür. Bunlardan 17A3 suşu 1979 da bir insanın periodontitisinden, W83 ise 1967 de yine bir insanın periodontitisinden elde edilmiş stoklanarak günümüze kadar saklanmıştır. Ayrıca WPH35, HG184, HG189, 11834, A7436, HW11D-5, RB 46D-1 ve 381 suşları da iyi birer periodontal patojendir. Bunların genomik DNA sekansları tespit edilmiş olup standart suş olarak saklanmaktadır.⁶³

Porphyromonas sp. ve başka bazı *Bacteroides* sp.ler üredikleri besi yerinde siyah renkli pigmente benzer bir madde yapabilirler. Yakın tarihlere kadar “siyah pigmentli *Bacteroides* sp.” sınıflaması *Porphyromonas*lar için ayırt edici bir sınıflama olarak kabul ediliyordu. Artık bugün biz biliyoruz ki, bu sınıflama *Bacteroides* sp.ler için yeterince ayırt edici değildir. Çünkü bu pigment siyah olmayabilir. Bireysel yoruma açık olarak kiremit kırmızısı, kahverengi, yeşilimsi, koyu sarı renklere

olabilir. Aslında beklendiği gibi melanin değil, protohemin yapısında bir maddedir. Siyah pigment yapımı için besi yerinde at veya tavşan kanı bulunması, 7-10 gün kadar uzun bir süre inkübe edilmesi zorunludur.⁶³

Ayrıca herhangi bir bakteri herhangi bir zamanda siyah pigment kodlayan geni transdüksiyon ile bir başka bakteriden edinebilir veya delesyon yolu ile mevcut siyah pigment yapabilme yeteneğini kaybedebilir. Eski terminolojiye göre siyah pigmentli Bacteroides terimi ile kastedilen bakteriler (*Bacteroides levii*, *B. macacae*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. gingivalis* ve *P. endodontalis*, *Prevotella corporis*, *P. loescheii*, *P. denticola*, *P. melaninogenica*, *P. Nigrescens* ve diğerleri) arasında belirgin bir DNA homolojisi bulunmaz. Bu sebeple artık “siyah renkli anaerobik basil” terimi kullanılmakta ve bu siyah pigment özelliği ayırıcı kriter olarak kabul edilmemektedir.⁶³

Porphyromonas genusuna ait bakteriler Gram negatif, anaerob, hareketsiz, bazıları dağınık dizilmiş kokobasil, bazıları uçları yuvarlak sonlanan çomaklar halindedir. Barsak, dış genital organ ve ağız florasında yer alırlar. Sıklıkla kapalı organ apselerinden, sinüzit apandisit, diş ve dişeti enfeksiyonlarından izole edilirler, bakteriyemi yoluyla endokardit sebebi olabilirler. *P. gingivalis* bu hastalıklardan en sık sorumlu tutulan bakteridir. Yang ve arkadaşları⁶⁴, siyah pigmentli mikroorganizmaların vasküler endotelial büyüme faktörünün ekspresyonunu artırarak kalp dokusuna hasar verebileceklerini yaptıkları bir çalışmada göstermişlerdir.

*Porphyromonas*ların büyük bir kısmı proteinleri yapı taşlarına ayırarak enerji temin eder. Bu sebeple asakkarolitik Bacteroides sp. sınıfına girer.⁶³

P. gingivalis, non-fermenter, siyah pigmentli zorunlu gram negatif bir anaerob çubuktur.⁶⁵ Boyutları 0,5 µm -1,2 µm arasındadır ve kokobasil görünümünde olmakla beraber morfolojisi besi yerinin özelliklerine göre değişmektedir. *P. gingivalis*, oral kavitede en çok periodontal bölgede bulunmaktadır.^{22,13,63,66,67} Çoğunlukla subgingival bölgelerde ve dişeti oluşunda tek tek duran, kapsüllü ve birbirinden farklı büyüklükte kısa kök zincirleri veya koko-basil kümeleri halinde bulunur; dil ve tonsillerden de izole edilebilmektedir. Özellikle abseli dişler ve semptomatik peri-radiküler lezyonlardan izole edilebilmektedir.^{63,65}

P. gingivalis, son on yıl içerisinde üzerinde en fazla durulan iki oral patojenden biridir. Beslenme gereksinimi, konaktaki davranış biçimi, çoğu diş ve dişeti enfeksiyonunda yer alması ve birçok yıkıcı virülans faktörüne sahiptir.²²

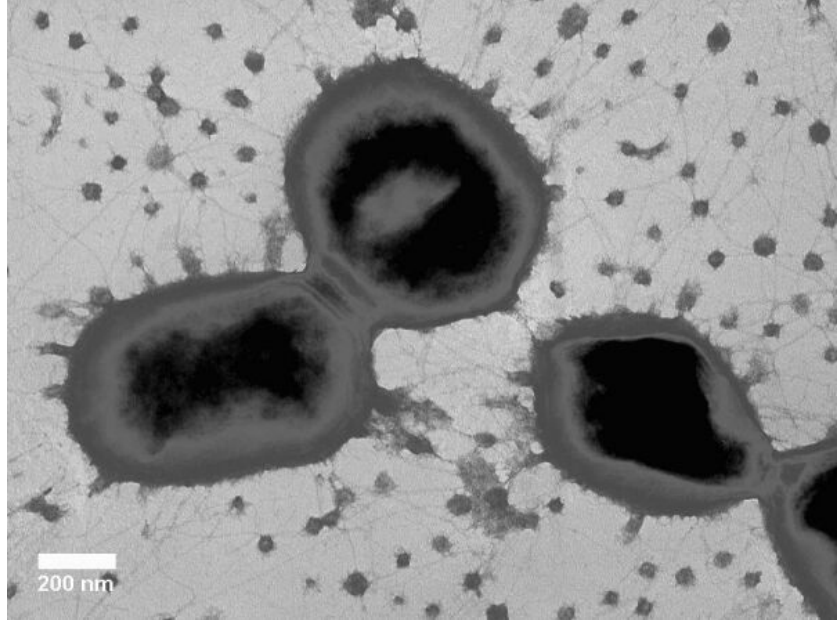
Sürmekte olan 3. Molar dişlerinin 5-7 mm.'lik periodontal ceplerinde *P. gingivalis* ile birlikte *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* ve *Tannerella forsythensis* bakterileri polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmış ve *P. gingivalis* %20 oranında tespit edilmiştir.⁶⁸

Mandibulada osteoradyonekroz olgularında yapılan bir çalışmada, rezeke edilen 12 osteoradyonekrotik mandibulanın derin medullar yapılarında en predominant organizma olarak *P. gingivalis* tespit edilmiştir.⁶⁹

Vitamin K₁ ve hemin hem üremelerini hem de virülanslarını artırır.⁶³ Hemin (haemin-ferriprotophyrin IX), siyah pigmentli diğer mikroorganizmalar için olduğu gibi, *P. gingivalis* için de önemli bir faktördür. Hücre morfolojisi besi yerinin hemin konsantrasyonuna sıkıca bağlıdır.⁶³ *P. gingivalis*, üremek ve hastalık yapabilmek için en az 0,5

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hemine ihtiyaç duyar. Heminden zengin besi yerinde üretilen *P. gingivalis*in hastalık yapabilme yeteneği de daha fazladır. Hemin bulunmayan besi yerinde ise ovoid kok görünümündedir, fimbriaları bulunmaz ve ekstrasellüler vezikül formasyonu görülür. Besi yerinde 0,5 $\mu\text{g/ml}$.’ye kadar hemin bulunduğunda 1,5 μm uzunluğunda dolgun çomaklar şeklinde görünür, fimbriaları bulunur ve çevresinde vezikül üretmez.⁶³ Oksijene oldukça duyarlıdır. Pek ok *P. gingivalis* türleri anti-anaerobik antibiyotiklere, penicilin+Beta Laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Tetrasiklinlerden, doksisikline daha duyarlıdır. Cerahat veya kan içerisinde ve oda ısısında günlerce canlı kalabilir. *P. gingivalis*, oluşturduğu ekstrasellüler veziküller sayesinde fagositozdan korunabilir. Ayrıca konakta glikokaliks yapısında bir kapsül oluşturarak fagositik kabiliyetteki konak hücrelerinden korunabilir.

P. gingivalis 30 $\mu\text{g/ml}$ ’ den düşük konsantrasyonlarda klorhekzidin (Kh) içerisinde bile üreyebilir. Hücre gövdesinin ve veziküllerin enzimatik aktiviteleri kullanılan Kh den hiç etkilenmemektedir. Tam aksine, düşük konsantrasyonda (<30 $\mu\text{g/ml}$) Kh ile muamele edilen bakteriler, membran geçirgenlikleri bozulduğu için ortama daha fazla vezikül, tripsin benzeri proteazlar, alkalın fosfataz ve N-asetil-B-glukozaminidaz gibi enzimler salarlar. Fakat bu veziküllerinin ve enzimlerinin litik etkileri büyük ölçüde kayıp olur. Bu nedenle, Kh kullanılacaksa 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondan daha yoğun kullanılmalı ve sadece profilaktik amaçlarla uygulanmalıdır.⁶³



Resim 2 : *P. gingivalis* elektron mikroskop görüntüsü. ⁷⁰

2.4.1 *Porphyromonas gingivalis*'ın Virölans Faktörleri

P. gingivalis'in başlıca virölans faktörleri şunlardır:

a)Kapsül

Kapsül, *P. gingivalis*lerin çoğunda bulunan önemli bir virölans faktörüdür. *P. gingivalis*, kapsüler serotipine bağlı olarak virölansı da değişim göstermektedir.⁷¹ Altı adet kapsüler serotip bulunmakla beraber bu kapsüller K antijeninin varlığı ile yakın ilişkilidir.⁷² K antijeninin varlığı *P. gingivalis*'in fagositoza direncini sağlamaktadır.⁷³ Gonzales ve ark.⁷⁴ kapsüler polisakkarit (CPS) ile aşılانmış farelerin *P. gingivalis*'in yol açtığı oral kemik kaybından korunduğunu ispatlamışlardır. Bu nedenle, CPS' nin, *P. gingivalis*ye bağlı oral kemik kaybından korunmada aşılama yöntemi olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

b) Fimbriya

Her bakteri gibi *P. gingivalis* de konakta hastalık yapabilmesi için ilk önce konak dokuya tutunması gerekir. Konaktaki dişeti epitel hücrelerine, çeşitli konak proteinlerine fimbriyalar aracılığı ile tutunur.⁶³ *P. gingivalis* fimbriyaları ayrıca sitokin üretimi ve kemik rezorbsiyonuna neden olmak gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.⁷⁵ *P. gingivalis*'in hücre yüzeyinde iki farklı tipte fimbriya bulunur. Fimbriyalı *P. gingivalis*lerin fimbriyasız olanlara göre insan dendritik hücrelerine daha kolay girebildiği in vitro olarak gösterilmiştir.⁷⁶ Bu fimbriya farklılıkları yumuşak doku enfeksiyonlarının gelişimini etkilemektedir. Epitel hücrelerinin yüzeylerinde bulunan 50 ve 40 kDa luk 2 protein bu fimbriyalar için reseptör görevi görür. Bunlardan 50 kDa luk protein aynı zamanda epitel hücrelerinin keratin bağlayan reseptörüdür. Dolayısıyla bu tutunma tripsin ile inaktive edilebilir. Salya kaplanmış hidroksilapatit yüzeylere, konak sert dokularına, epitele de fimbriyalar tutunabilir.⁶³

c) Glikozil Transferaz gtf-A geni

Porphyromonas gingivalis'ten glikozil transferaz geni izole edilmiş ve gtfA olarak adlandırmışlardır.⁷⁷ Morfolojik olarak gtfA'ya sahip olmayan *P. gingivalis* olgun fimbriyadan yoksundur, düşük otoagregasyon ve hücrelere bağlanma yeteneği göstermektedir. gtfA geni adezyonu düzenlemek suretiyle *P. gingivalis*'in patojenitesinde önemli rol oynamaktadır.

d) Asetilnörominik ve glukoronik asit

P. gingivalis'in konak hücrelere bağlanmasında önemli role sahiptir.⁷⁸

e) İnvazyon

P. gingivalis için önemli bir virülans faktörü de konak dokuya ve hücrelere invaze olabilme yeteneğidir. *P. gingivalis* dişeti epitel hücrelerine yüksek oranda girmektedir. Genellikle bakteriler, konak hücre çekirdeğinin çevresindeki bölgede birikirler.⁷⁹ Hatta konak hücrelerin içinde 24 saatten daha uzun bir süre kalabilmekte ve hücrelerin şekil ve boyutlarındaki değişiklikler ile birlikte aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlamaktadırlar. *P. gingivalis*, endodontik giriş yolunu kullanarak koroner arter endotelyal hücrelerine doğru da ilerleyebilir.⁸⁰

f) Kollajenaz (prtC)

P. gingivalis tarafından salgılanan önemli ve etkin bir virülans faktörü olan kollajenaz, siyah pigmentli anaerob diğer bakteriler tarafından da üretiliyor olsa da, gerçek kollajenaz üreten tek bakteri *P. gingivalis*'tir.^{81,82} Kollajenaz geni, kök çevresinde meydana gelen hasarlarda da *P. gingivalis* için önemli bir yayılma faktörü olarak düşünülmektedir.⁸³

g) Toksinler

P. gingivalis için çok önemli bir virülans faktörü ve kemik rezorbsiyonunda rol oynayan ana etken olarak ileri sürülen lipopolisakkarit (LPS) konak dokunun harabiyetine neden olan biyolojik aktiviteleri yöneten bir moleküldür.^{78,84,85} *P. gingivalis* LPS ile teşvik edilen kemik rezorbsiyonu

ve gingival dokudaki interlökin-6 (IL-6) üretimi, CD14'e karşı geliştirilen antikor tarafından engellenir. CD14, insan gingival fibroblastları ve gingival epitelyal hücrelerdeki LPS için belirgin bir reseptördür.^{78,86} Lipopolisakkarit ve periapikal lezyon varlığı arasında doğru orantı var olduğu düşünülmektedir.^{78,85} Apikal periodontitisli dişlerin pulpalarında, yüksek seviyelerde LPS bulunduğu bildirilmiş ve bakterilerin bu mekanizma ile apikal lezyon oluşturdıkları ileri sürülmüştür.⁸⁷ Ayrıca enfekte pulpa nekrozlarındaki gram negatif bakterilerin prevalansı ile LPS seviyeleri arasında güçlü bir ilişkinin var olduğu da gösterilmiştir.⁸⁷

h) Proteaz ve Proteaz İnhibitörleri

Gingipain virülans belirleyici ana faktördür ve sistein proteinaz ile karakterizedir.⁸⁸ *P. gingivalis*'in bu sistein proteinazları, genellikle periodontal patojenlerin başlıca virülans faktörleri olmakla beraber gingipainler mikrobiyal vampirlerin moleküler dişleri şekline benzetilmektedir.^{89,90,91}

Bradikinin ve trombin, sinerjist çalışan proinflamatuvar ajanlardır ve kemik rezorpsiyonunu tetikleyen güçlü bir etkiye sahiptir. Bu proteinazlar rgpA, rqpB ve kgp genleriyle kodludur. Arjinine özgü proteolitik aktivite rgpA/b ile lys-spesifik aktivite ise kgp ile kodlanır.⁴¹ Nadkarni ve arkadaşları⁹², yaptıkları bir çalışmada *P. gingivalis*'in biyotiplerini Lysgingipain (kgp) gene göre sınıflandırmıştır. Loubakos ve arkadaşları⁹³, arjinine özgü gingipain-R'lerin (rgpB ve HRgpA), insan trombositlerindeki hücre içi kalsiyumda artışa neden olduğunu ve trombinle yarışacak etkinlikte trombosit kümelenmesi sağladığını bildirmişlerdir. HRgp, *P. gingivalis*'in virülansında fosfolipit bağlayan ve enzim aktivitesini düzenleyen hemagglütinin/adezyon etki alanı varlığı nedeniyle rgpB'den daha önemlidir.⁹⁴ Gingipainler, ayrıca konak matriks metalloproteinazların kontrolünde güçlü etkiye sahiptir. Gingipainlerin *P.*

gingivalis ve *T.forsythia* arasındaki patolojik sinerjisinde de önemli olabileceği düşünülmektedir.⁹⁵

I)Hemin

Bu bakteri için ortamda hemin bulunması patojeniteyi oldukça artırır. Hiç hemin içermeyen besi yerinde üretilen *P. gingivalis* kültür süzüntülerinden (5×10^9 CFU) deney hayvanlarına kasıktan enjeksiyon ile verildiğinde hayvanlarda hastalık oluşturulamazken Aynı deney 0,33 µg/ml hemin içeren besi yerinde üretilen *P. gingivalis* suşları ile tekrarlandığında % 20'si ölür. Hemin zengin ortamda üretilse bile belirli bir hücre sayısının altında yapılan enjeksiyonlar ile deney hayvanlarında hastalık oluşturulamamaktadır. *P. gingivalis* virülansı doza bağımlıdır. *P. gingivalis* enjeksiyonları ile hastalandırılan deney hayvanlarının histolojik incelemelerinde enjeksiyon bölgesinde lokal reaksiyonlar ve submüköz inflamasyon sahaları görülmektedir. İnokülasyon dozu arttırıldığında enjeksiyon bölgesinde lokal nekrozlar görülür. Yüksek dozlarda enjeksiyon bölgesinde kılların dökülmesi, kas dokusunda ödem, yaygın bağ doku nekrozları, deride dekolmanlar ve lokalize apseler görülür. Deney hayvanlarının otopsilerinde karaciğerlerinde herhangi bir patolojik değişime rastlanmamıştır. Ancak akciğerde lökosit infiltrasyonu, ödem ve alveolar kollaps tespit edilmiştir. Bu deneylerde bakterinin üretildiği ortama vit K₁ ilavesi mortaliteyi arttırmaktadır. Hemin varken bakterinin ortama saldığı butirik asit dişeti dokusunda IL-6, IL-8, IL-11 salınmasını artırır ve T lenfositleri için toksiktir, T lenfositlerin apoptozisini artırır, dişeti fibroblastlarını doza bağlı olarak süprese eder.⁶³

Ağız boşluğunun doğal sıvı ve sekresyonlarında hemin ve vit K₁ bulunmaz. Bu bakterinin patojenite kazanabilmesi için iki hemin kaynağı mevcuttur: Birincisi *Camphylobacter*, *Veillonella* ve *Wolinella* üyelerinin katabolik artıkları (kommensal ilişki), İkincisi ise konağın kendisidir.

Konağın eritrositlerini parçalayarak hemin elde eder. Bunu yapabilmek için ekstrasellüler veziküllerin içerisindeki litik enzimleri kullanır.^{28,63}

Fibrinolitik sistem enflamatuvar lezyonların yayılmasını ve konnektif dokunun bozulmasını sağlayan ekstrasellüler proteolizisi düzenlediği için enflamatuvar reaksiyonlarda önem taşımaktadır. Fibrinolitik sistem plazminojen aktivatörleri tarafından aktive edilmektedir. Bu aktivatörler serin proteazis ile katalizlenerek plazminojeni plazmine çevirmektedir. Plazmin, aktif prokollojenleri ve diğer matriks metalloproteinler üzerine agresif etki göstererek enflamatuvar lezyonlarda doku yıkımına sebep olmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda bakteriyel enfeksiyonlarda plazminojen-plazmin sisteminin varlığı ifade edilmiştir.⁹⁶ *P. gingivalis* enfeksiyonun yayılmasına neden olan fibrinolitik ve fibrinolitik aktivite göstermektedir.^{96,97}

Diş hekimliğinde çoğu oral enfeksiyon, belirli bir etiyolojik ajan tanımlanmadan ampirik olarak tedavi edilmektedir. Örnek olarak abselerin çoğunun penisilin ile, periodontal enfeksiyonların çoğunun ise tetrasiklinle tedavi edilmesi gibi. Ancak, bu ampirik yaklaşım her zaman başarılı olamamaktadır. Klinik mikrobiyolojide en doğru ve iyi yaklaşım etiyolojik mikroorganizmayı tanımlamak, takiben uygun tedaviyi seçmek olmalıdır.

2.5 Oral Mikroorganizmalarda Fibrinolitik ve Fibrinolitik Aktivite

Yara çevresindeki fibrin birikimi, yara çevresinde bulunan dokuları, mikroorganizma invazyonuna karşı korumakta ve mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, kanda fibrinogen miktarının artması enfeksiyöz bir hastalığın belirleyicisidir. Fibrin oluşumu 3 basamakta gerçekleşir:

I. Fibrin monomerlerinin oluşması: Fibrinojen disülfat bağları ile birbirine bağlı üç polipeptid zincirden (alfa-beta-gama) oluşur. Trombin (FIIa), alfa ve beta terminal uçlarındaki argenil glisin bağlarını hidrolize uğratarak fibrinojeni fibrin monomerlerine ayırır ve dolaşıma fibrinopeptid A ve B salınımına sebep olur.⁹⁸

II. Fibrin monomerlerinin polimerizasyonu: Elektronegatif olarak güçlü fibrinopeptidlerin ayrılması ile geriye kalan fibrin monomerleri kolayca hidrojen bağları ile birbirlerine bağlanarak polimerize olurlar.⁹⁸

III. Fibrin pıhtının stabilizasyonu: Oluşan fibrin polimerleri kovalent disülfid bağları ile stabil kılınır. Bu aşama için fibrin stabilize edici faktör (FXIII), trombin ve Ca^{++} gerekmektedir. Burada FXIII'nin trombinin açığa çıkması ile aktive olduğunu belirtmekte yarar vardır.⁹⁸

Fibrin pıhtının oluşmasını sağlayan Trombin, Protrombin'nin (FII) inaktif prekürsörlerinden kaynak almaktadır. Protrombinden trombin oluşması için birçok proteolitik basamak gerekmektedir. Son basamak faktör onun (FX) aktif hale (FXa) dönüşmesidir. Ayrıca Ca^{++} , faktör beş (FV) ve fosfolipit yüzey de gerekmektedir. FXa ise diğer serin proteazlardan sentezlenen aktif prekürsörlerle ortaya çıkmaktadır. FXa iki yolla aktif hale gelir:

1.Ekstrinsik Yol: Doku faktörü (TF) tarafından hızla aktive edilir. TF bir lipoproteindir. Primer olarak endotel hasarı ile salınır. Ayrıca trombositler ve monosit / makrofajlar tarafından da sentezlenebilir. Ca^{++} iyonu varlığında TF hızla faktör yediyi (FVII) aktive etmektedir (FVIIa). TF/FVIIa kompleksi de hızla FX'u aktive (FXa) etmektedir. TF tarafından hızla aktive olan bir yoldur.⁹⁸

2.İntrinsik Yol: İntrinsik yolun başlangıcı son derece komplekstir. Faktör onikinin (FXII) aktivasyonu kanın yabancı bir yüzeyle

teması ile başlar. Bu yüzey invitro olarak bir cam, silikon veya plastik olabilir. İn vivo olarak da kollajendir. İntrinsik yol özetle yüzey teması ile ekstrinsik yol ise doku hasarı neticesinde aktif hale gelir. Her iki yol FX seviyesinde birleşerek ortak bir yoldan ilerlerler.⁹⁸

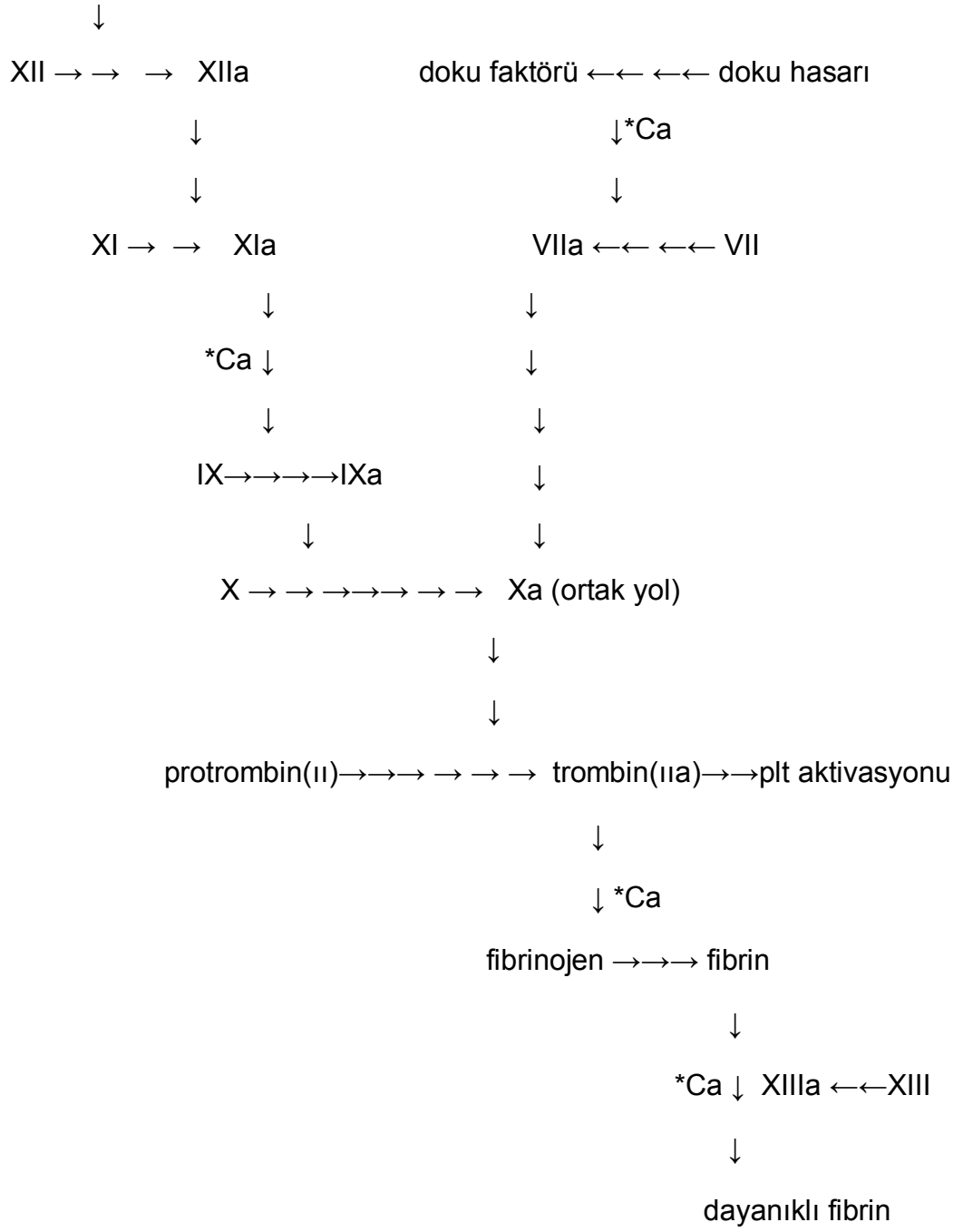
Aktive olan FXII, faktör onbiri (FXI) aktif hale (FXIa) geçirir. Bu basamak Ca^{++} iyonunun varlığından bağımsızdır. FXIa, Ca^{++} , TF, FVII ve fosfolipit yüzeyin varlığında faktör dokuzu (FIX) aktif hale (FIXa) getirir. FIXa, bir ko-faktör olan faktör sekiz (FVIII) varlığında FX'u aktif hale (FXa) getirir. Burada FVIII'in etkisinin trombin varlığında zenginleştiğini belirtmekte yarar vardır.⁹⁸

İntrinsik yolun başlangıcı olan FXII özellik taşımaktadır. FXII herhangi bir proteolitik basamak gerekmeden kanın herhangi bir yabancı yüzeyle teması ile aktive olmaktadır. Aktive olan FXII aynı zamanda birçok reaksiyonun zayıf aktivatörüdür. Yani FXII, FXI'i aktive ederken aynı zamanda prekallikrein ve plazminojeni de aktive etmektedir. Bilindiği gibi prekallikrein'in indüklenmesi ile kallikreinden kininojen ve son ürün olarak bradikinin, plazminojenin indüklenmesi ile de plazmin oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar daima geri dönüşüm mekanizması ile birbirlerini etkilerler. Yani kallikrein, kininojen ve plazmin de aynı zamanda FXII'yi aktive edebilme yeteneğindedirler.⁹⁸

İntrinsik yol

Ekstrinsik yol

Yüzey teması



Şekil 1: İntrinsik ve ekstrinsik yolun şematik görünümü

2.5.1 İnhibitör Mekanizmalar

Organizmada fibrin oluşumunu sınırlayan veya oluşan fibrini imha eden mekanizmalar da mevcuttur. Bunlar:

1. Self inhibisyon:

Prokoagülan maddeler daima aktive ettikleri sistemi denetlerler.

2. Spesifik inhibitörler:

-Antitrombin III: Aktif serinproteazların en önemli inaktivatörüdür. Primer etkisi FXa üzerinedir. Fakat trombin, FIXa, FXIa, FXIIa ve kallikrein üzerine de inaktivasyon etkisi vardır.

-Heparin Co-Faktör II: Trombin (FIIa) aktivasyonunu inhibe eder. Yukarıdaki iki inhibitör proteinin aktivasyonu da heparin ile zenginleşir.

-Protein C: FV ve FVII'nin önemli inhibitörüdür. K vitamini bağımlı bir proteindir. Aktivasyonu için trombinin endotel membran proteini (trombomodulin) ile teması gerekmektedir.

-Protein S: Protein C aktivasyonu için gereklidir. Trombosit membranındaki inhibisyon mekanizmasını aktive eder.

-Doku Faktör Yolu İnhibitörü (Tissue factor Pathway Inhibitor=TFPI): Ekstrinsik yol inhibitörüdür. "FVII-FXa" etkileşimini inhibe etmektedir.

-Plazmin: Oluşan fibrin yapının çözülmesini sağlar. Bu işleme fibrinolizis adı verilmektedir.

2.5.2 Fibrinolizis

Organizmada koagülasyonun regülasyonunda fibrinolizis son derece önemli bir basamaktır ve oluşan fibrin pıhtının çözülmesi işlemidir. Bu olay plazminojen-bağımsız ve plazminojen-bağımlı olmak üzere iki şekilde gelişmektedir. Nötrofil proteaz, plazminojen-bağımsız yolun major komponentidir. Bu yol aynı zamanda anjiogenesis, embriyogenik gelişim ve hücre hareketinde de önemlidir. Plazmin-bağımlı Plazminojen aktivatör (PA)/Plazmin sistemi fibrin çözülmesinde en fazla etkin olan sistemdir. Bu sistemdeki plazminojen aktivatörleri esas olarak plazma-plazminojen aktivatörü, ürokinaz-plazminojen aktivatör (uPA) ve doku-plazminojen aktivatörüdür (tPA).

Doku-plazminojen aktivatörü; endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Bu aktivatör ateş, egzersiz gibi durumlarda ve vazoaaktif ajanların etkisi ile sentezlenmektedir. Yalnız travma durumunda plazmaya geçmektedir.

Plazma plazminojen aktivatörü; son derece labildir ve inaktivatörler tarafından hızla plazmada veya karaciğerde inaktifte olmaktadır. Kronik karaciğer hastalığı olanlarda fibrinolitik aktivitenin artmasında önemli bir faktördür.

Bir diğer önemli inaktivatör ürokinazdır. Ürokinaz da böbrekte sentezlenmekte ve idrarla atılmaktadır. İdrarda daima az miktarda plazminojen bulunmaktadır. Bunun kaynağı muhtemelen böbrekte sentezlenen ürokinaz ve filtre edilen diğer aktivatörlerdir. Renal traktüsteki antikoagülan aktivitede bu aktivatörlerin rolü önemli olarak kabul edilmektedir.

Plazminojen, bu aktivatörlerin etkilediği maddedir. Proteaz yapıdaki aktivatörlerin etkisi ile plazminojen plazmine çevrilmiştir. Plazmin bir serinproteazdır ve fibrini de içeren birçok substrata reaksiyon vermektedir. Bir anlamda trombüs oluşurken plazminojende fibrin trombüse müdahale etmeye başlamaktadır. Plazminin fibrinolizis etkisi erken ve geç devrede olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Erken devrede fibrinojene etki etmek konusunda trombinle kompetisyona girmekte ve antitrombin etki ile fibrin polimerizasyonunu ve trombosit agregasyonunu engellemektedir. Geç devrede ise fibrinojeni hidrolize uğratarak polimerizasyonu önlemektedir.⁹⁹

Fibrinin çözülme mekanizması özetle doku-plazminojenin endotel tarafından salınımı ve plazminojeni aktive etmesi ile başlamakta ve fibrin solubl dallara hidrolize olmaktadır. Bu sırada kullanılmayan plazminlerde hemen antiplazminler tarafından inaktive edilir.⁹⁹

Bazı özel durumlarda patolojik fibrinolizis de söz konusudur. Yani doku travması, yanık, tümör, cerrahi gibi durumlarda doku-plazminojen aktivatörü aşırı miktarda dolaşıma katılmakta ve koagülasyon mekanizması engellenmektedir.⁹⁹

Koagülasyon ile fibrinolizis arasında yakın bir ilişki vardır. Fibrinolitik sistemler koagülasyonla birlikte stimüle olmaktadır. Örneğin FXII (Hageman faktör)'ün stimülasyonu aynı zamanda plazminojenin plazmine çevrilmesini aktive etmektedir. Trombin de plazmin için zayıf bir aktivatördür.⁹⁹

Oral bölgede fibrinolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar saptanmıştır. Staphylococcus aureus ailesi ve β hemolitik streptokoklar fibrinolitik aktiviteye sahip olmakla beraber, burun kanaması olan hastaların burun ve boğaz bölgesinden ayırt edilmiştir. Fibrinolitik aktivite, *Bacterioides asaccharolyticus* (*B. Gingivalis*) ve *T. denticola*'da da

gözlemlenmiştir. Her iki mikroorganizma periodontal hastalıklar ve akut nekrotizan ülseratif gingivitisle de ilişkilidir.⁹⁹

T. denticola plazmin benzeri fibrinolitik aktivite uygulayarak alveolit oluşumuna neden olabilmektedir. *T. denticola*'nın fibrinolitik aktivitesi hücre dışında gerçekleşmektedir.¹⁰⁰ Alveolit oluşumu ile ilgisi olduğu düşünülen mikroorganizmalar arasında *Streptococci* (*S. Viridans*, *S. Lactis* ve *Corynebacteria xerosis*) de sayılmaktadır.¹⁰¹

Fibrinojenolitik ve fibrinolitik aktivite ya da her ikisini de gösteren mikroorganizmalar, *Actinomyces* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Propionobacterium* sp. ve *Staphylococcus aureus*'tur.

2.6 Alveolit

Diş çekiminden sonra en sık karşılaşılan problemlerden biri de alveolittir. Alveolit terimi, Crawford tarafından 1896'dan bu yana literatürde kullanılmaktadır.¹⁰² Bu tarihten sonra, alveolar osteitis, lokalize osteitis, postoperatif alveolitis, alveolgia, alveolitis sicca dolorosa, septik soket, nekrotik soket, lokalize osteomyelitis ve fibrinolitik alveolitis gibi terimler de kullanılmıştır.¹⁰³

Alveolit alt çenede kulağa ve şakak bölgesine, üst çenede alın ve göz çevresine yayılan ağrılara neden olarak, bitkinlik ve huzursuzluğa sebep olan, diş çekiminden 24 - 72 saat sonra ortaya çıkan, kısmen veya tamamen bozulmuş pıhtı, kötü ağız kokusu ve ağrı kesiciler ile hafifletilemeyen şiddetli ağrıların olduğu bir durumdur.^{14,104,105,106}

Alveolitin diş çekiminden sonraki birinci günde ortaya çıkmamasının nedeni, kan pıhtısındaki antiplazminin pıhtıyı parçalanmadan sorumlu olan plazminden önce tükenmesidir.¹⁰³

Alveolite halitosis de eşlik edebilir. Hastalar kötü tattan şikayetçi olabilirler. Şiddetine bağlı olarak 7 - 10 gün sürebilir. Alveolar osteit, fibrinolitik alveolit veya dry soket olarak da bilinen alveolitin insidansının %2 – 5, üçüncü molarların çekimini takiben ise %20 – 35 olduğu gösterilmiştir.^{21,107,108,109}

Alveolitin nedeni çekim sonrası oluşan pıhtının bozulması olarak gösterilmektedir. Pıhtıda var olan fibrin ağının fibrinolitik aktivite sonucu bozulması ile soket üzerindeki koruyucu tabaka ortadan kalkmaktadır. Sokette kan pıhtısının kaybolması nedeniyle nekrotik debris olabilir.^{14,105,110,111}

Etiyolojide oral bakteriler, kötü oral hijyen, perikoronitis ve ileri periodontal hastalık gibi önceden lokal enfeksiyon bulunması durumu, çekim zorluğu ve travma, yarada kalan kök ve kemik parçaları, çekimden sonra alveolün aşırı küretajı, pıhtının yerinden oynatılması, oral kontraseptif ve sigara kullanımı, hekimin deneyimi üzerinde durulmaktadır.^{14,15,16,17,18,19,20,21}

Etiyolojide etken olabilecek oral bakteriler arasında *Actinomyces viscosus* ve *Streptococcus mutansa*, hayvan modellerinde oluşturulan diş çekim soketlerinde rastlanmıştır.¹¹² Nitzan ve ark.¹¹³ perikoronitiste etken olan mikroorganizmaların alveolit oluşumuna neden olabileceğini belirtmişlerdir. Özellikle *T. denticola*'nın alveolit oluşumunda önemli bir etken olduğunu savunmuştur. Buna ilaveten çocukluk döneminde alveolitin meydana gelmemesinin nedeni olarak da bu mikroorganizmanın o çağlarda ağızda bulunmadığını göstermektedir.¹¹³

Çoğu araştırmacı, alveolitin gelişiminde çekim zorluğu ve travmanın etkili olduğu konusunda hemfikirdir.^{105,114,115,116} Flep kaldırılıp

osteotomi yapılan cerrahi diş çekimi işlemlerinde alveolit olguları artmaktadır.¹⁰⁹ Bir çalışmada daha az deneyimli olan cerrahların yaptığı alt gömülü yirmi yaş dişleri operasyonlarında alveolit en çok meydana gelen komplikasyon olduğu rapor edilmiştir.¹¹⁷ Diş çekimi sırasında meydana gelen travmanın soket içerisindeki kemiğin vasküler yapısını bozduğu saptanmıştır. Bunun yanında kavite tabanındaki damarlarda da trombozise neden olabilmektedir. Bazı araştırmacılar da travmanın doku dayanıklılığını azalttığına ve yara enfeksiyonuna yol açtığını bildirmiştir.^{118,119} Birn (1973), diş çekimi sırasında meydana gelen travmanın alveolar kemik hücrelerine zarar verdiğini ve alveolar kemik iliğinin enflamasyonuna ve bunun da alveolit patogenezisinde en önemli faktör olan fibrinolitik aktiviteye neden olan doku aktivatörlerinin ortaya çıkmasını neden olduğunu bildirmiştir.¹⁰⁵

Diş çekimi sonrası iyileşme sırasında kan akımının zayıf olması da alveolite neden olabilmektedir.¹²⁰ Lokal anestezilerdeki vazokonstrüktörler de bir diğerk patogenetik faktördür. Bazı araştırmacılar periodontal intraligamenter anestezinin blok ve infiltrasyonel enjeksiyonlardan daha fazla alveolit oluşumuna yol açtığını iddia etmektedir.¹²¹

Oral kontraseptif kullanan kadın hastalarda ise alveolit daha yüksek oranda meydana gelmektedir.^{122,123,124} 1960'larda oral kontraseptif kullanan hastalar ile alveolit arasında pozitif korelasyon kurulmuştur.¹²⁵ Östrojen, pirojen benzerleri ve bazı ilaçlar, indirekt olarak fibrinolitik sistemi aktive ederler. Böylece kan pıhtısında lizis meydana gelir ve alveolit oluşumuna neden olur. Oral kontraseptifler ve fibrinolitik aktivite faktör II, VII, VIII ve X gibi faktörlerin sayısının artmasına neden olmaktadır.¹²⁶

Günde bir paket sigara içen hastalarda alveolit oluşma insidansı %20 artmakta iken, operasyon günü ya da operasyon sonrası birinci günde sigara içen hastalarda bu artış %40 olarak bildirilmiştir.¹²⁷

Alveolitten korunmak için antifibrinolitik ilaçlar, steroid ve nonsteroid antienflamatuar ilaçlar, antiseptikler ve topikal ya da sistemik antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır.¹²⁸ Bunun yanında özellikle klorhekzidin içeren gargaraaların alveolit oluşumunu büyük ölçüde önlediği de bildirilmiştir.^{129,130,131,132,133}

Amoksisilin, klindamisin, ve metronidazolün alveolitten korunmak adına sınırlı bir etkisi olduğu ancak tetrasiklinin daha etkili olduğu gösterilmiştir.^{134,135,136,137,138,139,140,141}

2.6.1 Alveolit Patogenezi

Klinik ve laboratuvar çalışmalar alveolit patogenezinin nedeni olarak fibrinolitik aktivitenin artması olduğunu göstermiştir.^{105,142,143,144} Birn, kan pıhtısının parsiyel veya tam lizisi ve destrüksiyonunun inflamasyon son ucunda doku kinazlarının ortaya çıkmasına ve böylece kandaki plazminojenin direkt ya da indirekt aktivasyonuna neden olduğunu iddia etmiştir.¹⁰⁵ Alveolar kemik hücrelerinde travma sonrası direkt doku aktivatörleri salındığında, plazminojen plazmine dönüşür sonuç olarak fibrin dağılarak pıhtı parçalanmış olur. Bu dönüşüm doku yada plazma pro-aktivatörleri ve aktivatörlerinin varlığı ile sağlanır. Bu aktivatörler, direkt (fizyolojik) ve indirekt (nonfizyolojik) olarak sınıflandırılır. İleri alt sınıflandırma ise intrinsik ve ekstrinsik aktivatörler olmasına bağlı olarak orijinlerine göre yapılır.¹⁴⁵ Direkt intrinsik aktivatörler Faktör XII-bağımlı aktivatör ve ürokinaz içerir. Direkt ekstrinsik aktivatörler doku plazminojen aktivatörleri ve endotelial plazminojen aktivatörlerini içermektedir. Doku plazminojen

aktivatörleri alveolar kemik de dahil çoğu doku tipinde bulunmaktadır.¹⁴⁶ Endirekt aktivatörler bakteriler tarafından üretilen streptokinaz ve stafilokinaz gibi maddeler içerir. Bu da bakterilerin alveolit gelişimine neden olduğunu destekleyen bir teoridir.

Alveolit olgularında ağrının varlığının nedeni olarak ise sokette bulunan kinin formasyonu gösterilmiştir. Kininlerin primer olarak efferent sinirleri aktive ettiği gösterilmiştir.^{147,148}

Plazmin, alveolar kemik iliğinde kalikreini kinine dönüştürür. Bu yüzden plazminin varlığı alveolitın iki önemli karakteristik özelliği olan nörolojik ağrı ve kan pıhtısının parçalanmasına neden olmaktadır.¹⁴⁷

2.7 Bakteri Genetiği

Canlıların genetik maddesi, RNA virüsleri dışında DNA'dır. DNA, büyük bir molekül yapısındadır. Bir DNA molekülü iki iplikçiğin sarmal halde bulunmasıyla oluşur. DNA molekülünün birimleri nükleotidlerdir. Bir nükleotidde fosforik asit, deoksiriboz ve organik baz bulunur. Deoksiriboz 5 karbon ile fosforik aside, 1 karbon ile organik baza bağlıdır. Nükleotidlerin arasında 3' 5' fosfodiester bağı vardır.¹¹

Organik bazlar, purin ve pirimidinler olmak üzere ikiye ayrılır. Purinler adenin(A) ve guanin(G), pirimidinler, timin(T) (urasil) ve sitozinden(S) oluşur. Bakteri DNA'sı septal mezozoma bağlıdır. Bu noktada kırılma oluşarak DNA iplikçikleri ayrılırlar. DNA'nın taşıdığı genetik şifre bir kaç bin nükleotid yapısındaki genler aracılığıyla oluşur. Genin DNA'daki yerine lokus adı verilir. Genetik özellikler, genler aracılığıyla tayin edilir. DNA'da, bir maddenin sentezi ile ilgili genler ardı ardına bulunur. Sentezle ilgili genler ve bunların çalışmasını kontrol eden yapı

genleri vardır. Bu genler birleşerek operon'u oluştururlar. Operon'un çalışması da düzenleyici (= regülatör) genin kontrolü altındadır.¹¹

Nükleotidlerin bir araya gelmesi ile oluşan DNA iplikçığı bir polinükleotid yapıdadır. İki iplikçik üzerinde organik bazlardan A ile timin T arasında (T=A) iki hidrojen molekülü yer alırken, sitozin C ile G arasında üç hidrojen bağı (C=G) bulunur. Bundan dolayı, bir DNA molekülünde adenin miktarı timin miktarına, sitozin miktarı guanin miktarına eşittir. Ancak, DNA molekülü üzerinde A+T miktarı, C+G miktarına eşit değildir. A+T/C+G oranı, her canlı türü için özgül olup değişmez karakterdedir. Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında bu özellikten yararlanılmaktadır. C+G/DNA molekülüne oranı birbirine yakınlık gösteren mikroorganizmalar aynı cins ve tür içine dahil edilmektedir.¹¹

DNA molekülünün yapısında bulunan A, T, C ve G moleküllerinin sayısı, çeşitli olasılıklarda diziliş biçimleri her canlı için değişmez ve özgüllük gösterir. Bir DNA molekülünde bulunan purin ve pirimidin organik bazlarının dizilim düzeninde olabilecek çeşitlilik insandan virüse kadar milyonlarca tür canlının DNA yapısının farklılığını açıklayabilmektedir. Bunun doğal sonucu olarak doğada milyonlarca canlı türü ve bu türlerin birbirine benzeyen bireyleri (fenotipleri) bulunmaktadır.¹¹

Canlıların, temelde enzimlerin etkinlik gösterdiği sayısız yaşamsal işlevleri bulunur. Bu işlevlerin her birinden sorumlu DNA molekülü üzerinde genetik birimler bulunmaktadır. Canlıların her bir yaşamsal işlevini yöneten genetik birimlere gen denir. Genler genel olarak uzunlukları yaklaşık 1000 -5000 olan nükleotid çiftlerinden oluşurlar. Genler, sorumlu oldukları işlevleri, sentez ettikleri enzimler ile yürütmektedirler. Enzimler ise protein yapısında olduklarından, gen; ayrı bir protein yapısını belirleyen bir DNA parçası olarak da tanımlanabilir.¹¹

Protein molekülü, belirli sayıda aminoasidin belli bir sıra ile yan yana gelmesi ile oluşur. DNA'da bunu sağlayan bir protein kodlama sistemi bulunmaktadır. Protein içerisinde yer alan amino asitlerin kodlaması, pürinli primidinli nükleotidlerin üçlü gruplar halinde dizilişi ile sağlanmaktadır. Her birisi bir aminoasidi kodlayacak şekilde olan bu üçlü gruplara triplet ya da genetik kod birimi karşılığı olarak bir kodon adı verilir. Proteinlerin yapısına giren aminoasit sayısı yirmidir. Buna karşın A, T, C ve G üçlü olarak yan yana gelmeleri ile oluşabilecek kodon sayısı teorik olarak 64'tür. Bunun anlamı ise bir aminoasidi kodlayacak birden fazla aminoasidin bulunmasıdır. Önceki araştırmalarda 61 üçlü kodonun hangi aminoasidi kodladığı ve kalan 3 kodonun ise protein sentezine nokta koyan kodonlar olduğu gösterilmiştir.¹¹

DNA molekülünün iki önemli özelliği bulunmaktadır.

- DNA'nın yapısını oluşturan iki polinükleotid zinciri birbirinden ayrıldıkları zaman her iplikçiğin eskiden karşısında bulunan diğer yarımı yeniden ve aynen oluşturabilme yeteneği vardır. Buna DNA'nın replikasyonu denir.

- DNA polimeraz enzimi ve DNA sentezinde gerekli maddeler bir araya konulduklarında, bir süre sonra yeni DNA molekülleri sentez edilmekte ve sonuçta DNA miktarı başlangıca göre artmaktadır. Bu gözlemden yararlanarak çok az miktardaki mikroorganizma DNA'ları çoğaltılmakta ve hastalık etkeni olan mikroorganizmalar tanımlanabilmektedir. Bu yöntem ise Polimeraz Zincir (=chain) Reaksiyonu (PZR) denilmektedir.¹¹

2.8 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla kullanılan genotip tabanlı moleküler mikrobiyolojik yöntemlerden günümüzde en popüler olanı, 16S ribozomal RNA genlerindeki özel bölgelerinin çoğaltıldığı 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PZR) dur. Kary Mullis tarafından ilk kez bilim dünyasına sunulan Polimeraz Zincir Reaksiyonu, modern bilimi tamamen değiştirmiştir.¹⁴⁹ Kary Mullis bu buluşundan dolayı 1993 yılında Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır.¹⁵⁰

PZR, diğer saptama yöntemlerinden en az 10- 100 kat daha duyarlıdır ki bu yüksek duyarlılık onu bu amaç için ideal kılar.¹⁵⁰ Ayrıca PZR yönteminde, saptama için kültür yönteminde olduğu gibi bakteri üretilmesi işlemine gerek duyulmamaktadır. Bu özellik, çekim soketlerinde sıkça rastlanan ve zor üreyen anaerobik bakterilerin tanımlanmasında önemli bir avantaj oluşturur.

DNA replikasyonunda önce, topoizomeras enziminin etkisiyle süper sarmal açılır. Helakaz enziminin etkisiyle ise iki DNA iplikçığının arasında ayrılma ve çatallanma oluşur. Stabilizasyon proteinleri yardımıyla iki DNA iplikçığının sentez esnasında devamlı açık kalması sağlanır. Çift iplikli DNA molekülünde DNA iplikçileri birbirine ters yönde paraleldirler.

Yeni bir iplikçik 5'-3' yönünde iken, diğeri 3'-5' yönünde bulunmaktadır. Replikasyon esnasında ise karşıda oluşacak iplikçikler tersi yönünde yani 5'-3' yönün karşısında 3'-5' yönde sentez olacaktır. Replikasyonda iki durum söz konusudur.

- DNA polimeraz III enzimi, 3'-5' yönündeki DNA'yı kalıp olarak kullanarak 5'-3' yönünde sentez yapılmaktadır.

- 5'-3' DNA kalıbında ise önce primaz enzimi yardımı ile sentezlenen primer RNA kalıp olarak kullanılmakta ve yine DNA polimeraz III enzimi yardımıyla 5'-3' yönünde DNA sentez edilmektedir. Ancak bu DNA iplikçığı, sürekli olarak sentez edilmemekte, önce 1000-2000 nükleotid uzunluğunda DNA segmentleri halinde (Okazaki segmentleri) oluşturulmaktadır.

Daha sonra bu segmentler DNA polimeraz I enzimi yardımıyla bir araya getirilmektedir. Bakterinin kendi DNA'sı için geçerli kurallar bakteri içerisinde yer alan diğer DNA yapıları için de geçerlidir. Hücre içinde bu şekilde bağımsız olarak kendilerini eşletme yeteneğindeki birimlerin her birine replikon denir.

Bakteri DNA'sı üzerinde genler belirli bir düzen içinde yer alırlar. Özellikle birbirleriyle çok yakın ilişkide bulunan enzimlere ait genlerin oluşturdukları bu tür gen gruplarına ise operon denir. Operonlarda birbirleriyle çok yakın ilişkili genlerin yanı sıra, bunların bir arada çalışmasını sağlayan yardımcı genler de bulunmaktadır.

DNA molekülü gerektiğinde kendisinden RNA molekülü oluşturabilmekte ve hücrenin biyolojik fonksiyonlarını yönetilebilmektedir.¹¹

2.8.1 PZR'ın Kullanım Alanları ¹⁴⁹

1. Kalıtsal hastalıklarda hastanın ve taşıyıcının tanısında
2. Prenatal tanıda
3. Klinik örneklerde patojen organizmaların tanısında
4. Adli tıpta

5. Onkogenezinin araştırılmasında

6. Probların oluşturulmasında, klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında,

7. DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,

8. Bilinmeyen dizilerin tayininde,

9. Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evriminin aydınlatılmasında,

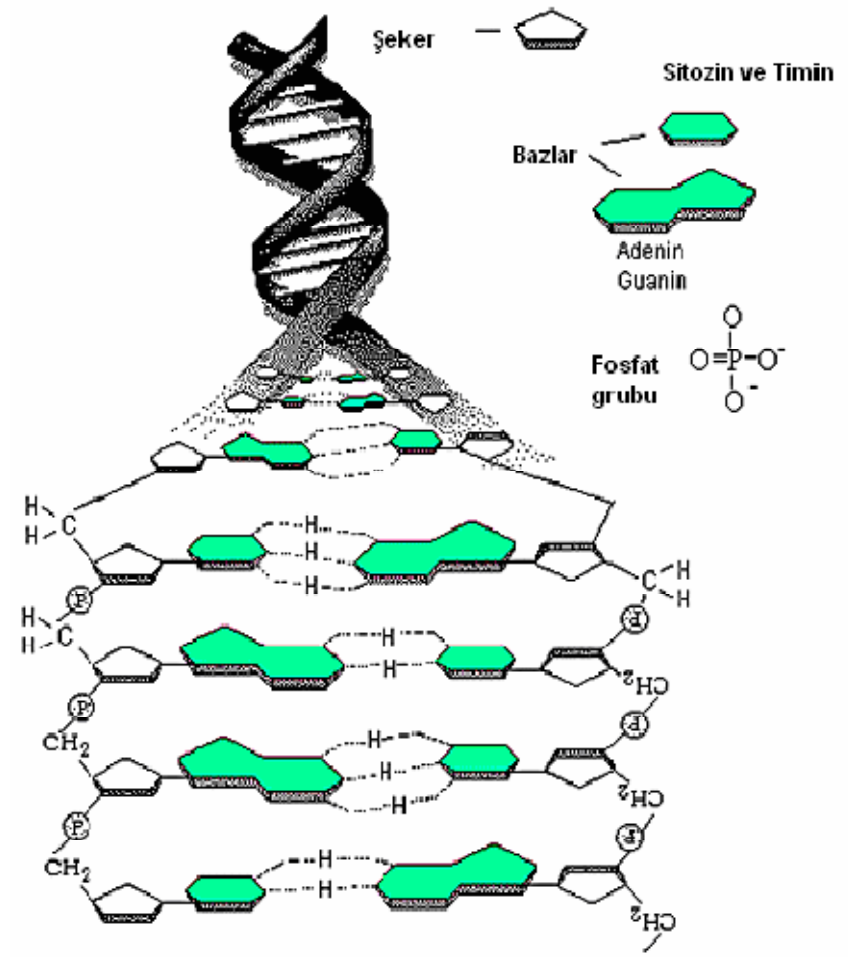
10. RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism" analizinde,

11. In vitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanmasında,

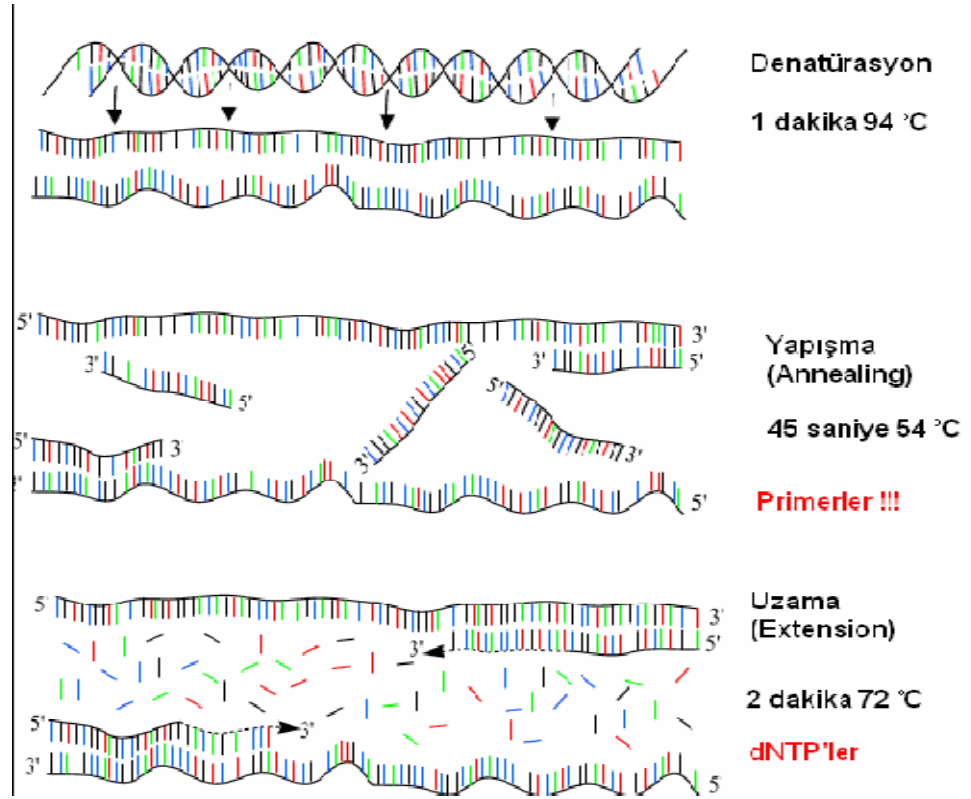
12. DNA protein etkileşiminin araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir.

PZR yönteminin icadı ve gelişimi, son yüzyılda moleküler teknolojiye en önemli ilerleme olarak görülmekle beraber biyolojik ve tıbbi araştırmalara etkisi oldukça fazladır. PZR, gen ve genom çalışmalarının sayısını arttırmıştır. Günümüzde PZR kullanarak herhangi bir organizmadan herhangi bir geni çoğaltmak mümkündür. Yöntem, DNA'nın in vitro replikasyonu ve basit reaksiyonların tekrarlayan döngülerinden oluşmaktadır.¹⁵⁰ Temel olarak, ardı ardına 25-35 siklуста DNA polimeraz enzimi hedef DNA'yı çoğaltmaktadır. PZR bir çeşit in vitro klonlama olarak da tanımlanabilir.

İlk olarak, ısı çok yükseltilerek çift sarmallı DNA'nın tek sarmala denatürasyonu sağlanır. Isı düşürülerek bir çift oligonükleotid primer, hedef DNA dizisindeki tamamlayıcı eşlerine yapışır buna "annealing" adı verilir. Primerler kopyalanacak DNA bölgesinin limitlerini tanımlar. Biraz daha arttırılan sıcaklıkta DNA polimeraz enzimi, primerlere bağlanarak, nükleotidleri ikinci sarmalı uzatmak için eklerler. Devam eden döngülerde bu basamaklar daha fazla DNA kopyası oluşturmak için tekrarlanır. 30 döngüden sonra tek bir başlangıç molekülünden hedef dizinin milyonlarca kopyası üretilebilmektedir.²²



Şekil 2 : Çift sarmallı DNA molekül yapısı¹⁵¹



Şekil 3 : Polimeraz zincir reaksiyonunda gerçekleşen basamaklar.¹⁵¹

Amplifikasyon ürününün saptanması ise; kopyaları çıkarılan primerler arasında kalan belli baz çifti büyüklüğündeki bölgenin jel üzerinde veya amplifikasyon yapılan bölgeye uygun tamamlayıcı prob ile hibridizasyon sonrası belirlenmesi ile gerçekleşmektedir.

2.8.2 PZR'da Kullanılan Başlıca Bileşenler^{149,150 152}

1. Hedef DNA

İncelenecek olan örneğin DNA' sı, PZR reaksiyonuna tek veya çift zincirli olarak eklenebilir. DNA'nın uzunluğu PZR'ın etkinliği için

önemli bir faktör olmamakla beraber, bir restriksiyon enzimi ile kısaltılırsa, sonuç daha başarılı olur.

2.Oligonükleotid Primerler

Hedef DNA'nın dizilerini tamamlayan tek zincirli sentetik oligonükleotid primerler reaksiyona genellikle 1mM konsantrasyonda eklenir. Bu miktar, çoğunlukla 30 döngülük bir PZR için yeterlidir. Primerlerin yüksek konsantrasyonları, ektopik bölgelere yapışmalarına neden olarak, istenen hedef DNA dışındaki bölgelerde çoğalma meydana getirebilir. Yetersiz konsantrasyonları ise PZR ürününün çok az miktarda oluşmasına neden olur. Primer tasarımında dikkat edilmesi gereken kurallar şunlardır:

-Oligonükleotid dizisi özgün olmalı

-3' ucunda G-C olmalı

-Baz dağılımı ve kompozisyonu rastgele olmalı (G/C oranı % 45-55)

-Primer uzunluğu optimum 18-25 bazlık olmalı

-İki primer aralığı 100-600 baz çifti (bç) olmalı

-Primer kendisi ya da diğer primer ile komplementer (tamamlayıcı) diziler içermemelidir.

3. 4-deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP)

DNA sentezi sırasında serbest deoksiribonükleotid trifosfatlara ihtiyaç duyulmaktadır. PZR reaksiyonu sırasında en fazla

özgüllüğü sağlamak için dNTP'lerin konsantrasyonu 200 μ M düzeyinde olmalıdır. Ardarda yapılacak dondurma-çözdürme işlemleri de dNTP'nin raf ömrünü kısaltacağından; daha sonra kullanılacak miktarlar ayrılıp +20 °C' de saklanmalıdır.

4. Tamponlar

Standart PZR tamponunun x10 konsantrasyonundaki stoğu, 500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl, 15 mM MgCl₂ içermektedir. PZR sırasında x1 konsantrasyona sulandırılan tampondan gelen Mg+2 iyonunun optimal konsantrasyonu oldukça düşük olduğundan (1.5 mM), kalıp DNA hazırlanırken yüksek konsantrasyonda şelasyon yapıcı ajanların bulunmaması gerekir. Ayrıca fosfatlar gibi negatif yüklü iyonik gruplar olmamalıdır.

Bir PZR ilk kez yürütüldüğünde, Mg+2 konsantrasyonu, optimizasyonu sağlamak için ayarlanmalıdır. Burada TrisCl (10mM) ve KCl (50mM) sabit tutulup MgCl₂ konsantrasyonu 0.05-5 mM arasında (0.5 mM artışla) denenir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg+2 iyonunu bağladıklarından, her PZR protokolünde Mg+2 konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır.

Serbest magnezyumu etkileyen faktörler şunlardır:

-DNA örneği

-Örnekte EDTA, sitrat gibi şelasyon yapan ajanların olması

-dNTP

-Protein

5. DNA Polimeraz

DNA polimerizasyonunda en önemli nokta DNA polimerazın doğruluğudur. Saflaştırılmış DNA polimerazlar, moleküler biyolojinin en önemli araçlarından biridir. En çok kullanılan DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bakteriden izole edilen ve yüksek sıcaklıklara dayanabilen bir enzimdir.^{149,150,152} DNA' nın DNA polimerazlar aracılığıyla sentezi, hem çok kompleks hem de önemli ölçüde sıralı bir işlemdir.

DNA polimerazın reaksiyona fazla miktarda konması ile oluşan PZR ürününün miktarı artmaz, ancak hata oluşma şansı artar. Serbest Mg+2 konsantrasyonunun azalması ve reaksiyonun pH'ının düşürülmesi ile Taq polimerazın doğruluğu arttırılabilir.

PZR basamakları için gereken en uygun ısılar, denatürasyon için 94 °C, annealing için 40-72 °C, polimerizasyon için 72 °C' dir.¹⁵² Bu üç basamak 25-40 kez tekrarlanır, daha sonra reaksiyonun soğuması için ürünler, PZR tipine göre 4 °C'ye alınır veya oda sıcaklığında saklanır.

Mikrobiyolojik örneklerde bakteri tanımlanması için genellikle yukarıda anlatıldığı gibi konvansiyonel bir PZR döngüsü kullanılırken, zaman zaman in-situ PZR, nested PZR, multipleks PZR, Real-time PZR (Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu), Arms-PZR, RFLP (Restriction fragment length polimorfizm), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), Q-PZR (Quantitative PZR) gibi varyasyonlara da başvurulmaktadır.^{150,152} Diş hekimliği biliminde örneklerin incelenmesi amacıyla en sık kullanılan PZR yöntemleri, sırasıyla:

Nested PZR: PZR'ın hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü arttırmak için geliştirilmiş bir yöntemdir.¹⁵³ Nested PZR tekniğinde, bir set primer kullanılarak yapılan ilk amplifikasyonu, ilk PZR ürünündeki daha küçük spesifik dizileri tamamlayan 2. setin kullanılması ile yapılan reamplifikasyon takip eder. nPZR, PZR ile karşılaştırıldığında, daha yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedir.^{152,154} Eğer amplifikasyonun ilk aşamasında spesifik olmayan diziler oluşur ise, bu non-spesifik ürünler genellikle 2. turda kullanılan nested primerleri tamamlamayacaktır. Amplifikasyonun 2. turu, azaltılmış bir doku debris ve ilk turda amplifiye edilemeyen diğer DNA dizileri ile yürütülür.¹⁵⁴ Yine de manüplasyon sırasında yapılan yanlışlıklar, yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir; bunu önlemek için özel stratejiler belirlenmelidir.¹⁵²

Multipleks PZR: Multipleks PZR, farklı bakteri türlerinin aynı anda saptanmasına olanak veren bir yöntemdir.²⁴ Her biri hedef bakteri türlerine özgü olan bir dizi farklı primer çifti, tek tüplü amplifikasyon reaksiyonunda kullanılır. Bu yaklaşım, analiz süresini, gerekli ayıraç ve kalıp miktarını asgariye indirir. Ancak bir multipleks PZR protokolü geliştirmek primer kombinasyonları ve reaksiyon durumları bağlamında çok kompleks bir süreçtir.¹⁵²

Real-time PZR: Çoğu PZR yöntemi niteliksel veya yarı nicelikselidir. Real-time PZR ise bundan farklı olarak reaksiyon boyunca ürünlerin devamlı olarak ölçülmesi ile karakterizedir. Bu ölçümün yapılabilmesi için, DNA'ya bağlanma yeteneğine sahip floresan boyalar kullanılabileceği gibi, hedef diziye özgül floresan maddeler ile işaretli oligonükleotid prob lar da kullanılabilmektedir. Prob kullanılan deneylerde, probun özgül diziye hibridizasyonu çoğunlukla floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemi ile saptanmaktadır. Genellikle takip edilen iki yaklaşım vardır:

Birincisi, bildirici (reporter) boya ile baskılayıcı (quencher) boyanın birbirinden ayrılması ile ortaya çıkan floresans; ikincisi ise, iki boyayı birbirlerine çok yakın bir uzaklığa getirerek oluşturulan floresan yayılımıdır.¹⁵² Birinci yaklaşıma TaqMan sistemi, ikinci yaklaşıma ise Light Cycler örnek olarak gösterilebilir. Özgül primer çiftine ek olarak, TaqMan sistemi, 5'- ucunda floresan reporter boya, 3'- ucunda da quencher boyadan oluşan florojenik probu kullanır.⁵⁹ Prob, PZR işlemi boyunca amplikonun tamamlayıcı zincirine bağlandığında, Taq DNA polimeraz, probu, primerlerden birinin uzaması sırasında parçalar ve boya molekülleri yer değiştirir ve ayrılır. Elektronik olarak uyarılmış reporter boya, artık quencher boya tarafından baskılanmaz ve floresan yayılımı, floresan detektörü tarafından görüntülenir. Her PZR siklusunda floresan yayılımının izlenmesi suretiyle reaksiyonun ilerlemesi gerçek zamanlı olarak kaydedilir ve örnekteki DNA miktarı belirlenir.¹⁵⁵ Light Cycler yaklaşımı, iki floresanla işaretli 2 oligonükleotide dayanır ki; bu oligonükleotidler, hedef PZR ürününün komşu bölgelerine yapışır. Bir boya, ışık kaynağı ile hareketlenir, enerjisini ikinci boyaya aktarır ve bu da daha sonra saptanacak olan belli bir dalga boyu yayar. Bu 2 boyanın spesifik floresan işareti üretmek için fiziksel olarak birbirlerine yakın olmaları gerekir. Eğer işaretlenmiş iki prob, spesifik PZR amplikonunun yakın bölgelerini hibridize ederse, iki boya arasındaki sonuç FRET, ürünün miktarı ile orantılı olarak floresanda bir yükselmeye neden olur. Real-time PZR ölçümleri, klinik örneklerdeki total bakteri sayısının yanı sıra, tek tek hedef türlerin de miktarının belirlenmesine olanak verir ve birkaç dakikada bile bakterileri saptayabilir.^{59,152,156,157}

2.8.3 PZR'ın Kültür Yöntemine Göre Sağladığı Avantajlar:¹⁵⁷

1. Hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türlerini saptayabilmektedir.

2. Yüksek özgüllük gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin tanımlanmasına olanak sağlar.

3. Klinik örneklerdeki mikrobiyal türleri üretilmelerine gerek duymaksızın saptayabilmektedir. Başka bir deyişle mikroorganizmaların vital olmaları şart değildir.

4. Kültür yöntemine ve diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre daha duyarlıdır.

5. Genellikle daha kısa zaman gerektirmektedir.

6. Örnekleme ve taşıma sırasında kontrollü anaerobik ortamlara gereksinim göstermemektedir. Zor üreyen bakteriler taşıma sırasında canlılıklarını yitirirler bile saptanabilmektedir.

7. Antimikrobiyal tedavi sırasında da kullanılabilir.

8. Az sayıda mikroorganizmayı bile saptayabilen bir yöntem olduğu için örnek miktarının az olması sorun yaratmaz.

9. Epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örnek kullanıldığında, örnekler düşük sıcaklıklarda saklanıp bir seferde incelenebilir.

PZR yöntemi ile bakteri türlerinin incelenmesi çoğunlukla periodontoloji ve endodonti alanında olmuştur. İncelenen bakteri türleri arasında, *B. Gingivalis*, *Actinomyces*, *T. denticola*, *Prevotella Intermedia*, *B. Forsythus*, *T. Forsythia*, *P. Endodontalis* sayılabilir.¹⁵⁹

Akut apikal apselerde endodontik patojenlerin araştırılmasında, PZR ile bakteri türleri ayırt edilmiştir. Kök kanallarından alınan bakteri örneklerinin PZR ile incelenmesi sonucunda ise odontojenik enfeksiyonlara neden olabilecek bakteri türleri tespit edilmiştir.^{159,160,161}

Periodontal hastalıkların mikrobiyolojik teşhis metotları arasında; mikroskop, gaz-likit kromotografi, PZR, ELIZA, immunofloresan, FISH tekniği ve kültür sayılabilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu yöntemlerin avantajları, dezavantajları, maliyeti ve hassasiyetleri arasında bir karşılaştırma yapılmıştır. Sonuç olarak kültür ve PZR yöntemi günümüzde en kullanışlı yöntem olduğu ortaya konulmuştur.^{162,163,164,165,166,167,168,169}

Anaerobik bakteri kültürü ve PZR, *A.actinomychetocominans*, *B. Gingivalis*, *Provetella intermedia*, *T. Forsythia*, *Fusobakterium nukleatum* ve *T. denticola* türlerinde mikrobiyolojik teşhisleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda PZR tekniğinin bu altı periopatojenin incelenmesinde oldukça basit, hızlı ve hassas bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur.^{162,163,170}

Oral florada PZR analizi için bakteri örnekleri daha çok dil dorsumundan, subgingival plaktan, supragingival bölgeden, kök kanallarından elde edilmiştir. Bunun yanında dental implant uygulanan hastalarda periimplantitis olgularında periodontopatik bakteri kolonizasyonunun osseointegre implantın periodontal cebinde PZR ile analizi yapılmıştır.

Diş çekimi sonrası meydana gelen alveolit olgularında PZR analizi ile bakteri analizi daha önce gerçekleştirilmemiştir. Alveolit olgularının meydana gelmesinde önemli bir etken olduğu düşünülen bakteri türlerinin (özellikle *T. denticola* ve *P. gingivalis*) hassas, düşük

maliyetli ve hızlı sonuç veren PZR tekniği ile analizi gerçekleştirilebilecektir. Ayrıca sağlıklı çekim soketinden elde edilecek kontrol verileri ile karşılaştırılarak bu konuda bakterilerin rolü açık bir şekilde anlaşılabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada sağlıklı diş çekim soketi ve alveolit tanısı konmuş çekim soketlerinden alınan örnekler Real-time PZR yöntemi kullanılarak incelendi. İncelenen bu örneklerde *P. gingivalis* ve *T. denticola* varlığı ve prevalansları incelenerek her iki grup arasında istatistiksel olarak karşılaştırmalar yapıldı.

3.1. Örnek Seçimi

Bu tez çalışmasında, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda diş çekimleri yapılan hastalardan örnekler elde edildi. Yaşları 17 - 62 arasında değişen 100 hastadan alınan örnekler incelendi. Hastaların diş çekim işlemi öncesinde ve sonrasında herhangi bir antibiyotik ve klorheksidin içeren gargara kullanmamış olmalarına dikkat edildi. Hastalar, postoperatif semptomlarına göre alveolit ve sağlıklı çekim soketi olarak iki gruba ayrıldı.

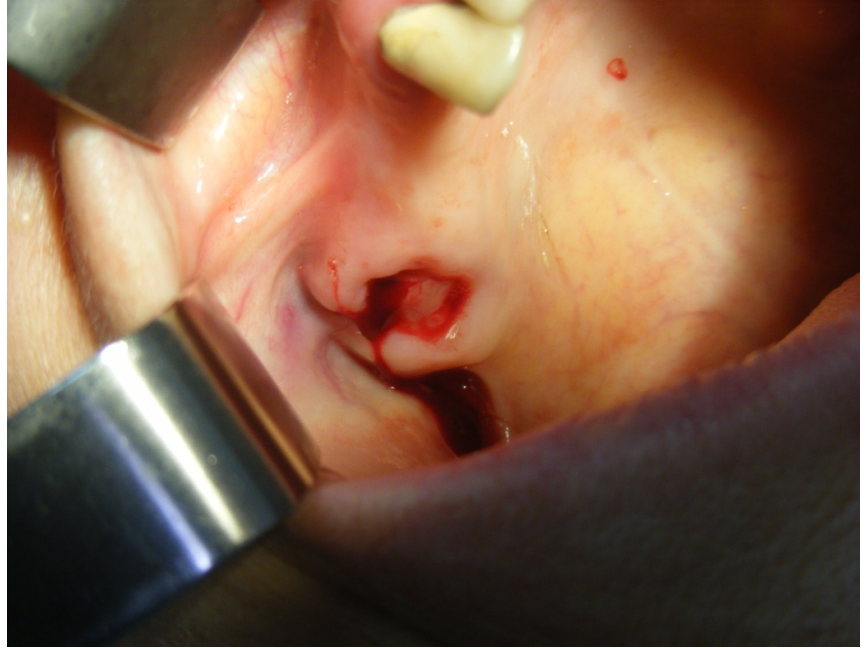
Alveolit olan hastalar, alt çenede kulağa ve şakak bölgesine, üst çenede alın ve göz çevresine yayılan ağrı kesiciler ile hafifletilemeyen şiddetli ağrılara neden olarak, bitkinlik ve huzursuzluğa sebep olan, diş çekiminden 24 - 72 saat sonra ortaya çıkan, kısmen veya tamamen bozulmuş pıhtı ve kötü ağız kokusu olması şeklinde değerlendirildi.^{3,14,21,104,105,106,108,}

Oral kontraseptif kullanan kadın hastalarda alveolit daha yüksek oranda meydana gelmektedir.^{122,123,124} 1960'larda oral kontraseptif kullanan hastalar ile alveolit arasında pozitif korelasyon kurulmuştur.¹²⁵ Östrojen, pirojen benzerleri ve bazı ilaçlar, endirekt olarak fibrinolitik sistemi aktive ederler. Böylece kan pıhtısında lizis meydana gelir ve

alveolit oluşumuna neden olur. Oral kontraseptifler ve fibrinolitik aktivite faktör II, VII, VIII ve X gibi faktörlerin sayısının artmasına neden olmaktadır,¹²⁶ bu nedenle bu çalışmaya katılan olguların oral kontraseptif kullanıp kullanmadığı da sorgulanmıştır.

3.2. Diş Çekim Soketlerinden Örnek Alınması

Diş çekimini takip eden 2. günde hastaların semptomları değerlendirilerek çekim kavitelerinden cerrahi küret (SMIC, China) kullanılarak örnekler alındı. Alınan örnekler, 0,5 ml % 0,09luk NaCl içeren ependorf tüplere konuldu ve -70 derecede donduruldu.



Resim 3: Diş çekimi sonrası sağlıklı iyileşme gösteren çekim soketi



Resim 4: Diş çekimi sonrası alveolit vakası



Resim 5: Diş çekim soketinden örnek alınması

3.3 Örneklerin PZR ile İncelemesi

Doku örnekleri 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Örneklerden bakteriyel DNA izolasyonu ve saflaştırılması için silika matriksli çevirme kolonu kit sistemi kullanılmıştır. Örnekler, sindirme tamponu içerisinde 55°C - 65°C'de eriyene kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra 100µl süspansiyon tamponu içinde süspanse edilmiştir. 10,000 X g ivmede 3 dakika santrifüj edildikten sonra, 180µl ikinci süspansiyon tamponu içinde süspanse edilmiştir. 20µl proteinaz K eklenerek 65°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Her 5 dakikada bir örnekler karıştırılmıştır. iki hacim (~400µl) bağlama tamponu eklenerek 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. 200µl saf etanol eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler kitin toplama tüplerine yerleştirilmiş çevirme kolonlarına yüklenerek 10,000 X g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki süzüntü dökülerek kolonlar üzerine 750µl yıkama tamponu eklenmiş ve 10,000 x g ivmede 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama sonrası çevirme kolonları, kalan alkolün uzaklaştırılması için 10.000 X g ivme ile 2 dakika santrifüj edilmiştir. Elüsyon basamağı için çevirme kolonları temiz mikrosantrifüj tüpleri üzerine alınmıştır. Kolonlara elüsyon tamponu olarak 10 mM Tris-Cl pH 9.0 eklenmiştir. Kolonlar 10.000 x g ivmesi ile 30 saniye santrifüj edilerek elde edilen süzüntü eş zamanlı PZT için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



Resim 6: 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde doku örnekleri

Örneklerde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı varlığını araştırmak için bu mikroorganizmaların 16S rDNA dizilerine özgül oligonükleotid primer ve floresan işaretli 5' hidroliz problemlerinin kullanıldığı eş zamanlı PZT yapılmıştır. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer ve floresan işaretli problemlerin dizileri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9: Eş zamanlı PZT deneylerinde kullanılan oligonükleotid primer ve floresan işaretli 5' hidroliz probuları.

Hedef Organizma	Primer / Prob Adı	Nükleotid dizisi	Kaynak
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg16SF	5'-TCGGTAAGTCAGCGGTGAAAC-3'	
	Pg16SR	5'-ATGGCAAGCTGCCTTCGCAAT-3'	
	Pg16SP	5'-FAM-CTCAACGTTCAAGCCTGCCGTTGAAA-TAMRA-3'	
<i>T. denticola</i>	Td16SF	5'-GAATGTGCTCATTTACATAAAGGT-3'	
	Td16SR	5'-GATACCCATCGTTGCCTTGGT-3'	
	Td16SP	5'-FAM-ATGGGCCCCGCGTCCCATTAGCT-TAMRA-3'	

Her bir tepkime tüpü, 1 X konsantrasyonda TaqMan ® eş zamanlı tepkime karışımı, ileri ve geri oligonükleotid primerlerin her birinden 0.7 uM, floresan işaretli 5' hidroliz probundan 0.2 uM ve 0.1 – 1 ug kalıp DNA içerecek şekilde 25 µl hacimde hazırlanmıştır. Herbir tepkime için pozitif kontrol kalıp DNA'sı olarak çalışılan organizmaların kültürler süspansiyonlarından kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA çözeltileri, negatif kontrol olarak ise PZT saflığında su kullanılmıştır. Termal döngü programı 95⁰C'de 10 dakika enzim aktivasyonu ve denatürasyonun ardından 40 döngü boyunca 30 saniye 95⁰C'de denatürasyon, 1 dakika 60⁰ uzama olacak şekilde düzenlenmiştir. Florometrik ölçümler her döngünün uzama basamağında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mutlak floresans değerleri ile çoğalma eğrileri çizilmiştir. Gürültü bandı belirlendikten sonra pozitif kontrolün çoğalma eğrisi verdiği, negatif kontrolde eğri gözlenmediği tepkimeler geçerli sayılarak analiz yapılmıştır. Çoğalma eğrisi elde edilen örnekler hedef organizma yönünden DNA pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 7: DNA ekstraksiyonu sırasında gerçekleştirilen santrifüj



Resim 8: DNA ekstraksiyonu sırasında gerçekleştirilen inkübasyon.



Resim 9: Gerçek zamanlı florometrik PZR cihazı

4. BULGULAR

Real-time PZR ile incelenen toplam 100 adet örneğin tümünde bakteri DNA'sı tespit edildi. Böylece kullanılan DNA ekstraksiyonu metodu doğrulandı ve PZR'ın kan, tükürük, vb. materyallerle inhibe olmadığı ve doğru olarak yürütüldüğü kesinleştirildi.

Çalışmamızda klinik tanısı belirlenen vakalardan elde edilen toplam 100 adet örneğin 45'i alveolit, 55'i sağlıklı çekim soketi grubuna aitti.

Klinik bulgulara dayanarak tanı konulan gruplar ve gruplardaki örnek sayıları Tablo 10' da gösterilmiştir.

Real-time PZR'la inceleme sonuçlarında 45 alveolit vakasının 33' ünde (%73,33) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 33 'ünde (% 60) ve toplamda 100 örneğin 66'sında *T. denticola* DNA'sı saptandı. *T. denticola* değişkeni bakımından alveolit ve sağlıklı soket grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($p=1,16$ $p>0.05$) (Tablo 10)

Tablo 10: Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *T. denticola* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Klinik tanı	Negatif (%)	Pozitif (%)	Toplam (%)
Alveolit	12 (26,6)	33 (73,33)	45
Sağlıklı soket	22 (40)	33 (60)	55
Toplam	34 (34)	66 (66)	100

$p=1,16$

Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 73'ünde *P. gingivalis* DNA'sı saptandı. 45 alveolit vakasının 34'ünde (%75,55) ve 55 sağlıklı çekim socketinin 39'unda (%70,9) *P. gingivalis* DNA'sı olduğu belirlendi. *P. gingivalis* değişkeni bakımından alveolit ve sağlıklı socket grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($p=0,45$ $p>0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11: Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *P. gingivalis* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Klinik tanı	Negatif (%)	Pozitif (%)	Toplam (%)
Alveolit	11(24,44)	34 (75,55)	45
Sağlıklı socket	16 (29,09)	39 (70,9)	55
Toplam	27 (27)	73 (73)	100

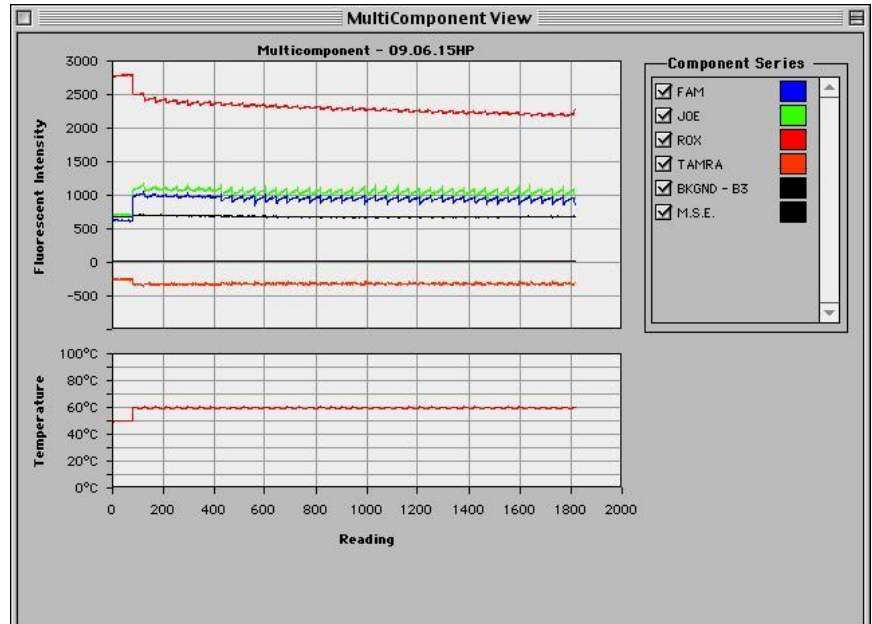
$p=0,45$

Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 54'ünde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı saptandı. Toplam 45 alveolit vakasının 27'sinde (%60) ve 55 sağlıklı çekim socketinin 27'sinde (%49,09) *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı olduğu belirlendi. *P. gingivalis* ve *T. denticola* değişkeni bakımından alveolit ve sağlıklı socket grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($p=0,809$ $p>0.05$)(Tablo 12)

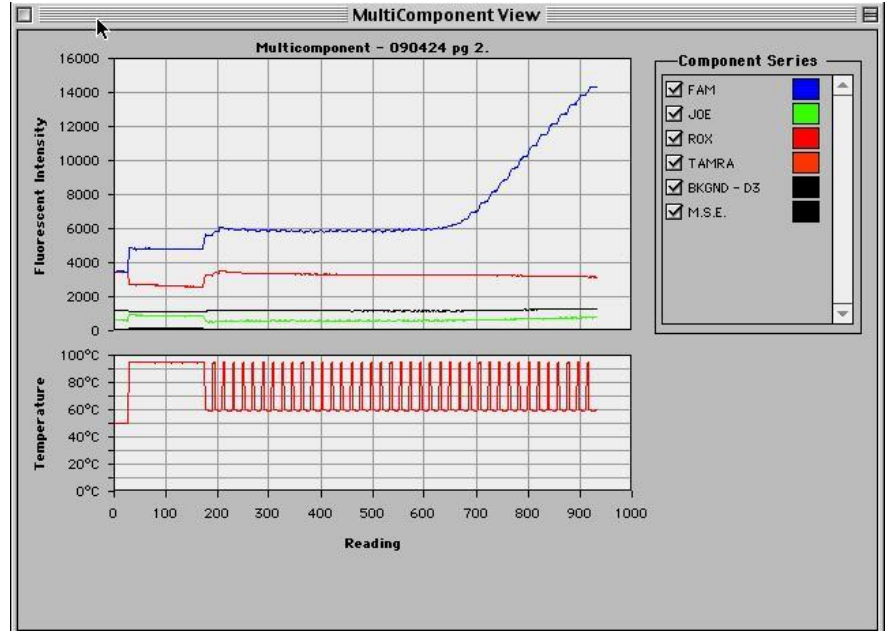
Tablo 12: Çalışmaya alınan hastaların kök kanal örneklerinde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı varlığının klinik tanı tiplerine göre dağılımı.

Klinik tanı	Negatif (%)	Pozitif (%)	Toplam
Alveolit	18 (40)	27 (60)	45
Sağlıklı soket	28 (50,90)	27 (49,09)	55
Toplam	46 (46)	54 (54)	100

p=0,809



Şekil 4: Diş çekim soketlerinden alınan örneklerde *T. denticola*'nın negatif sonucu.



Şekil 5: Diş çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. gingivalis*'in pozitif sonucu.

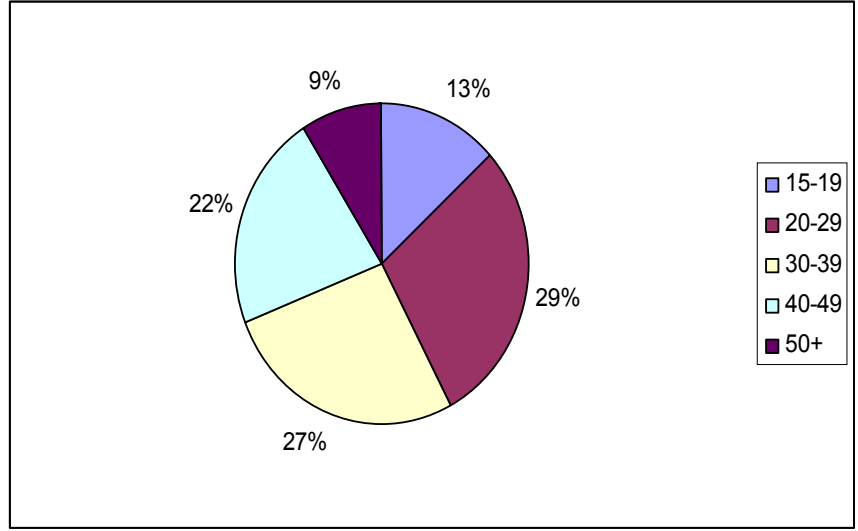
Çalışmamıza katılan 45 kişilik alveolit grubunda hastaların kadın ve erkek oranlarına göre dağılımı incelendiğinde; 35 kadın (%77,8) ve 10 erkek (%22,2) olarak belirlenmiştir (Tablo 13). Cinsiyet oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. ($p=0,034$, $p<0,05$)

Yaş ortalamaları ise 17-62 arasında (ortalama yaş 33,48) değişmektedir. Yaşa göre değerlendirme; 15-19, 20-29, 30-39, 40-49 ve 50+ olarak sınıflandırılarak yapılmıştır. Buna göre en sık alveolit ile karşılaşan grup, %29 oranında 20-29 yaş arasındır. (Şekil 6)

Tablo 13: Alveolit olgularında cinsiyete göre dağılım

Cinsiyet	Sayı	%
Kadın	35	77,8
Erkek	10	22,2
Toplam	45	100

p=0,034



Şekil 6: Alveolit olgularının yaşlara göre dağılımı

Tablo 14: Alveolit olgularının yaşlara göre sıklığı ve dağılımı

Yaş grubu	Sıklığı	%
15-19	6	13,3
20-29	13	28,9
30-39	12	26,7
40-49	10	22,2
50+	4	8,9
Toplam	45	100

Çalışmamızda alveolit olgusu tespit edilen diş çekim soketleri, alt çene posterior ve üst çene posterior olarak gruplandırıldığında; 45 olgudan 30'u (%66,7) alt çenede posterior bölgede, 45 olgudan 15'i (%33,3) de üst çene posterior bölgede olduğu saptanmıştır (Tablo 15). Diş çekim bölgeleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. ($p=0,041$ $p<0,05$)

Tablo 15: Alveolit olgularının diş çekim bölgelerine göre dağılımı

Diş çekim bölgesi	sıklığı	%
Üst çene posterior	15	33,3
Alt çene posterior	30	66,7
Toplam	45	100

$p=0,041$

Dişlerin çekim zorluğu açısından değerlendirildiğinde; travmatik olmayan normal diş çekimi ve travmatik olan komplikasyonlu veya kemik retansiyonlu diş çekimi olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre; alveolit olgularında atravmatik çekim yapılmış olan 14 hasta varken (%31,1) travmatik çekim yapılan 31 hasta (%68,9) vardır (Tablo 16). Diş çekim zorluğu açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. ($p=0,037$, $p<0,05$)

Tablo 16: Alveolit olgularının çekim zorluğuna göre dağılımı

<u>Çekim zorluğu</u>	<u>Sıklık</u>	<u>%</u>
Normal	14	31,1
<u>Komplikasyonlu</u>	<u>31</u>	<u>68,9</u>
Toplam	45	100

p=0,037

Alveolit olgularında hastaların sigara kullanıp kullanmadığına bakıldığında 45 alveolit saptanan hastadan 16'sının sigara kullandığı (%35,5), 29'unun ise sigara kullanmadığı (%64,5) tespit edilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17: Alveolit olgularının sigara alışkanlığına göre dağılımı

<u>Sigara Alışkanlığı</u>	<u>Sıklık</u>	<u>%</u>
Kullanan	16	35,5
<u>Kullanmayan</u>	<u>29</u>	<u>64,5</u>
Toplam	45	100

Real-time PZR ile incelenen 45 alveolit olgusunun 33 tanesinde *T. denticola* tespit edilirken 12 vakada ise tespit edilmemiştir. Sigara kullanımı ve *T. denticola* bakteri türünün varlığı arasında ilişki değerlendirildiğinde; 16 sigara kullanan hastada *T. denticola* bakteri türüne 14 vakada rastlanırken (%87,5), 2 vakada ise rastlanmamıştır (%12,5). 29 sigara kullanmayan hastada *T. denticola* bakteri türüne 19 vakada

rastlanırken (%65,5), 10 vakada rastlanmamıştır (%34,5) (Tablo 18). Bu sonuçlara göre sigara kullanımı ve *T. denticola* varlığı arasında anlamlı bir fark yoktur. ($p=0,164$ $p>0,05$)

Tablo 18 : Alveolit olgularında *T. denticola* varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	<i>T. denticola</i> (+)	<i>T. denticola</i> (-)	Toplam
Sigara kullanan	14	2	16
%	87,5	12,5	100
Sigara kullanmayan	19	10	29
%	65,5	34,5	100
Toplam	33	12	45
	73,3	26,7	100

$p=0,164$

Real-time PZR ile incelenen 45 alveolit olgusunun 34 tanesinde *P. gingivalis* tespit edilirken 11 vakada ise tespit edilmemiştir. Sigara kullanımı ve *P. gingivalis* bakteri türünün varlığı arasında ilişki değerlendirildiğinde; 16 sigara kullanan hastada *P. gingivalis* bakteri türüne 12 vakada rastlanırken (%75,0), 4 vakada ise rastlanmamıştır (%25,0). Toplamda 29 sigara kullanmayan hastada *P. gingivalis* bakteri türüne 22 vakada rastlanırken (%75,9), 7 vakada rastlanmamıştır (%24,1) (Tablo 19). Bu sonuçlara göre sigara kullanımı ve *P. gingivalis* varlığı arasında anlamlı bir fark yoktur. ($p=1,00$ $p>0,05$)

Tablo 19: Alveolit olgularında *P. gingivalis* varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	<i>P. gingivalis</i> (+)	<i>P. gingivalis</i> (-)	Toplam
Sigara kullanan	12	4	16
%	75	25	100
Sigara kullanmayan	22	7	29
%	75,9	24,1	100
Toplam	34	11	45
	75,6	24,4	100

p=1,00

Real-time PZR ile incelenen 45 alveolit olgusunun 27 tanesinde *P. gingivalis* ve *T. denticola* birlikte tespit edilirken 18 vakada ise tespit edilmemiştir. Sigara kullanımı ve *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin varlığı arasında ilişki değerlendirildiğinde; 16 sigara kullanan hastada *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerine 11 vakada birlikte rastlanırken (%68,8), 5 vakada ise rastlanmamıştır (%31,2). Toplam 29 sigara kullanmayan hastada *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerine birlikte 16 vakada rastlanırken (%55,2), 13 vakada rastlanmamıştır (%44,8) (Tablo 20). Bu sonuçlara göre sigara kullanımı ve *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın birlikte bulunması arasında anlamlı bir fark yoktur. (p=0,527 p>0,05)

Tablo 20: Alveolit olgularında *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın birlikte varlığı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	P.ging ve T.dent(+)	P.ging veT.den(-)	Top.
Sigara kullanan	11	5	16
%	68,8	31,3	100
Sigara kullanmayan	16	13	29
%	55,2	44,8	100
Toplam	27	18	45
	60	40	100

p=0,527

Çalışmamızda 45 alveolit vakasında 41 hasta ağrı şikayetinden bahsederken (%91,1), 4 hasta ise ağrısının olmadığını belirtmiştir (%8,9). Hastaların ağrı semptomunun sigara kullanmaları ile ilişkileri değerlendirildiğinde; sigara kullanan 16 hastanın 15'i ağrısının olduğunu belirtirken (%93,8), 1 hastanın ise ağrı şikayeti yoktur (%6,3). Sigara kullanmayan hastalarda ise 29 sigara alışkanlığı olmayan hastaların 26 tanesi ağrısının olduğunu belirtirken (%89,7), 3 hastanın ise ağrı şikayeti yoktur (%10,3) (Tablo 21). Bu veriler ışığında, alveolit olgularında sigara alışkanlığı ile ağrı semptomu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=1,000$ $p>0,05$).

Tablo 21: Alveolit olgularında ağrı semptomu ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	Ağrı(+)	Ağrı(-)	Top.
Sigara kullanan	15	1	16
%	93,8	6,3	100
Sigara kullanmayan	26	3	29
%	89,7	10,3	100
Toplam	41	4	45
	91,1	8,9	100

$p=1,000$

Çalışmamızda 45 alveolit vakasında ağız kokusu şikayeti olanlar 29 kişi (%64,4) iken 16 kişinin (%35,6) ağız kokusu şikayeti yoktur. Hastaların ağız kokusu bulgusu ve sigara kullanmaları ile ilişkileri değerlendirildiğinde; sigara kullanan 16 hastanın 13'ünde (%81,3) ağız kokusu şikayeti varken, 3 hastada (%18,8) yoktur. 29 sigara kullanmayan hastada ise 16 hastada (%55,2) ağız kokusu şikayeti varken 13 hastada (%44,8) yoktur (Tablo22). Bu duruma göre; sigara kullanımı hastalarda daha fazla ağız kokusuna sebebiyet veriyor denilebilir. Ancak, bu durum istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p=0,087$ $p<0,10$)

Tablo 22: Alveolit olgularında ağız kokusu ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	Ağız kokusu(+)	Ağız kokusu(-)	Top.
Sigara kullanan	13	3	16
%	81,3	18,8	100
Sigara kullanmayan	16	13	29
%	55,2	44,8	100
Toplam	29	16	45
	64,4	35,6	100

p=0,087

Alveolit olgularında meydana gelen kısmen ve tamamen pıhtı kaybı bulguları değerlendirildiğinde, 45 alveolit vakasından 41 vakada (%91,1) tamamen pıhtı kaybı gözlenirken, 4 vakada (%8,9) kısmi pıhtı kaybına rastlanmıştır. Sigara alışkanlığı olan hastalarla, kısmi ve tam pıhtı kaybı olan hastalar arasında; sigara kullanan 16 hastanın 16'sında da (%100) tamamen pıhtı kaybı meydana gelmiştir. Sigara kullanmayan 29 hastanın ise 25'inde (%86,2) tamamen pıhtı kaybı gözlenirken, 4 hastada (%13,8) ise kısmi pıhtı kaybı meydana gelmiştir (Tablo 23). Bu verilere dayanarak sigara kullanımı ile pıhtı kaybı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,281 p>0,05)

Tablo 23: Alveolit olgularında pıhtı kaybı ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

	Pıhtı kaybı tam	Pıhtı kaybı kısmi	Top.
Sigara kullanan	16	0	16
%	100	0	100
Sigara kullanmayan	25	4	29
%	86,2	13,8	100
Toplam	41	4	45
	91,1	8,9	100

p=0,281

Alveolit olgularındaki 35 kadın hastanın 28'inde (%80) çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. gingivalis* bakteri türüne rastlanırken, 7'sinde (%20) ise rastlanmamıştır. Alveolit bulgusu olan 10 erkek hastanın 6'sında (%60) çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. gingivalis* görülürken, 4'ünde (%40) ise görülmemiştir (Tablo 24). Bu veriler ışığında alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde bulunan *P. gingivalis* bakteri türü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,228 p>0,05)

Tablo 24: Alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde bulunan *P. gingivalis* bakteri arasındaki ilişki

	<i>P. gingivalis</i> (+)	<i>P. gingivalis</i> (-)	Top.
Kadın	28	7	35
%	80	20	100
Erkek	6	4	10
%	60	40	100
Toplam	34	11	45
	75,6	24,4	100

p=0,228

Alveolit olgularındaki 35 kadın hastanın 21'inde (%60) çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisine rastlanırken, 14'ünde (%40) ise rastlanmamıştır. Alveolit bulgusu olan 10 erkek hastanın 6'sında (%60) çekim soketlerinden alınan örneklerde *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisi de görülürken, 4'ünde (%40) ise görülmemiştir (Tablo 25). Bu veriler ışığında alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin bulunması arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=1,000 p>0,05)

Tablo 25: Alveolit olgularında cinsiyet ile çekim soketlerinde *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin bulunması arasındaki ilişki

	P.ging+Tdent (+)	P.ging+Tdent (-)	Top.
Kadın	21	7	35
%	60	40	100
Erkek	6	4	10
%	60	40	100
Toplam	34	11	45
	60	40	100

p=1,000

Alveolit olgularında çekim şekli ile bakteri türlerinin varlığı arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. 45 alveolit olgusundaki 14 normal diş çekimi yapılan diş çekim soketinin 12'sinde (%85,7) *T. denticola* bulunurken, 2'sinde (%14,3) ise bulunmamıştır. 45 alveolit olgusundaki 31 komplikasyonlu diş çekim soketinin 21'inde (%67,7) *T. denticola* bulunurken 10'unda (%32,3) ise bulunmamıştır (Tablo 26). Bu veriler ışığında alveolit olgularında çekim şekli ile *T. denticola* varlığı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,287 p>0,05)

Tablo 26: Alveolit olgularında çekim şekli ile *T. denticola* varlığı arasındaki ilişki

	<i>T. denticola</i> (+)	<i>T. denticola</i> (-)	Top.
Normal çekim	12	2	14
%	85,7	14,3	100
Komp. çekim	21	10	31
%	67,7	32,3	100
Toplam	33	12	45
	73,3	26,7	100

p=0,287

45 alveolit olgusundaki 14 normal diş çekimi yapılan diş çekim soketinin 10'unda (%71,4) *P. gingivalis* bulunurken, 4'ünde (%28,6) ise bulunmamıştır. 45 alveolit olgusundaki 31 komplikasyonlu diş çekim soketinin 24'ünde (%77,4) *P. gingivalis* bulunurken 7'sinde (22,6) ise bulunmamıştır (Tablo 27). Bu veriler ışığında alveolit olgularında çekim şekli ile *P. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p=0,717$ $p>0,05$)

Tablo 27: Alveolit olgularında çekim şekli ile *P. gingivalis* varlığı arasındaki ilişki

	<i>P. gingivalis</i> (+)	<i>P. gingivalis</i> (-)	Top.
Normal çekim	10	4	14
%	71,4	28,6	100
Komp. çekim	24	7	10
%	77,4	22,6	100
Toplam	34	11	45
	75,6	24,4	100

$p=0,717$

45 alveolit olgusundaki 14 normal diş çekimi yapılan diş çekim soketinin 9'unda (%64,3) *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisi de bulunurken, 5'inde (%35,7) ise bulunmamıştır. 45 alveolit olgusundaki 31 komplikasyonlu diş çekim soketinin 18'inde (%58,1) *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisi de bulunurken 13'ünde (%41,9) ise bulunmamıştır (Tablo 28). Bu veriler ışığında alveolit olgularında çekim şekli ile *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin birden bulunması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p=0,753$, $p>0,05$)

Tablo 28: Alveoilit olgularında çekim şekli ile *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin her ikisinin birden bulunması arasındaki ilişki

	P.ging ve T.dent(+)	P.ging ve T.dent(-)	Top.
Normal çekim	9	5	14
%	64,3	35,7	100
Komp. çekim	18	13	10
%	58,1	41,9	100
Toplam	27	18	45
	60	40	100

p=0,753

5. TARTIŞMA

Alveolit oluşumunda oral florada bulunan mikroorganizmaların rolü daha önceki bilimsel yayınlarda tartışılmıştır.^{6,7,8,9,14,15,16,,17,18,19,20,21,68,69} Bu mikroorganizmalar arasında özellikle *T. denticola* ve *P. gingivalis* önemli ölçüde yer almaktadır.

Bu mikroorganizmaların geleneksel kültür yöntemleri ile üretilmeleri oldukça zordur. *T. denticola* ve *P. gingivalis* 'kırmızı kompleks'in iki önemli üyesi olup kültür tekniğiyle çok zor üretilen mikroorganizmalardır.^{21,35,58} Bu mikroorganizmalar daha çok periodontal ve kök kanal patojenleri olarak bilinmektedir. Bu çalışmada alveolit olguları üzerinde ilk kez moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak bu bakterilerin varlığı ve patojeniteleri araştırılmıştır.

Moleküler mikrobiyolojik yöntemlerle mikroorganizmaların mikrobiyal DNA'larının saptanması ile enfeksiyöz hastalıklar hakkındaki bilgide önemli ölçüde artışa neden olmuş ve çoğu hastalığın etkili ve hızlı tanısına olanak sağlamıştır.^{172,173} Moleküler mikrobiyolojik teknikler arasında en fazla duyarlılık ve özgüllüğü PZR yöntemi göstermektedir. Örneğin DNA hibridizasyon yöntemi PZR ile karşılaştırıldığında örnek başına 10³ hücre saptayabilirken, PZR tek bir hücreyi bile saptayabilecek duyarlılığa sahiptir.¹⁷⁴ PZR, diğer saptama yöntemlerinden en az 10 - 100 kat daha duyarlıdır.¹⁵⁰ Ayrıca PZR yönteminde, saptama için kültür yönteminde olduğu gibi bakteri üretilmesi işlemine gerek duyulmamaktadır. Bu özellik, çekim soketlerinde sıkça rastlanan ve zor üreyen anaerobik bakterilerin tanımlanmasında önemli bir avantaj oluşturur. Anaerobik bakterilerin tanımlanması, geleneksel kültür yöntemleri kullanıldığında 7-14 gün gerektirirken, PZR ile yalnızca birkaç saatte başarılabilmektedir.¹⁵⁰ Hatta bu yöntemin ilerlemesi ile 'altın

standart' özelliğinde olan kültür yöntemlerinin güncelliği ve etkinliği sorgulanmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada tüm bu avantajlarından dolayı *T. denticola* ve *P. gingivalis*in araştırılmasında PZR yöntemi tercih edilmiştir. PZR yönteminin uygulanma tekniğindeki farklılıklar nedeniyle çeşitli varyasyonları bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda, diğer PZR tekniklerine göre daha duyarlı, özgül ve hızlı ölçüm yapabildiği düşünülen "Real-time PZR" kullanılmıştır.^{175,176}

P. gingivalis ve *T. denticola* daha önceden enfekte kök kanal olgularında ve periodontal patojen olarak hem geleneksel hem de moleküler biyolojik yöntemlerle incelenmiştir. Oral florada PZR analizi için bakteri örnekleri daha çok dil dorsumundan, subgingival plaktan, supragingival bölgeden, kök kanallarından da örnek elde edilmiştir. Bunun yanı sıra dental implant sonrası görülebilen periimplantitis olgularında periopatojen bakteri kolonizasyonunun PZR ile analizi yapılmıştır. Yani PZR yöntemi ile bakteri türlerinin incelenmesi çoğunlukla periodontoloji ve endodonti alanında olmuştur. İncelenen bakteri türleri arasında, *B. Gingivalis*, *Actinomyces*, *T. denticola*, *Prevotella Intermedia*, *B. Forsytus*, *T. Forsythia*, *P. Endodontalis* sayılabilir.¹⁵⁹ Çalışmamızda incelenen bakteri türleri ve incelenen örnekler farklılık göstermektedir. Diş çekimi sonrası meydana gelen alveolit olgularında PZR analizi ile *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türlerinin incelenmesi daha önce gerçekleştirilmemiştir.

T. denticola'nın bazı yüzey proteinleri adeziv, sitotoksik etkiler gösterir ve doku yıkıcı aktivitelere sahiptir. Bu proteinlerin başlıcaları msp ve CTLP'dir.^{46,47} Bunlardan msp proteini, *T. denticola*'nın dişeti fibroblastlarına adezyonunda önemli role sahiptir.^{35,49} CTLP yani diğer adıyla dentilisin, doku yıkımına neden olan kollajenolitik konak

enzimlerinin aktivasyonuna yol açabilmektedir.²⁷ *T. denticola*, konak hücrelere ve diğer doku elemanlarına adezyon gösterebilmekte ve hücrelere ve dokulara invaze olabilmektedir.⁴⁶ Diş dokularında hasarın gelişiminde spiroketlerin hareket yeteneği, önemli rol oynamaktadır. Bu hareketliliği sağlayan flajella, önemli bir virülans faktörü olmakla beraber flajellaya sahip olmayan spiroketler konağı enfekte etmekte başarısız olmaktadır.⁴⁷ *T. denticola*'nın bu tip virülans faktörleri ile hücrelere adezyon göstererek dokulara invaze olması, fibroblastik aktiviteyi bozması, böylece doku yıkımına neden olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca *T. denticola*'nın sistalsin denen antijenik proteini, eritrositlerin aglütinasyonu ve lizisi ve böylece hemoglobinin oksidasyon ve sülfürasyonuna sebep olduğu ve bu sayede hücre içinde ve dışında hemolitik aktiviteye neden olduğu düşünülmektedir.^{59,60}

T. denticola önemli ölçüde dişeti fibroblastlarına adezyon özelliğine sahiptir.³⁵ *Tr.denticola* türlerinin dış membranlarında bulunan ve adezyonda etkili olan dentisin, fibronektin, IgA, IgG, albumin, transferrin, fibrinojen ve diğer biyoaktif peptidleri salgılayan geniş bir substrata karşı enzimatik etki göstermektedir.^{52,53} Ayrıca doku yıkımına neden olan kollajenolitik konak enzimlerinin aktivasyonuna yol açabilmektedir.²⁷ Alveolitin oluşum mekanizmasında da bilindiği gibi fibrinolitik aktivitenin bozulması söz konusudur. Bizim çalışmamızda bu mekanizma ve bakteri ilişkisi göz önüne alınmıştır. Ancak incelenen olgularda, *T. denticola* ve alveolit vakaları arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Nitzan ve ark.¹¹³ perikoronitiste etken olan mikroorganizmaların alveolit oluşumuna neden olabileceğini belirtmişlerdir. Özellikle *T. denticola*'nın alveolit oluşumunda önemli bir etken olduğunu savunmuştur. Buna ilaveten çocukluk döneminde alveolitin meydana gelmemesinin nedeni olarak da bu mikroorganizmanın o çağlarda ağızda bulunmadığını göstermektedir.¹¹³ Bizim yapmış olduğumuz incelemeler

sonucunda sağlıklı çekim soketleri ve alveolit olguları arasında *T. denticola* prevalansı açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.

P. gingivalis'in sinüzit, apandisit, diş ve dişeti enfeksiyonlarına neden olabileceği bilinmektedir. Hatta bakteriyemi yoluyla endokardite de neden olabilmektedirler.⁶⁴ Ağız florasında en sık periodontal dokularda görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur.^{22,13,63,66,67} Çalışmamızda diş çekim soketlerinde varlığının bu dokulardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çoğunlukla subgingival bölgelerde ve dişeti oluşunda, özellikle apseli dişler ve semptomatik peri-radiküler lezyonlardan izole edilebilmektedir.^{63,65}

Store ve ark.⁶⁹, mandibulada osteoradyonekroz olgularında yapılan bir çalışmada, rezeke edilen 12 osteoradyonekrotik mandibulanın derin medullar yapılarında en predominant organizma olarak *P. gingivalis*'i tespit etmiştir. Bu da bize doku iyileşmesinin oldukça zor ve geç olduğu osteoradyonekroz vakaları gibi iyileşmenin geciktiği olgularda *P. gingivalis*in etkili olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanısıra heminden zengin besi yerinde üretilen *P. gingivalis*in hastalık yapabilme yeteneğinin fazla olduğu da rapor edilmiştir. Hemin varken bakterinin ortama saldıgı butirik asit dişeti dokusunda IL-6, IL-8, IL-11 salınmasını artırır ve T lenfositleri için toksiktir, T lenfositlerin apoptozisini artırır, dişeti fibroblastlarını doza bağılı olarak süprese eder.⁶³ Fibrinolitik sistem enflamatuvar lezyonların yayılmasını ve konnektif dokunun bozulmasını sağlayan ekstrasellüler proteolizisi düzenlediği için enflamatuvar reaksiyonlarda önem taşımaktadır. Bu nedenle *P. gingivalis*in alveolite neden olabilen etkilerinden biri de fibrinolitik aktivite neticesinde olabileceği ileri sürülebilmektedir.⁹⁶

P. gingivalis konaktaki dişeti epitel hücrelerine, çeşitli konak proteinlerine fimbrialar aracılığı ile tutunur.⁶³ *P. gingivalis* fimbriyaları ayrıca sitokin üretimi ve kemik rezorbsiyonuna neden olmak gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere de sahiptir.⁷⁵ Konak hücrelerin içerisinde 24 saatten fazla canlı kalabilir. Diş dokularında bu kadar uzun süre canlı kalabilmeleri ve burada rezorbsiyona neden olabilmeleri diş çekimi sonrasında da bu bakterinin alveolit oluşumundan sorumlu olabileceğinin bir göstergesi olarak da açıklanabilir.

Kollajenaz, *P. gingivalis* tarafından salgılanan önemli ve etkin bir virölans faktörü olarak üretilir ve bunu üreten tek bakteri *P. gingivalis*'tir.^{81,82} Kollajenaz geni, kök çevresinde meydana gelen hasarlarda da *P. gingivalis* için önemli bir yayılım faktörü olarak düşünölmektedir.⁸³ *P. gingivalis* için çok önemli bir virölans faktörü ve kemik rezorbsiyonunda rol oynayan ana etken olarak ileri sürölen lipopolisakkarit (LPS) konak dokunun harabiyetine neden olan biyolojik aktiviteleri yöneten bir moleküldür.^{78,84,85} LPS ve periapikal lezyon varlığı arasında doğru orantı varlığı düşünölmektedir.^{78,85} Bu tip kök çevresi ve kemik rezorbsiyonuna etkilerinin fazla olmasından dolayı da diş çekimi sonrası oluşabilecek alveolit vakalarında etkisinin oldukça fazla olduğu düşünölebilir.

P. gingivalis, çoğu diş ve dişeti enfeksiyonunda yer almaktadır ve birçok yıkıcı virölans faktörüne sahiptir.²² Sürmekte olan 3. Molar dişlerinin 5-7 mm'lik periodontal ceplerinde *P. gingivalis* PZR ile araştırılmış ve %20 oranında tespit edilmiştir.⁶⁸ Bizim alışmamızda alveolit gözlenen 30 adet alt molar diş çekim soketlerinin 22'sinde *P. gingivalis* saptanmıştır.

P. gingivalis enfeksiyonların yayılmasına neden olan fibrinolitik ve fibrinolitik aktivite göstermektedir.^{96,97} Gösterdiği bu

aktivite nedeniyle alveolit olgularına neden olabilir. Bu yüzden çalışmamızda *P. gingivalis* alveolit olgularında ve sağlıklı çekim soketlerinde karşılaştırmalı olarak incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Yapılan istatistiksel analizler, sağlıklı çekim kavimleri ve alveolit olgularında *P. gingivalis* varlığının anlamlı ölçüde bir farklılık göstermediğini saptamıştır.

‘Kırmızı kompleks’in iki üyesi olan *P. gingivalis* ve *T. denticola*’nın arasındaki sinerji bir çok çalışmada gösterilmiştir.^{34,35,43} Hatta bu sinerjinin bu bakterilerin sahip oldukları bazı virölans faktörlerinden kaynaklanıyor olabileceği de ileri sürülmektedir.⁴⁴ Çalışmamızda Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 54’ünde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA’sı saptanmıştır. Toplam 45 alveolit vakasının 27’sinde (%60) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 27’sinde (%49,09) *P. gingivalis* ve *T. denticola* her ikisinin birden DNA’sının var olduğu belirlenmiştir.

Fibrinolitik aktivite, *P. gingivalis* ve *T. denticolada* gözlemlenen bir durumdur. Her iki mikroorganizmanın periodontal hastalıklar ve akut nekrotizan ülseratif gingivitide bir arada olduğu önceki çalışmalarda saptanmıştır.⁹⁹ Ancak, bizim çalışmamızda sağlıklı çekim soketleri ve alveolit olguları arasında *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakterileri prevalansı açısından herhangi anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Alveolit olgularında antibiyotik kullanımı hakkında yapılan pek çok çalışma vardır. Bunlardan özellikle alveolite neden olabildiklerini düşündükleri anaerobik bakteriler üzerine etkili olan metronidazol, penisilin, klindamisin ve eritromisin kullanımı hakkında araştırılmıştır.^{3,20,121,177} Buna karşın, alveolit vakalarında antibiyotik kullanımını önermeyen otörler de vardır.¹⁷⁸ Bizim çalışmamızda, son bir ayda antibiyotik kullanmamış olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Dolayısıyla antibiyotik kullanımının bakteriler ve alveolit oluşumu üzerine etkisinden bağımsız olarak vakalar incelenmiştir.

Alveolit olgularının etiyolojisinde bakteriyel enfeksiyon, travma ve biyokimyasal ajanlar da yer almaktadır. Birn 1973'te plazminojeni plazmine dönüştüren fibrinolitik aktiviteyi alveolit olgularında tanımlamış ve özellikle diş çekim soketlerinde pıhtı kaybının buna neden oluyor olduğunu göstermiştir.^{105,179,180} Bu pıhtı kaybına neden olabilecek anaerobik bakteriler de (özellikle *T. denticola* ve *P. gingivalis*) çalışmalarda tanımlanmıştır. Bu bakterilerin varlığı, çalışmamızda alveolit oluşumu ile anlamlı bir fark oluşturmadığı görüşünden hareketle daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

P. gingivalis 30 µg/ml' den düşük konsantrasyonlarda klorhekzidin (Kh) içerisinde bile üreyebilir. Hücre gövdesinin ve veziküllerin enzimatik aktiviteleri kullanılan Kh den hiç etkilenmemektedir. Tam aksine, düşük konsantrasyonda (<30 µg/ml) KH ile muamele edilen bakteriler, membran geçirgenlikleri bozulduğu için ortama daha fazla vezikül, tripsin benzeri proteazlar, alkalın fosfataz ve N-asetil-B-glukozaminidaz gibi enzimler salarlar. Fakat bu veziküllerinin ve enzimlerinin litik etkileri büyük ölçüde kayıp olur. Bu nedenle, Kh kullanılacaksa 30 µg/ml konsantrasyondan daha yoğun kullanılmalı ve sadece profilaktik amaçlarla uygulanmalıdır.⁶³ Larsen ve ark.¹⁸¹ yaptığı çalışmada işlem öncesi uygulanan Kh gargaranın alveoliti %60 oranında azalttığını göstermişlerdir. Yine Rango ve Szkutnik¹³¹ işlem öncesi 30 sn %0,12'lik Kh uygulanan vakalarda alveolit insidansının % 50 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Hermesh ve ark.¹³⁰ da işlemden bir hafta önce ve işlemden bir hafta sonra 30 sn %0,12'lik 15 ml Kh uygulanan hastalarda %38 oranında alveolit olgularında azalma kaydetmiştir. Benzer bir çalışmada Tjenberg¹³³ de Kh kullanımının alveolit insidansında azalma sağladığını rapor etmiştir. Bu nedenle çalışmamıza, alveolit oluşum insidansını

azalttığı bilinen işlem öncesi veya sonrası %0,12'lik Kh ağız gargarasını kullanmayan hastalar dahil edilmiştir.

Yara çevresindeki fibrin birikimi, yara çevresinde bulunan dokuları, mikroorganizma invazyonuna karşı korumakta ve mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır.⁹⁹ Organizmada fibrin oluşumunu sınırlayan veya oluşan fibrini imha eden mekanizmalar da mevcuttur. Özellikle plazmin, oluşan fibrin yapının çözülmesine neden olur ki buna fibrinolizis adı verilmektedir.⁹⁹ Oral bölgede fibrinolitik aktiviteye sahip mikroorganizmalar saptanmıştır. *T. denticola*'nın fibrinolitik aktivitesi hücre dışında gerçekleşmektedir.¹⁰⁰ Alveolit oluşumu ile ilgisi olduğu düşünülen mikroorganizmalar arasında *Streptococci* (*S. Viridans*, *S. Lactis* ve *Corynebacteria xerosis*) de sayılmaktadır.¹⁰¹ *Staphylococuss aureus* ailesi ve β hemolitik streptokoklar fibrinolitik aktiviteye sahiptir özellikle *P. gingivalis* ve *T. denticola* (plazmin benzeri fibrinolitik aktivite uygulayarak) periodontal hastalıklar ve alveolit olgularından da sorumlu tutulmaktadır. Fibrinojenolitik ve fibrinolitik aktivite ya da her ikisini de gösteren mikroorganizmalar arasında *T. denticola* ve *P. gingivalis* dışında *Actinomyces* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Propionobacterium* sp. ve *Staphylococuss aureus* da sayılabilmektedir. Bu bakteri türleri arasında da özellikle moleküler biyolojik yöntemlerle karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Birn, diş çekimi sonrasında oluşan kan pıhtısında fibrinolitik aktivitenin diş çekimi sonrası ikinci günde ortaya çıktığını göstermiştir.⁹⁹ Çünkü kan pıhtısındaki antiplazmin, pıhtıyı parçalamadan sorumlu olan plazminden önce ortadan kaybolmaktadır.⁹⁹ Bu nedenle hastalar diş çekiminden iki gün sonra değerlendirilmiştir.

Diş çekimi sonrası iyileşme sırasında kan akımının zayıf olması da alveolite neden olabilmektedir.¹²⁰ Lokal anestezilerdeki vazokonstrüktörler de bir diğer patogenetik faktördür. Bazı araştırmacılar periodontal intraligamenter anestezinin blok ve infiltrasyonel enjeksiyonlardan daha fazla alveolit oluşumuna yol açtığını iddia etmektedir.^{3,121} Bunun yanı sıra Tsirlis ve ark.¹⁸² her iki anestezi uygulaması arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Ayrıca Turner, 1274 diş çekimi uyguladığı bir çalışmada ekstra 2ml yapılan lokal infiltratif anestezinin alveolit oluşum riskini yükselttiği fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığını da rapor etmiştir. Bazı araştırmacılar, lokal anestezikteki vazokonstrüktörün alveolit oluşumunda büyük bir etkisi olduğunu düşünmemektedir.¹⁴⁰ Otörler, vazokonstrüktör içeren lokal anestezi maddelerin kan akımını yavaşatabileceğini, bunun da oksijen iletimini azaltabileceğini bu yüzden de iyileşmenin gecikeceğini savunmaktadır. Ayrıca epinefrinin de fibrinolizisi arttırdığını da rapor edilmiştir.¹⁸³ Bizim çalışmamıza dahil olan hastaların tümüne standart rejonel ve lokal anestezi teknikleri (üst çenede tüber anestezi, alt çenede mandibular ve infiltratif anestezi) uygulanmıştır.

1960'larda oral kontraseptif kullanan hastalar ile alveolit arasında pozitif korelasyon kurulmuştur.¹²⁵ Oral kontraseptif kullanan kadın hastalarda alveolit daha yüksek oranda görüldüğü rapor edilmiştir.^{122,123,124} ve Lilly ve ark.¹⁰⁹ alveolit olgularının oral kontraseptif kullanan hastalarda kullanmayanlara oranla üç kat daha fazla görüldüğünü bildirmiştir. Garcia ve ark.¹⁸⁴ de bu bulguları desteklemiştir. Östrojen, pirojen benzer bazı ilaçlar, endirekt olarak fibrinolitik sistemi aktive ederler. Böylece kan pıhtısında lizis meydana gelir ve alveolit oluşumuna neden olur. Catellani ve ark.¹⁸⁵ oral kontraseptiflerdeki östrojen dozunun azalmasıyla alveolit olgularının da azaldığını göstermiştir. Oral kontraseptifler ve fibrinolitik aktivite faktör II, VII, VIII ve X gibi faktörlerin sayısının artmasına neden olmaktadır.¹²⁶ Bu nedenle çalışmamıza katılan olguların oral kontraseptif

kullanıp kullanmadığı sorgulanmış ve oral kontraseptif kullanmayan hastalar seçilmiştir.

Sweet ve Butler¹²⁵, alveolit olgularının kadınlarda %4,1 oranında iken erkeklerde %0,5 olarak görüldüğünü göstermiştir. Tjenberg¹³³, alveolit kadınlarda erkeklere oranla 5 kat daha fazla görüldüğünü rapor etmiştir. Garcia¹⁸⁴ ve Lilly¹⁰⁹ 'nin de araştırmaları bu çalışmaları desteklemektedir. Catellani ve ark.¹⁸⁵, oral kontraseptif kullanımının ve menstural dönemde östrojen hormonundaki değişikliklerin neticesinde fibrinolitik aktivitedeki artışın alveolite neden olabileceğini ve bu yüzden kadınlarda daha yüksek oranda görüldüğünü savunmuşlardır. Çalışmamızda alveolit olguları arasında kadın ve erkek oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır. Kadınlarda alveolit olgusu daha fazla görülmüştür (%77,8) ($P<0,05$).

Çoğu literatürde alveolitinin çocukluk çağına meydana gelmediğini ve hastanın yaşı ile bu insidansın arttığı belirtilmiştir.^{1,180,186,187} McGregor¹⁸⁸ ise alveolitinin üçüncü ve dördüncü dekatta en yüksek insidansa görüldüğünü rapor etmiştir. Diğer yandan o yaş aralığı sigara kullanımının yüksek oranda görüldüğü yaşlardır.¹⁸⁹ Çalışmamızda alveolit olgularında yaş ortalaması 33,48 (17-62) olup, en sık alveolit ile karşılaşan grup, %29 oranında 20-29 yaş arasındadır.

Alveolit olgularının daha çok alt çene molar bölgede meydana geldiğini belirten pek çok çalışma vardır. Hatta mandibular üçüncü molar dişlerde oran %20-30'a kadar çıkabilmektedir. Bu durumun o bölgede özellikle gömülü diş çekimi sonrası komplikasyon oranının yüksek olması ve normal diş çekimine nazaran daha travmatik bir işlem olması ile ilgili olduğu çalışmalarda belirtilmiştir.^{108,112,123,140} Çalışmamızda alveolit vakalarında üst çene posterior bölge ve alt çene posterior bölgede diğer çalışmalara paralel şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmuştur. Alt çene posterior bölgede yapılan diş çekimlerinde alveolit olgusu daha fazla görülmüştür (%66,7) ($p<0,05$).

Bazı araştırmacılar, cerrahi travma ile alveolit arasında bir ilişki bulamamışlar da çoğu literatür bu ilişkiyi desteklemektedir.^{105,116,128,139,171,179,188,190} Travma, diş çekimi sonrasında olması gerektiği şekilde trombozisi engellemekte, kan akışını azaltmakta ve soketin etrafındaki kemikte basınca neden olmaktadır.³ Bazı araştırmacılar travmanın doku dayanıklılığını azalttığı ve bundan dolayı yaranın anaeroblar tarafından enfekte olduğunu belirtmişlerdir.^{3,118} Bir hücrelere zarar verildiğinde alveolar kemikten açığa çıkan FXII ya da Hageman faktörün, kan, doku ve endotelial plazminojen aktivatörlerinden ürokinaz gibi fibrinolitik aktivite doku aktivatörlerini açığa çıkardığını belirtmiştir.¹⁰⁵ Çalışmamızda da alveolit vakalarında travmatik çekim olarak değerlendirilen grup ile atravmatik çekim olarak değerlendirilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Travmatik çekim yapılan hastalarda alveolit olgusu daha fazla görülmüştür (%68,9).

Sigara, nötrofil kemotaksisini ve fagositozunu azaltmakta ve immunoglobulin üretimini engellemektedir. Meehan ve ark.¹⁹¹ 3541 diş çekimi üzerinde yaptığı araştırmada diş çekimi sonrası sigara kullanımının kanın diş çekim soketlerinde birikmesinin oldukça azaldığı ve ağır içicilerde (>20 sigara/gün) sigara içmeyenlere oranla alveolit insidansını arttırdığını ortaya çıkarmışlardır. Nikotinin oral mukozada absorpsiyonu vazokonstriktör etki görmektedir.¹⁹¹ Sweet ve Butler 400 mandibular diş çekimi üzerinde yaptığı çalışmada sigara kullananların kullanmayanlara oranla daha yüksek alveolit insidansına sahip olduğunu rapor etmişlerdir.¹²⁷ Aynı araştırmacılara göre bu risk, günde on adetten fazla içenlerde %12, günde bir paketten fazla içenlerde ise %20 oranında artmaktadır. Sigara içimi sırasında pıhtının negatif basınçla ortadan kaybolması da diğer bir problemdir.^{127,192} Çalışmamızda alveolit

vakalarında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Alveolit olgularında sigara içiminin bakteri türleri ile ilişkileri de değerlendirilmiştir. Ancak *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türleri ile sigara kullanımı arasında herhangi anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Alveolit alt çenede kulağa ve şakak bölgesine, üst çenede alın ve göz çevresine yayılan ve ağrı kesiciler ile hafifletilemeyen şiddetli ağrılarının olduğu bir durumdur.^{14,104,105,106} Birn, ağrı oluşumunun diş çekim soketinde kinin formasyonu ile ortaya çıktığını ortaya koymuştur. Kinin diğer enflamatuvar medyatörlerle ve aljojenik substanslarla beraber primer afferent sinirlerini aktive etmektedir.¹⁴⁷ Plazmin de alveolar kemik iliğinde kallikreini kinine dönüştürmektedir. Bu sebeple plazmin alveolite karakteristik iki olgudan sorumludur; birincisi nörolojik ağrı diğeri ise kan pıhtısının bozulmasıdır.¹⁴⁷ Alveolit olgularında hastalarımızın %91,1 oranında ağrı varlığı tespit edilmiştir.

Sigara kullanımının alveolit oluşumu ile ilgisi daha önce ortaya konmuştur. Ancak alveolit olgularında ağrı şikayeti olanların sigara kullanımına bakıldığında herhangi anlamlı bir ilişki olmadığı ortaya çıkmıştır. ($p>0,05$)

Klinik ve laboratuvar çalışmalar alveolitin patogenezinin nedeni olarak fibrinolitik aktivitenin artması olduğunu göstermiştir.^{105,142,143,144} Birn, kan pıhtısının parsiyel veya tam lizisi ve destrüksiyonunun inflamasyon son ucunda doku kinazlarının ortaya çıkmasına ve böylece kandaki plazminojenin direkt ya da indirekt aktivasyonuna neden olduğunu iddia etmiştir.¹⁰⁵ Alveolit olgularında meydana gelen kısmen ve tamamen pıhtı kaybı bulguları değerlendirildiğinde, 45 alveolit vakasından 41 vakada (%91,1) tamamen pıhtı kaybı gözlenirken, 4 vakada (%8,9) kısmi pıhtı kaybına rastlanmıştır.

Ayrıca çalışmamızda sigara kullanımı ile pıhtı kaybı arasındaki ilişki de değerlendirilmiş ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0,05$)

Alveolit vakalarının cinsiyetler arasında anlamlı derecede farklı oranlarda olduğu daha önceki çalışmalarda ve bizim çalışmamızda da ortaya konulmuştur.^{109,125,180, 184,185} Alveolit oluşumuna neden olabilen *P. gingivalis* ve *T. denticola* bakteri türlerinin ayrı ayrı veya birlikte diş çekim soketlerinde bulunuyor olması ve cinsiyetler arasında fark oluşturup oluşturmadığı çalışmamızda sorgulanmıştır. Ancak bakteri türleri ve cinsiyet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0,05$)

Alveolit olguları ile travma arasındaki ilişki pek çok çalışmada ve bizim çalışmamızda da ortaya konmuştur.^{105,116,128,139,171,179,188,190} Diş çekim zorluğu ile alveolit oluşumuna neden olabilen *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Literatür gözden geçirildiğinde bu çalışma diş çekim soketlerinde *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakterilerinin PZR yöntemi ile incelendiği ilk çalışmadır. *P. gingivalis* ve *T. denticola*'nın periodontal ve endodontik patojen olarak PZR teknikleri ile incelendiği pek çok çalışma vardır. Ancak çekim kavitesinde varlığı ilk defa tarafımızdan moleküler mikrobiyolojik teknikler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kültür yöntemiyle üretilmesi zor veya imkansız olan mikroorganizmaların 16S rRNA bölgelerinin PZR kullanılarak çoğaltılması moleküler mikrobiyolojide çığır açmıştır. PZR kültür yöntemlerine göre daha hassas, özgül ve hızlıdır, ayrıca daha kesin sonuçlar sağlar. Bu metotların yerinde kullanımı, diş çekim soketlerinde oluşabilen alveolit

olgularının belirlenmesine, anlaşılmasına ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacağına inanılmaktadır.

6. SONUÇLAR

Diş çekim soketlerinde *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türlerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PZR) ile incelenerek karşılaştırılması isimli tez çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1.Real-time PZR ile incelenen toplam 100 adet örneğin tümünde bakteri DNA'sı tespit edildi. Böylece kullanılan DNA ekstraksiyonu metodu doğrulandı ve PZR'ın kan, tükürük, vb. materyallerle inhibe olmadığı ve doğru olarak yürütüldüğü kesinleştirildi.

2. Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 54'ünde *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı saptandı.

3. 45 alveolit vakasının 27'sinde (%60) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 27'sinde (%49,09) *P. gingivalis* ve *T. denticola* DNA'sı olduğu belirlendi. *P. gingivalis* ve *T. denticola* değişkeni bakımından alveolit ve sağlıklı soket gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. ($p>0.05$)

4. Real-time PZR' la inceleme sonuçlarında 45 alveolit vakasının 33' ünde (%73,33) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 33 'ünde (% 60) ve toplamda 100 örneğin 66'sında *T. denticola* DNA'sı saptandı. *T. denticola* değişkeni bakımından Alveolit ve sağlıklı soket grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. ($p>0.05$)

5. Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 73'ünde *P. gingivalis* DNA'sı saptandı. 45 alveolit vakasının 34'ünde (%75,55) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 39'unda (%70,9) *P. gingivalis* DNA'sı olduğu belirlendi. *P. gingivalis* değişkeni bakımından Alveolit ve sağlıklı soket

grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. ($p>0.05$)

6. Bu sonuçlar dikkate alındığında sağlıklı çekim soketi ve alveolit olguları arasında *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türleri her iki sokette de büyük oranda bulunması ile alveolit oluşum mekanizmasında bu iki bakterinin direkt ilişkilendirilemeyeceği sonucu elde edilmiştir.

7. Çalışmamıza katılan 45 kişilik alveolit grubunda hastaların kadın ve erkek oranlarına göre dağılımı incelendiğinde; 35 kadın (%77,8) ve 10 erkek (%22,2) olarak belirlenmiştir. Cinsiyet oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. ($p<0,05$)

8. Çalışmamızda alveolit olgusu tespit edilen diş çekim soketleri, alt çene posterior ve üst çene posterior olarak gruplandırıldığında; 45 olgudan 30'u (%66,7) alt çenede posterior bölgede, 45 olgudan 15'i (%33,3) de üst çene posterior bölgede olduğu saptanmıştır. Diş çekim bölgeleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. ($p<0,05$)

9. Dişlerin çekim zorluğu açısından değerlendirildiğinde; travmatik olmayan normal diş çekimi ve travmatik olan komplikasyonlu veya kemik retansiyonlu diş çekimi olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre; alveolit olgularında atravmatik çekim yapılmış olan 14 hasta varken (%31,1) travmatik çekim yapılan 31 hasta (%68,9) vardır. Diş çekim zorluğu açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. ($p<0,05$)

7. ÖZET

Diş çekimi sonrası çekim soketlerinden *T. denticola* ve *P. gingivalis* türlerinin PZR analizi ile incelenerek karşılaştırılması.

Bu çalışmanın amacı, diş çekimi sonrası çekim soketlerinde *T. denticola* ve *P. gingivalis* bakteri türlerinin, varlığı ve prevalanslarının Real-time PZR ile belirlenmesidir. Bu iki bakteri türünün varlığının, alveolit olguları ve sağlıklı diş çekim soketleri ile ilişkileri karşılaştırılmıştır.

100 hastadan elde edilen örnekler, alveolit ve sağlıklı soket olarak iki gruba ayrılmıştır. DNA ekstraksiyonunun ardından örnekler, *T. denticola* ve *P. gingivalis* için özgül primer ve probler kullanılarak Real-time PZR ile incelendi.

Real-time PZR'la inceleme sonuçlarında 45 alveolit vakasının 33'ünde (%73,33) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 33'ünde (%60) ve toplamda 100 örneğin 66'sında *T. denticola* DNA'sı saptandı. Real-time PZR ile incelenen 100 örneğin 73'ünde *P. gingivalis* DNA'sı saptandı. 45 alveolit vakasının 34'ünde (%75,55) ve 55 sağlıklı çekim soketinin 39'unda (%70,9) *P. gingivalis* DNA'sı olduğu belirlendi. *P. gingivalis* ve *T. denticola* değişkeni bakımından alveolit ve sağlıklı soket grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. ($p>0.05$)

Anahtar sözcükler: *Porphyromonas gingivalis*, Real-time PZR, *T. denticola*, alveolit

8. SUMMARY

Investigation and Comparison of *T. denticola* and *P. gingivalis* with polymerase chain reaction (PCR) techniques after tooth extraction on dental sockets.

The aim of this study was to assess the presence and prevalence of *T. denticola*, *P. gingivalis* in the infected alveolar osteitis and healthy dental sockets by Real-time PCR. The relationship between the presence of these two bacteria and alveolar osteitis and healthy dental sockets was also evaluated.

The samples of 100 patient's dental sockets were divided into the following two clinical groups; alveolar osteitis and healthy dental sockets. DNA was extracted from samples which were further analysed using the primers and probes that are specific for *T. denticola* and *P. gingivalis*.

T. denticola was found in 66% of the total samples, in 33 of 45 cases with alveolar osteitis (73,33%) and in 33 of 55 with healthy dental sockets (60%). *P. gingivalis* was observed in 73% of the total samples, in 34 of 45 cases with alveolar osteitis (75,55%) and in 39 of 55 with healthy dental sockets (70,9%). The association between the presence of the bacteria and clinical situations was not statistically significant ($p>0.05$).

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, Real-time PZR, *T. denticola*, alveolar osteitis.

9.KAYNAKLAR

1. Alexander RE: Dental extraction wound management: A case against medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofac Surg, 58:538-551, 2000
2. Bloomer CR: Alveolar osteitis prevention by immediate placement of medicated packing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 90(3):282-284, 2000
3. Blum IR: Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. Int J Oral Maxillofac Surg, 31:309-317, 2002
4. Kosger H, Ay S, Polat S , Ozan F, Yeler H : Alveolit görölme sıklığı Cumhuriyet Üniv Diş Hek Faki Derg, 5 (2), 2002
5. Carvalho PSP, Mariano RC, Okamoto T: Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B diethylamide associated with gelfoam: A histological study. Braz Dent J, 8(1):3-8, 1997
6. Cheung LK, Chow LK, Tsang MH, Tung LK: An evaluation of complications following dental extractions using either sterile or clean gloves. Int J Oral Maxillofac Surg, 30:550-554, 2001
7. Güngörmüş M, Yıldırım G, Gürbüz G, Ertaş Ü: Alveolitisin görölme sıklığı(Klinik bir araştırma). Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg, 10(2):49-52, 2000
8. Vezeau PJ: Dental extraction wound management: Medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofac Surg, 58:531-537,2000
9. Wikstrom MB,Dahlin G,Linde A: Fibrinogenolytic and Fibrinolytic Activity in Oral Microorganisms J of Clinical Microbiology,17(2):759-767,1983
10. Ank Üni. Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Eylül, 2003
11. Erganiş O, Öztürk A. Oral Mikrobiyoloji & İmmunoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003
12. Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. 2.Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2004.

13. Marsh P, Martin MV. Oral Microbiology. 4th ed. Edinburgh: Elsevier Science Ltd ; 2002.
14. Caso A., Hung L, Beirne O.R., Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: A meta-analytic review, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:155-9)
15. Macgregor AJ. Aetiology of dry socket: A clinical investigation. Br J Oral Surg 1968: 6: 49–58.
16. Penarrocha M, Sanchis JM, Saez U, Bagan JV. Oral hygiene and postoperative pain after mandibular third molar surgery. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001: 92: 260– 264.
17. Rud J. Removal of impacted lower third molars with acute pericoronitis and necrotising gingivitis. Br J Oral Surg 1970: 7: 153–160.
18. Chapnik P, Diamond L. A review of dry socket: A double-blind study on the effectiveness of clindamycin in reducing the incidence of dry socket. J Can Dent Assoc 1992: 58: 43–52.
19. Mitchell L. Topical metronidazole in the treatment of 'dry socket'. Br Dent J 1984: 156: 132–134.
20. Swanson AE. A double-blind study in the effectiveness of tetracycline in reducing the incidence of fibrinolytic alveolitis. J OralMaxillofac Surg 1989: 47: 165–167.
21. Rood JP, Murgatroyd J. Metronidazole in the prevention of 'dry socket'. Br J Oral Surg 1979: 17: 62–70.

22. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Hargreaves KM, editors. Pathways of the Pulp. 2nd ed. Canada: Mosby Elsevier; 2006. p. 580-607.
23. Siqueira JF, Roças IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PZR. J Endod 2003; 29: 390-3.
24. Siqueira JF, Roças IN. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA directed Multiplex PZR. J Endod 2004; 30: 851-4.
25. Siqueira JF, Roças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PZR. J Endod 2003; 29: 244-7.
26. Siqueira JF, Roças IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. J Endod 2003; 29: 735-8.
27. Nisengard & Newman. Oral Microbiology and Immunology. 2nd edn. USA: W.B. Saunders Company; 1994.
28. Alaçam T. Endodonti. 2.Baskı. Ankara: Barış Yayınları; 2000. p.313-83.
29. Chang YC, Lai CC, Yang SF, Chan Y, Hsieh YS. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp and periodontal ligament cell cultures. J Endod 2002; 28: 90-3.
30. Chang YC, Huang FM, Yang SF, Liu CM, Lai CC, Chan Y, et al. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cells stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. J Endod 2003; 29: 240-3.

31. Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liv CM, Lai CC, Chang YC. Induction of Interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides*, in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int Endod J* 2003; 36: 774-9.
32. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Liu CM, Lai CC, Chang YC. Induction of Interleukin-6 gene expression by proinflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp. *Int Endod J* 2003; 36: 352-7.
33. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44.
34. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and associations with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 289-95.
35. Roças IN, Siqueira JF, Santos KRN, Coelho AMA. 'Red complex' (*Bacteroides forsythus*, *P. gingivalis* and *T. denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 468-71.
36. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa T, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1987; 13: 24-8.
37. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992; 60: 4491-5.

38. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1999; 32: 204-10.
39. Siqueira JF, Roças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *T. denticola* in endodontic infections with root canals. *Int Endod J* 2001; 34: 280-6.
40. Roças IN, Siqueira JF. Occurrence of two newly named oral treponemas –*Treponema parvum* and *Treponema putidum*- in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 372-5.
41. Beikler T, Peters U, Ehmke B, Flemmig TF. Sequence analysis of *kgp* in *P. gingivalis* isolates from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 393-7.
42. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endodontic Topics* 2004; 9: 5-14.
43. Young JI, Bang C, Ki-Yean K, Byoung-Duk R, Seung-Jung L, Chan-Young L, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000; 26: 599-604.
44. Grenier D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *T. denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1992; 60: 5298-301.
45. TÜBİTAK Bilim ve Teknik 2002
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/treponema.htm>
46. Fenno JC, McBride BC. Virulence factors of oral treponemas. *Anaerobe* 1998; 4: 1-17.

47. Dahle VR, Sunde PT, Tronstad L. Treponemes and endodontic infections. *Endodontic Topics* 2003; 6: 160-70.
48. Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg* 1964; 17: 592-603.
49. Fenno JC, Müller KH, McBride BC. Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *T. denticola*. *J Bacteriol* 1996; 178: 2489-97.
50. Caimano MJ, Bourell KW, Bannister TD, Cox DL, Radolf JD. The *T. denticola* major sheath protein is predominantly periplasmic and has only limited surface exposure. *Infection and Immunity* 1999; 67: 4072-83.
51. Mathers DA, Leung WK, Fenno JC, Hang Y, McBride BC. The major surface protein complex of *T. denticola* depolarizes and induces ion channels in HeLa cell membranes. *Infect Immun* 1996; 64: 2904-10.
52. Fenno JC, Wong GW, Hannam PM, Müller KH, Leung WK, McBride BC. Conservation of msp, the gene encoding the major outer membrane protein of oral Treponema spp. *J Bacteriol* 1997; 179: 1082-9.
53. Chi B, Mingshan Q, Howard K, Role of dentilisin in *T. denticola* epithelial cell layer penetration *Research in Microbiology*, Volume 154, Issue 9, , November 2003, Pages 637-643.
54. Trope M, Tronstad L, Rosenberg ES, Listgarten M. Darkfield microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. *J Endod* 1988; 14: 35-8.

55. Ellen RP, Dawson JR, Yang PF. *T. denticola* as a model for polar adhesion and cytopathogenicity of spirochetes. *Microbiology* 1994; 2: 114-9.
56. Lux R, Miller JN, Pork NH, Shi W. Motility and chemotaxis in tissue penetration of oral epithelial cell layers by *T. denticola*. *Infect Immun* 2001; 69: 6276-83.
57. Lux R, Sim J, Tsai JP, Shi W. Construction and characterization of a che A mutant of *T. denticola*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3130-4.
58. Siqueira JF, Roças IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of *T. denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 335-7.
59. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R, et al. PZR detection of bacteria in seven minutes. *Science* 1999; 284: 449-50.
60. Chu L, Holt S.C. Purification and characterization of a 45 kDa hemolysin from *T. denticola* ATCC 35404 *Microbial Pathogenesis*, Volume 16, Issue 3, , March 1994, Pages 197-212.
61. Chu L, Kennell W, Holt S.C., Characterization of hemolysis and hemoxidation activities by *T. denticola* *Microbial Pathogenesis*, Volume 16, Issue 3, , March 1994, Pages 183-195.
62. Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 58-63.

63. Aydın M. *Phorphyromonas gingivalis*. Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji Konu 72 Sa: 633-644 Güneş Yayınevi Ankara 2004.
64. Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Su YF, Lai CC, Liu CM, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int Endod J* 2004; 37: 588-92.
65. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *P. gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J* 2006; 39: 62-70.
66. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*. *Int J Systemic Bacteriol* 1988; 3: 128-31.
67. Van Winkelhoff AJ, Von Steenberg T, Graaff J. The role of black pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 145-55.
68. Rajasuo A., Sihvonen O. J., Peltola M., Meurman J. H.: Periodontal pathogens in erupting third molars of periodontally healthy subjects. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007; 36: 818–821.
69. Støre G., Eribe E.R.K., Olsen I.F.: DNA–DNA hybridization demonstrates multiple bacteria in osteoradionecrosis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 34: 193–196.

70. Tsute Chen, Ph.D. Assistant Member of the Staff Department of Molecular Genetics The Forsyth Institute 140 Fenway, Boston, MA
[http://en.citizendium.org/wiki/Image:P. gingivalis.jpg](http://en.citizendium.org/wiki/Image:P._gingivalis.jpg)

71. Laine ML, von Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *P. gingivalis* in a mouse model. Oral Microbiol Immunol 1998; 13: 322-5.

72. Laine ML, Appelmek BJ, von Winkelhoff AJ. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *P. gingivalis* in periodontitis patients. J Dent Res 1997; 76: 1840-4.

73. Van Winkelhoff AJ, Appelmek BJ, Kippuw N, Graaf J. K-antigens in *P. gingivalis* are associated with virulence. Oral Microbiol Immunol 1993; 8: 259-65.

74. Gonzalez D, Tzianabos AO, Genco CA, Gibson FC. Immunization with *P. gingivalis* capsular polysaccharide prevents *P. gingivalis*-elicited oral bone loss in a murine model. Infect Immun 2003; 71: 2283-7.

75. Xie H, Kozlova N, Lamont RJ. *P. gingivalis* genes involved in fimA regulation. Infect Immun 2004; 72: 651-8.

76. Jotwani R, Cutler CW. Fimbriated *P. gingivalis* more efficient than fimbria deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th 1 effector response. Infect Immun 2004; 72: 1725-32.

77. Narimatsu M, Noiri Y, Itoh S, Noguchi N, Kawahara T, Ebisu S. Essential role for the gtf A gene encoding a putative glycosyltransferase in the adhesion of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 2004; 72: 2698-

702.

78. Olsen I, Dahlen G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004; 9: 15-26.

79. Belton CM, Izutsu KT, Goodwin PC, Pork Y, Lamount RI. Fluorescence image analysis of the association between *P. gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol* 1999; 1: 215-23.

80. Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. *P. gingivalis* traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* 2001; 69: 5698-708.

81. Birkedal-Hansen H, Taylor RE, Zambon JJ, Barwa PK, Neiders ME. Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res* 1988; 23: 258-64.

82. Uitto VJ, Haapasalo M, Laakso T, Salo T. Degradation of basement membrane collagen by proteases from some oral microorganism. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 97-102.

83. Slots J, Flynn MJ, Li G. Polymerase chain reaction analysis of the *P. gingivalis* collagenase gene. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 167- 8.

84. Ito H. -O., Shuto T., Takada H., Koga T., Aida Y., Hirata M., Koga T., Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro *Archives of Oral Biology*, Volume 41, Issue 5, May 1996, Pages; 439-444.

85. Hang CY, Lin SK, Kok SH, Chang SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med 2004; 33: 162-9.

86. Wang P.I., Sato K., Orido M, Fujii T, Kowashi Y, shinohara M, ohura K, Tani H, Kuboki Y, Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in *P. gingivalis* lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion Archives of Oral Biology 43 1998; 43 : 687-694

87. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit. Endodontic Topics 2002; 1: 40-53.

88. Shah HN, Gharbia SE, Knowlless D, Wilkie E, Brocklehurst K. Gingipain; a cysteine proteinase isolated from *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Ecol Health Dis 1991; 4: 319-28.

89. Curtis MA, Aduse OJ, Rangarajan M. Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. Crit Rev Oral Biol Med 2001; 12: 192-216

90. Genco CA, Potempa J, Mikalajczyk PJ, Travis J. Role of gingipains R in the pathogenesis *P. gingivalis* mediated periodontal disease. Clin Infect Dis 1999; 28: 456-65.

91. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashphar SG, Reynolds EC. *P. gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. Curr Protein Pept Sci 2003; 4: 409-26.

92. Nadkarni MA, Nguyen KA, Chapple CC, Jacques NA, Hunter N. Distribution of *P. gingivalis* biotypes defined by *kgp* (Lys- Gingipain) gene. J Clin Microbiol 2004; 42: 3873-6.

93. Loubakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, et al. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *P. gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 2001; 97: 3790-7.
94. Imamura T, Potempa J, Travis T. Comparison of pathogenic properties between two types of arginine specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* 2000; 29: 155-63.
95. Yoneda M, Hirofuji T, Anan H, Matsumoto A, Hamochi T, Nakoyama K, et al. Mixed infection of *P. gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: involvement of gingipains in a synergistic effect. *J Periodont Res* 2001; 36: 237-43.
96. Yang S.F., Hsieh Y.S., Huang F.M., Yang L.C., Cahng Y.C., Effect of black-pigmented bacteria on the plasminogen-plasmin system in human pulp and osteoblastic cells *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:621-5
97. Nilsson T, Carlsson J, Sundqvist G. Inactivation of key factors of the plasma proteinase cascade systems by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1985;50:467-71.
98. Wikstrom M.B., Dahlen G., Linde A. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1983, p. 759-767
99. Birn H., Bacteria and Fibrinolytic Activity in "dry socket", *Acta Odontol. Scand.* 1970 28:773-783

100. Nitzan D., Sperry J.F., Wilkins T.D., Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria Archives of Oral Biology, Volume 23, Issue 6, 1978, Pages 465-470
101. Wikstrom M.B., Dahlen G., Linde A. Fibrinogenolytic and Fibrinolytic Activity in Oral Microorganisms, Journal of Clinical Microbiology, May 1983, p 759-767
102. Crawford JY. Dry socket. Dent Cosmos 1896: 38: 929.
103. Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. Int J Oral Maxillofac Surg 2002; 31(3):309-17.
104. Hedström L, Sjögren P, Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials about prevention of alveolar osteitis following tooth extraction: a systematic review Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:8-15
105. Birn H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). Int J Oral Surg 1973;2:211-63.
106. Nitzan DW. On the genesis of 'dry socket'. J Oral Maxillofac Surg 1983: 41: 706–710.
107. Alexander RE. Dental extraction wound management: a case against medicating postextraction sockets. J Oral Maxillofac Surg 2000;58:538-51.
108. Fridrich KL, Olson RAJ. Alveolar osteitis following removal of mandibular third molars. Anaesth Prog 1990: 37: 32–41

109. Lilly GE, Osborn DB, Rael EM. Alveolar osteitis associated with mandibular third molar extractions. *J Am Dent Assoc* 1974; 88: 802–806.
110. Larsen PE. Alveolar osteitis after surgical removal of impacted mandibular third molars. Identification of the patient at risk. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(4):393-7.
111. Sisk AL, Hammer WB, Shelton DW, Joy ED Jr. Complications following removal of impacted third molars: the role of the experience of the surgeon. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;44(11): 855-9.
112. Rozanis J, Schofield IDF, Warren BA. Is dry socket preventable? *J Can Dent Assoc* 1977: 43: 233–236.
113. Nitzan D, Sperry JF, Wilkins D. Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria. *Arch Oral Biol* 1978: 23: 465– 470
114. Alexander RE. Dental extraction wound management: A case against medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg* 2000: 58: 538–551.
115. Brekke JH, Bresner M, Reitman MJ. Effect of surgical trauma and polylactate cubes and granules on the incidence of alveolar osteitis in mandibular third molar extraction wounds. *J Can Dent Assoc* 1986: 52: 315–320.
116. Colby RC. The general practitioner's perspective of the etiology, prevention, and treatment of dry socket. *Gen Dent* 1997: 9: 461–467.

117. Sisk AL, Hammer WB, Shelton DW, Joy ED. Complications following removal of impacted third molars: the role of the experience of the surgeon. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; 44: 855–859.
118. Lele MV. Alveolar osteitis. *J Indian Dent Assoc* 1969; 41: 69–72.
119. Turner PS. A clinical study of dry socket. *Int J Oral Surg* 1982; 11: 226–231
120. Kruger GO. *Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*. St Louis: Mosby 1973: 226.
121. Meechan GR, Rogers SN. Local anesthesia and dry socket: A clinical investigation of single extractions in male patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1987; 16: 279–284
122. Cohen ME, Simecek JW. Effects of gender-related factors on the incidence of localized alveolar osteitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 16–22.
123. Schow SR. Evaluation of postoperative localized osteitis in mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 38: 352–358
124. Sweet JB, Butler DP. Increased incidence of postoperative localized osteitis in mandibular third molar surgery associated with patients using oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 518–519.
125. Sweet JB, Butler DP. Predisposing and operative factors: Effect on the incidence of localized osteitis in mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 206–215.

126. Ygge Y, Brody S, Korsan-Bengtson K, Nilsson L. Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. *Am J Obstet Gynaecol* 1969; 104: 87–98.
127. Sweet JB, Butler DP. The relationship of smoking to localised osteitis. *J Oral Surg* 1979; 37: 732–735.
128. Vezeau PJ. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:531-7.
129. Delilbasi C, Saracoglu U, Keskin A. Effects of 0.2% chlorhexidine gluconate and amoxicillin plus clavulanic acid on the prevention of alveolar osteitis following mandibular third molar extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:301-4.
130. Hermes CB, Hilton TJ, Biesbrock AR, Baker RA, Cain-Hamlin J, McClanahan SF, et al. Perioperative use of 0.12% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis: efficacy and risk factor analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:381-7.
131. Ragno JR, Szkutnik AJ. Evaluation of 0.12% chlorhexidine rinse on the prevention of alveolar osteitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:524-6.
132. Krekmanov L, Nordenram A. Postoperative complications after surgical removal of mandibular third molars. Effects of penicillin V and chlorhexidine. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:25-9.

133. Tjernberg A. Influence of oral hygiene measures on the development of alveolitis sicca dolorosa after surgical removal of mandibular third molars. *Int J Oral Surg* 1979;8:430-4
134. Bergdahl M, Hedström L. Metronidazole for the prevention of dry-socket after removal of partially impacted mandibular third molar. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;42:555-8.
135. Monaco G, Staffolani C, Gatto MR, Checchi L. Antibiotic therapy in impacted third molar surgery. *Eur J Oral Sci* 1999;107:437-41.
136. Akota I, Alvsaker B, Bjornland T. The effect of locally applied gauze drain impregnated with chlortetracycline ointment in mandibular third-molar surgery. *Acta Odontol Scand* 1998;56:25-9.
137. Ritzau M, Hillerup S, Branebjerg PE, Ersbol BK. Does metronidazole prevent alveolitis sicca dolorosa? A double-blind, placebo- controlled clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992;21:299-302.
138. Trieger N, Schlagel GD. Preventing dry socket. A simple procedure that works. *J Am Dent Assoc* 1991;122:67-8.
139. Swanson AE. Reducing the incidence of dry socket: a clinical appraisal. *J Can Dent Assoc* 1966;32:25-33.
140. Barclay JK. Metronidazole and dry socket: prophylactic use in mandibular third molar removal complicated by non-acute pericoronitis. *N Z Dent J* 1987;83:71-5.

141. Hall HD, Bildman BS, Hand CD. Prevention of dry socket with local application of tetracycline. *J Oral Surg* 1971;29:35-7.
142. Birn H. Bacterial and fibrinolytic activity in 'dry socket'. *Acta Odontol Scand* 1970; 28: 773–783.
143. Birn H. Fibrinolytic activity of alveolar bone in 'dry socket'. *Acta Odontol Scand* 1972; 30: 23–32.
144. Birn H, Myhre-Jensen G. Cellular fibrinolytic activity of human alveolar bone. *Int J Oral Surg* 1972; 1: 121–125.
145. Vezeau PJ. Dental extraction wound management: Medicating Postextraction Sockets. *J Oral Maxillofac Journal* 2000; 58: 531–537.
146. Birn H. Fibrinolytic activity of normal alveolar bone. *Acta Odontol Scand* 1971; 29: 141–153.
147. Birn H. Kinins and pain in dry socket. *Int J Oral Surg* 1972a; 1: 34-42.
148. Norholt SE. Treatment of acute pain following removal of mandibular third molars. PhD thesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 1–41.
149. Akar N. *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş*. 2. Baskı. Ankara: Antıp Yayınları; 1999.
150. Siqueira JF, Roças IN. PZR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003; 31: 333-9.

151. Ulusoy Ö.İ.A., Enfekte kök kanallarında *T. denticola*, porphomonans gingivalis ve bu bakterilere ait virülans faktörlerinin moleküler mikrobiyolojik teknikler ile incelenmesi. Ankara Gazi Üniversitesi 2007
152. McPherson MJ, Moller SG. PZR (The Basics). 1st ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd; 2000.
153. Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. Endodontic Topics 2004; 7: 35-51.
154. Roças IN, Siqueira JF, Andrade AFB, Uzeda M. Oral treponemas in primary root canal infections as detected by nested PZR. Int Endod J 2003; 36: 20-6.
155. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PZR. Genome Research 1996; 6: 986-94.
156. Zambon JJ, Haroszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontology 2000; 7: 69-82.
157. Siqueira JF, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89: 744-8.
158. Siqueira JF, Roças IN, Moraes SR, Santos KRN. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J 2002; 35: 345-51.
159. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed polymerase chain reaction. J Endod. 2001 Mar;27(3):164-7.

160. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Oliveira JC, Santos KR. Polymerase chain reaction detection of *T. denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J*. 2001 Jun;34(4):280-4.
161. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A, Santos KR. Detection of *T. denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Oct;15(5):335-7
162. Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):379-85.
163. Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T, Yamashita Y. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *T. denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Jun;19(3):196-200
164. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Jun;19(3):168-76.
165. Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res*. 2001 Feb;36(1):18-24.

166. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. J Clin Periodontol. 2000 Jun;27(6):417-24.
167. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996 Aug;11(4):266-73.
168. Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *T. denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. J Clin Periodontol. 1996 Mar;23(3 Pt 1):212-9.
169. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. Oral Microbiol Immunol. 2006 Dec;21(6):341-6.
170. Tsai JP, Shi W. Analysis of gene expression in *T. denticola* with differential display polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2000 Oct;15(5):305-8.
171. Heasman PA, Jacobs DJ. A clinical investigation into the incidence of dry socket. Br J Oral Maxillofac Surg 1984;22:115-22.
172. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. J Clin Pathol 2000; 53: 71-5.

173. Whelen AC, Persing DH. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. Annual Reviews in Microbiology 1996; 50: 349-73.

174. Oliveira JCM, Siqueira JF, Alves G, Hirata RJ, Andrade AFB. Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endod 2000; 26: 729-32.

175. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of E. faecalis by real-time PZR (qPZR), reverse transcription-PZR (RT-PZR), and cultivation during endodontic treatment. J Endod 2006; 32: 715-21.

176. Horz HP, Vianna ME, Gomes BPFA, Contrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: General implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol 2005; 43: 5332-7.

177. Sanchis JM, Saez U, Penarrocha M, Gay C. Tetracycline compound placement to prevent dry socket: a postoperative study of 200 impacted mandibular third molars. J Oral Maxillofac Surg 2004;62: 587-91.

178. Fazakerley M, Field EA. Dry socket: A painful post-extraction complication (a review). Dent Update 1991;18: 31-4.

179. Butler DP, Sweet JB. Effect of lavage on the incidence of localized osteitis in mandibular third molar extraction sites. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1977;44: 14-20.

180. Noorozi A.R., Philbert R.F., Modern concepts in understanding and management of the “dry socket” syndrome: comprehensive review of the literature Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;107:30-35

181. Larsen PE. The effect of a chlorhexidine rinse on the incidence of alveolar osteitis following the surgical removal of impacted third molars. J Oral Maxillofac Surg 1991;49: 932-7.

182, Tsirlis AT, Iakovidis DP, Parissis NA. Dry socket: frequency of occurrence after intraligamentary anesthesia. Quintessence Int 1992;23: 575-7.

183, Buckingham J, Fisher B, Saunders D. 2008. Worksheet for Using Systematic Reviews.
<http://www.ebm.med.ualberta.ca/SystematicReviewWorksheet.html>. Accessed June 2008.

184. Garcia AG, Grana PM, Sampedro FG, Diago MP, Rey JM. Does oral contraceptive use affect the incidence of complications after extraction of a mandibular third molar? Br Dent J 2003;194:453-5.

185. Catellani JE, Harvey S, Erickson SH, Cherkin D. Effect of oral contraceptive cycle on dry socket (localized alveolar osteitis). J Am Dent Assoc 1980;101:777-80.

186. Awang MN. The aetiology of dry socket: a review. Int Dent J 1989;39:236-40.

187. De Boer MP. Complications after mandibular third molar extraction. *Quintessence Int* 1995;26:779-84.
188. MacGregor AJ. Aetiology of dry socket: a clinical investigation. *Br J Oral Surg* 1968;6:49-58.
189. Centers for Disease Control. Cigarette smoking among adults—United States, 2003. *MMWR* 2005;54:509-13.
190. Meyer RA. Effect of anesthesia on the incidence of alveolar osteitis. *J Oral Surg* 1971;29:724-6.
191. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988;26:402-9.
192. Gardner BS. Postoperative considerations regarding extraction of teeth. *J Am Dent Assoc* 1929;16:235.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ali Mert

Soyadı: ARIK

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara – 03/02/1981

Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2004-2010: Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız
Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi

1998-2003: Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

1994-1998: Ankara Sokullu Mehmet Paşa Lisesi

1991-1994: Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi

1987-1991: Yükseliş Koleji

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türk Oral ve
Maksillofasiyal Cerrahi Derneği, Türk Lazer Derneği

