



The Journal of Turkish Dental Research
Türk Diş Hekimliği Araştırma Dergisi

e-ISSN: 2822-4310 | Yıl / Year: 2025 | Cilt – Volume: 4 | Sayı – Issue: 2

Periodontitisli ve Periodontal Olarak Sağlıklı Hastaların Diş Eti Oluğu Sıvısında IL-35, RANKL ve Osteoprotegerin İlişkisinin İncelenmesi
Examination of the Relationship of IL-35, RANKL and Osteoprotegerin in the Gingival Crevicular Fluid of Periodontitis and Periodontally Healthy Patients
IL-35, RANKL ve Osteoprotegerin İlişkisinin İncelenmesi

Burak ÜNAL¹, Taner ARABACI², Ufuk KESMEZ³, Ahmet ŞANLIDAĞ⁴

¹Uzm. Dt., Beylikdüzü Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi İstanbul/TÜRKİYE
dtburakunal.1992@gmail.com
ORCID: 0009-0007-9203-2550

²Prof. Dr., Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE
tanerarabaci@atauni.edu.tr
ORCID: 0000-0003-0476-1010

³Dt., Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Erzurum/TÜRKİYE
ukesmez25@gmail.com
ORCID: 0009-0009-9016-1150

⁴Dt., Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE
ahmetsanlidag@gmail.com
ORCID: 0009-0002-2581-2948

Bu çalışma, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDH-2021-8991 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Onayı: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapılarak 25.11.2021 tarihi 08 nolu toplantı 07 nolu karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

Onam: Tüm hastalara çalışma ile ilgili bilgi verilerek aydınlatılmış onam formu (BGOF) imzalatılmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar/ilişki çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları: *Cerrahi uygulamalar:* Taner ARABACI, Burak Ünal
Veri toplama, analiz ve yorum: Taner ARABACI, Burak ÜNAL
Literatür tarama ve yazma: Ufuk KESMEZ, Ahmet ŞANLIDAĞ

Makale Bilgisi / Article Information

Makale Türü / Article Types: Araştırma Makalesi / Research Article

Geliş Tarihi / Received: 02-11-2024

Kabul Tarihi / Accepted: 20-05-2025

Sayfa / Pages: 59-74

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Burak ÜNAL

DOI: <https://doi.org/10.58711/turkishjdentres.vi.1578128>

Periodontitisli ve Periodontal Olarak Sağlıklı Hastaların Diş Eti Oluğu Sıvısında IL-35, RANKL ve Osteoprotegerin İlişkisinin İncelenmesi

Examination of the Relationship of IL-35, RANKL and Osteoprotegerin in the Gingival Crevicular Fluid of Periodontitis and Periodontally Healthy Patients

ÖZET

Amaç: Bu klinik çalışmanın amacı, periodontitisli ve periodontal olarak sağlıklı bireylerin diş eti oluşu sıvısında (DOS); İnterlökin-35 (IL-35), reseptör aktivatörü nükleer faktör (NF)- κ B ligandı (RANKL) ve osteoprotegerin (OPG) seviyelerinin değerlendirilmesi ayrıca ilgili markerların birbirleriyle ve klinik parametrelerle ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Paralel dizayn edilmiş bu çalışmaya sistemik olarak sağlıklı ve sigara içmeyen bireyler dahil edildi. Periodontal olarak sağlıklı (S Grubu n=20) ve periodontitisli bireylere (P Grubu n=22) ait klinik periodontal ölçümler yapıldı ve DOS örnekleri kağıt stripler ile alındı. Periodontitisli bireylerden ağız içerisinde en derin periodontal cepten (P_d Grubu) ve periodontitisli bireylerin hastalıktan etkilenmeyen bölgelerinden (P_s Grubu) ayrı ayrı iki örnek toplandı. Örneklerle ait IL-35, RANKL ve OPG seviyeleri “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) ile analiz edildi.

Bulgular: Yapılan incelemede RANKL düzeyleri, P_d Grubunda, P_s Grubu ve S Grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü (S Grubu- P_d Grubu: $p=0,001$, P_s Grubu- P_d Grubu: $p=0,017$). OPG düzeyleri açısından çalışma grupları karşılaştırıldığında, S Grubunda, P_s Grubu ve P_d Grubuna göre daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı ($p<0,001$). Yapılan çoklu karşılaştırmada, P_d Grubunda IL-35 düzeylerinin P_s ve S Grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$). Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda, RANKL/OPG oranının S grubunda P_d ve P_s gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$). S Grubu ve P_d Grubunun verileri toplamında RANKL, OPG ve IL-35 düzeylerinin birbirleriyle olan ilişkisi incelendiğinde, OPG ile RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında negatif yönlü zayıf bir ilişki olduğu görüldü (Sırasıyla; $r=-0,398$, $p<0,011$, $r=-0,444$, $p<0,004$). RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında ise pozitif yönlü güçlü ilişki bulundu ($r=0,721$, $p<0,001$). RANKL/OPG ve IL-35 düzeylerinin klinik periodontal parametreler ile arasındaki ilişkisi incelendiğinde, IL-35 düzeylerinin gingival indeks, sondlamada cep derinliği ve klinik ataçman seviyesi değerleri ile arasında pozitif yönlü güçlü, plak indeksi ile arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki bulundu (Sırasıyla, $r=0,751$, $r=0,771$, $r=0,794$, $r=0,697$, $p<0,001$). RANKL/OPG oranı ile plak indeksi, gingival indeks, sondlamada cep derinliği ve klinik ataçman seviyesi değerleri arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki saptandı (Sırasıyla; $r=0,617$, $r=0,689$, $r=0,616$, $r=0,632$, $p<0,001$).

Sonuç: Bu bulgular ışığında DOS IL-35 seviyesi ve RANKL/OPG oranının periodontitisli bireylerde sağlıklı bireylere göre yüksek olmasından dolayı periodontitis hastalığının patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diş eti oluşu sıvısı, Periodontitis, İnterlökinler, RANK ligandı, Osteoprotegerin

ABSTRACT

Aim: The aim of this clinical study to evaluate Interleukin-35 (IL-35), receptor activator nuclear factor (NF)- κ B Ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) levels in gingival crevicular fluid of periodontitis and periodontally healthy individuals and to search for a relation between markers and clinical parameters with each other.

Material and Method: Systemically healthy and non-smokers were included in this parallel-designed study. Clinical periodontal measurements of the periodontally healthy (S Group n=20) and periodontitis patients (P Group n=22) were performed and DOS samples were taken with paper strips. Two samples were collected separately from the deepest periodontal pocket in the mouth (P_d Group) from individuals with periodontitis and from the disease-free regions of individuals with periodontitis (P_s Group). IL-35, RANKL and OPG levels of the samples were analyzed by “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA).

Results: RANKL levels were found to be significantly higher in the P_d Group than in the P_s Group and Group S (Group S- P_d Group: $p=0,001$, P_s Group- P_d Group: $p=0,017$). When the study groups were compared in terms of OPG levels, it was concluded that Group S was higher than Group P_s and Group P_d ($p<0,001$). In multiple comparisons, IL-35 levels were found to be significantly higher in the P_d Group than in the P_s and S Groups ($p<0,001$). As a result of multiple comparisons, RANKL/OPG ratio was found to be significantly lower in group S than in P_d and P_s groups ($p<0,001$). When the relationship between RANKL, OPG and IL-35 levels in the sum of the data of Group S and Group P_d was examined, it was seen that there was a weak negative correlation between OPG and RANKL and IL-35 levels (Respectively; $r=-0,398$, $p<0,011$, $r=-0,444$, $p<0,004$). A strong positive correlation was found between RANKL and IL-35 levels ($r=0,721$, $p<0,001$). When the relationship between RANKL/OPG and IL-35 levels and clinical periodontal parameters was examined, a strong positive correlation was found between IL-35 levels and gingival index, pocket depth on probing and clinical attachment level, and a moderately significant positive correlation with plaque index (Respectively. , $r=0,751$, $r=0,771$, $r=0,794$, $r=0,697$, $p<0,001$). A moderately significant positive correlation was found between the RANKL/OPG ratio and plaque index, gingival index, pocket depth on probing, and clinical attachment level (respectively; $r=0,617$, $r=0,689$, $r=0,616$, $r=0,632$, $p<0,001$).

Conclusion: In the light of these findings, it is thought that DOS IL-35 level and RANKL/OPG ratio are higher in individuals with periodontitis than in healthy individuals, thus playing a role in the pathogenesis of periodontitis.

Keywords: Gingival Crevicular Fluid, Periodontitis, Interleukins, RANK ligand, Osteoprotegerin

Giriş

Periodontitis, lokal olarak gerçekleşen, konağın patojen subgingival mikrobiyoma karşı verdiği bağışıklık tepkisinin, hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı kronik enflamatuvar bir hastalıktır¹. Periodontal patojenler, diş eti hücrelerinde ya da diş eti dokularına infiltre olan immün hücrelerinde bağışıklık yanıtına neden olan sinyalleri üretir; bu bağışıklık yanıtları patojenlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırılmasına ya da konak aracılığı ile periodontal destek doku kaybına neden olur.²

Periodontitis, sementumdan kollajen liflerinin patolojik olarak ayrıldığı, bağlantı epitelinin apikal olarak yer değiştirdiği ve radyografik olarak kemik kaybının tespit edilebildiği yerlerde diş eti iltihabının varlığı olarak tanımlanmıştır. Bağ dokusunun bağlanma kaybıyla ilişkili enflamatuvar olaylar, diş destekleyen alveolar kemiğin koronal kısmının rezorpsiyonuna yol açar.³

Daha önce “kronik” veya “agresif” periodontitis olarak tanınan periodontal hastalık formlarının artık tek bir kategori (“periodontitis”) altında gruplandırıldığı ve ayrıca çok boyutlu bir evreleme ve derecelendirmeye dayalı olarak karakterize edildiği yeni bir periodontitis sınıflandırma şeması benimsenmiştir.⁴ Periodontitis bireylerde farklı oranlarda ilerleyebilir, bazı hastalarda tedaviye daha az tahmin edilebilir yanıt verebilir ve genel sağlığı veya sistemik hastalığı etkileyebilir veya etkilemeyebilir. Sigara kullanımı veya diyabetin metabolik kontrolü gibi bilinen risk faktörleri, periodontitisin ilerleme hızını etkiler ve sonuç olarak hastalık şiddeti üzerinde belirleyicidir.⁵

Periodontitisin ayırt edici özelliklerinden biri, diş eti bağ dokusunda, birleşim epitelinde ve özellikle lökositlerin ezici çoğunluğunu oluşturduğu periodontal cepte çok sayıda nötrofil birikmesi ile karakterizedir.⁶

Yapılan çalışmalar periodontal hastalığın bakteriler tarafından üretilen sinyallerin lokal enflamatuvar tepkiyi oluşturduğu ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu uyaran antijenleri içerdiğini göstermektedir. Proinflamatuvar moleküller ve sitokin ağırları bu süreçte önemli rol oynamaktadır. İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrotize edici faktör-alfa (TNF- α), periodontal hücreleri etkileyen birincil moleküller olarak görülmektedir ayrıca

uyarılan B ve T lenfosit hücreleri bu süreçte önemli rol oynamaktadır.⁷

Nötrofillerin, membrana bağlı reseptör aktivator nükleer kappa B (RANK)/RANK ligandı (RANKL) ekspresyonu yoluyla osteoklastik kemik rezorpsiyonunu indükleyebileceği de öne sürülmüştür. Bununla birlikte, nötrofiller çözülebilir RANKL salgılamadıkları için yalnızca kemiğe yakın olduklarında periodontal kemik rezorpsiyonuna aracılık edebilirler.⁸

Periodontal hastalıkta, gingival bağ dokusunda T hücrelerinin, B hücrelerinin, makrofajların ve nötrofillerin enflamatuvar infiltrasyonu, enflamatuvar mediyatörlerin sekresyonunun artmasıyla birlikte artar.^{9,10}

Bu enflamatuvar hücreler ayrıca osteoblastlar, periodontal ligament hücreleri ve gingival fibroblastlar gibi stromal hücreler ile etkileşime girer. RANKL aracılı osteoklast oluşumu, enflamatuvar kemik rezorpsiyonunda anahtar rol oynadığından, ekspresyonu ve üretim seviyesinin periodontitis lezyonlarında önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir.¹¹ Osteoprotegerin (OPG), RANKL’ın tuzak reseptörüdür ve osteoblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilirler. mRANKL’ı bağlayarak RANKL / RANK oluşumunu engelleyerek osteoklast oluşumunu inhibe etmektedir. Bu nedenle, bu üç protein osteoblastlar tarafından yönetilen osteoklast farklılaşması için gereklidir ve osteoblastlarda RANKL ve OPG arasındaki denge, yeni osteoklast oluşumunu yönlendirmektedir.¹²

İmmün yanıt, dokulara nötrofiller, makrofajlar, B hücreleri ve T hücrelerinin infiltre olması ve lokal olarak yüksek konsantrasyonlarda sitokinler ve diğer araçların oluşumu ile karakterize edilir.¹³ Bu bağlamda, T yardımcı tip 17 (Th17) lenfositlerin dahil olduğu periodontitis patogeneğinde periodontal inflamasyon ve doku kaybında, spesifik T lenfosit alt kümelerinin aktivitesinde T-düzenleyici (Treg) lenfositlerin koruyucu olduğu açıkça belirlenmiştir.^{14,15}

Aktive edilmiş Th17 lenfositleri, interlökin-6 (IL-6), IL-17A ve IL-23 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra osteoklastların farklılaşma ve aktivasyonu için bir sinyal olan RANKL aktivatörünü üretir.^{16,17} IL-17 ve Th17 hücrelerinin osteoklastogenezi teşvik ettiği gösterilmiş olup IL-17, osteoblastlar üzerinde etkili olarak RANKL

ekspresyonunu arttırmaktadır ve Th17 hücrelerinin de RANKL salgıladığı belirtilmiştir.¹⁸

IL-12 sitokin ailesinin en önemlilerinden biri olmaya devam etmektedir ve IL-12, IL-23, IL-27 ve ayrıca IL-35'i içerir.¹⁹ IL-12 ve IL-23, sırasıyla Th1 ve Th17 hücrelerinin gelişiminde önemli rollere sahip başlıca proinflamatuvar sitokinlerdir.^{20,21}

Öte yandan, esas olarak düzenleyici Treg hücreleri tarafından üretilen immünosupresif bir sitokin olan IL-35, enflamatuvar immün tepkisini baskılayarak immünolojik fonksiyonlara aracılık eder.¹⁹ IL-35'in timus kaynaklı doğal düzenleyici T hücreleri (nTregs) tarafından üretildiği ve bağışıklık tepkisini baskılayıcı aktiviteler için gerekli olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Düzenleyici B hücrelerinin de IL-10 ve IL-35 dahil olmak üzere antienflamatuvar sitokinler ürettiği bildirilmiştir.^{22,23}

IL-35'in, hücre bölünmesinin G1 fazındaki T hücrelerini baskılayarak Th1 ve Th17 proliferasyonunu önlediği gösterilmiştir.²⁴ Diş eti oluşu sıvısında (DOS) IL-35 ve IL-17, periodontitisli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur.²⁵ IL-35'in, düzenleyici T hücrelerinin çoğalması ve Th17 hücre gelişiminin baskılanması yoluyla bağışıklık tepkisini baskılayan bir antienflamatuvar sitokin olarak görev aldığı gösterilmiştir.²⁶

Materyal ve Metot

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği'ne periodontal şikayetlerle müracaat eden, klinik ve radyografik muayene sonucu 2017 periodontitis sınıflamasına göre Evre 2, Evre 3, Evre 4 periodontitis tanısı koyulmuş ve periodontal olarak sağlıklı 22-51 yaş aralığında 42 birey dâhil edilmiştir. G*power programı kullanılarak örneklem büyüklüğü belirlenmiştir. Çalışmaya 21 kadın 21 erkek birey dâhil edilmiştir.

Araştırma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.10.2020 tarihli 08/07 karar no ile onay alınarak yapılmıştır. Çalışmamıza dâhil edilen tüm bireylere çalışmamızın amacı ve yöntemi konusunda detaylı bilgi verildikten sonra erişkin hastalar için bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmıştır.

Hastaların sistemik hastalık durumları, sigara kullanım durumları hakkındaki bilgiler anamnez

esnasında öğrenilmiştir. Çalışmaya periodontal hastalığı etkileyen sistemik hastalığı bulunmayan ve sigara içmeyen hastalar dâhil edilmiştir.

Evre 2, Evre 3 ve Evre 4 grubuna ait Derece B periodontitisli 22 birey çalışmamızda periodontitisli hasta grubuna dâhil edilmiştir.

Grup S : Periodontal olarak sağlıklı hasta grubu (Yaşları 22-31 arası değişen 9 erkek, 11 kadın bireyden oluşmaktadır.)

Grup P : Periodontitisli hasta grubu (Yaşları 25-51 arası değişen 12 erkek, 10 kadın bireyden oluşmaktadır.)

Grup P_d : Periodontitisli hasta grubunda en derin periodontal ceplerden alınan numune grubu.

Grup P_s : Periodontitisli hasta grubunda sondalamada cep derinliği 1-3 mm ve klinik ataçman seviyesi 1 mm'yi geçmeyen ve sondalamada kanama gözlenmeyen dişlerden alınan numune grubu.

Klinik Periodontal Değerlendirme

Hastalarda klinik ve radyografik değerlendirme tek bir araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Klinik değerlendirmede Löe and Silness Plaque İndeks (Pİ), Löe and Silness Gingival İndeks (Gİ), Sondlamada Cep Derinliği (SCD), Klinik Ataçman Seviyesi (KAS) ölçümleri yapılmış ve periodontal klinik indeks kayıt formuna işlenmiştir.²⁷

Radyografik Periodontal Değerlendirme

Klinik periodontal muayeneyi takiben çalışmaya katılan bütün gönüllülerden doğru tanı koyabilmek için ortopantomograf ve paralel teknikle çekilen periapikal radyograflar alınmıştır. Radyografik olarak kemik kaybı var ya da yok olarak değerlendirilme yapılmıştır.

DOS Örneklerinin Toplanması

Klinik değerlendirme yapıldıktan 24 saat sonra DOS örnekleri alınmıştır. DOS örneklerinin standardizasyonu için gün içerisinde 09.00-11.00 saatleri arasında örnek toplama işlemi yapılmıştır. Periodontitisli grupta sondalanabilir cep derinliği en fazla olan diş ile sondalanabilir cep derinliği 3 mm'yi ve klinik ataçman seviyesi 1 mm'yi geçmeyen dişlerden ayrı ayrı 2 örnek toplanmıştır. Periodontal olarak sağlıklı grupta ise oral kavitede rastgele seçilen bir diştten örnek alınmıştır. Örnek toplama işlemi steril kağıt striplerle (Periopaper®, OraFlow Inc., PlainView, New

York, USA) intrakrevikular teknik (Brill Tekniği) ile yapılmıştır. Örnekleme işleminde kağıt şerit diş eti cebine hafif direnç hissedilene kadar yerleştirilip 30 saniye bekletilmiştir ve her hastadan 4 örnek alınmıştır. Kan ve tükürük ile kontamine olan örnekler araştırmaya dahil edilmemiş ve örnek toplama işlemi sırasında örnek alınacak bölgede kanama olduğunda örnek toplama işlemi sonlandırılmıştır. Striplerin DOS volümü önceden kalibre edilmiş Periotron 8000 (Oraflow Inc., Plainview, New York, USA) cihazında ölçülüp kaydedilmiş ve elde edilen değer mikro litreye (μL) çevrilerek DOS hacmi hesaplanmıştır. Bu çevirme işlemi; Periotron 8000 ölçüm değerlerinin PERIOTRON programının bulunduğu bir bilgisayara seri bağlantı ile gönderilmesi yardımı ile yapılmıştır.

Verilerin Analizi

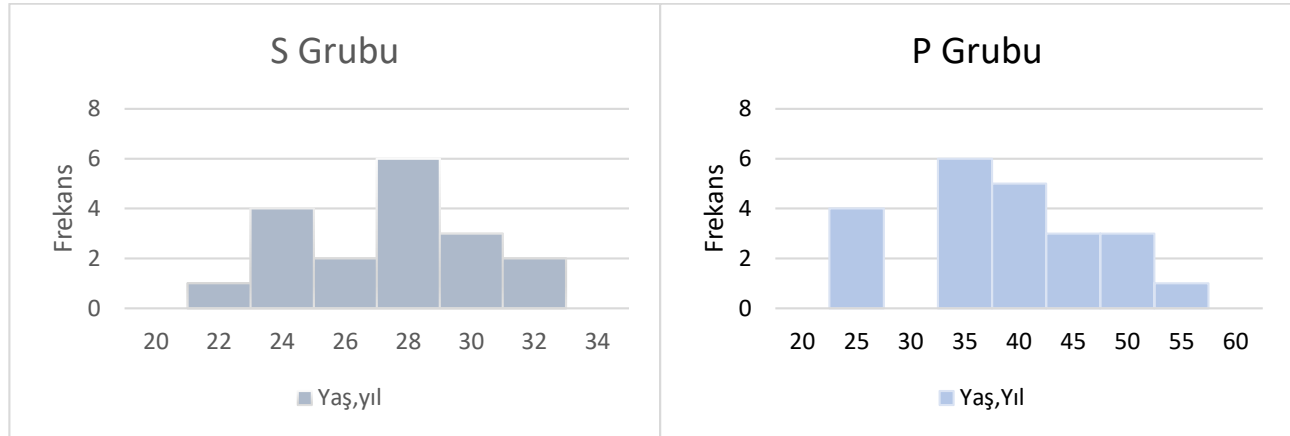
Sürekli değişkenlerde normal dağılım koşulu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılım koşulu sağlandığında, 2 grubun verileri Student t testi, üç veya daha fazla grubun verileri tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Normal dağılım koşulu sağlanmadığında, Mann-Whitney U testi ve Kruskal

Wallis testi (Post-Hoc: Dunn-Bonferroni testi) kullanıldı. İki sürekli değişken arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi, ve Spearman'ın (ρ) sıralama korelasyon analizi ile incelendi. İki kategorik değişken arasındaki ilişki Pearson'un Ki-kare testi ile araştırıldı. Sürekli veriler ortalama ve standart sapma ($\text{ort} \pm \text{ss}$), medyan, minimum ve maksimum değer (med (min-maxs)) ile özetlendi. Analizler, SPSS version 23 (SPSS Inc., Armonk, NY) programı ile gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi.

Bulgular

Çalışmada 22 hasta ve 20 sağlıklı olmak üzere toplamda 42 birey yer aldı. Sağlıklı ve hasta bireylerin yaşları ortalaması sırasıyla, $26,7 \pm 2,7$ (minimum-maksimum: 22-32) ve 37 ± 8 (minimum-maksimum: 23-51) idi. Hasta grubu, kontrol grubunda bulunan sağlıklı bireylere göre daha ileri yaştaydı ($t = -5.690$, $p < 0,001$). Hasta ve sağlıklı bireylerin yaşları dağılımını gösteren histogram grafiği Şekil I'dedir. Hasta bireylerin %54,5'i, sağlıklı bireylerin %45'i erkekti. Gruplar cinsiyet açısından benzer özellikteydi ($\chi^2 = 0,382$, $p = 0,537$). Tablo I'de hastaların demografik özelliklerine yer verildi.

Şekil I. Kontrol ve hasta grubunda yaş değişkenine bağlı histogram grafiği



Tablo I. Hastaların demografik özellikleri

	Kontrol (n=20)	Hasta (n=22)	Test istatistiği	p
Yaş,yıl				
Ort±ss	26,7±2,7	37±8	t=-5.690	<0,001 ^a
Med (Min-Maks)	27 (22-32)	36 (23-51)		
Cinsiyet - n (%)				
Kadın	11 (55)	10 (45,5)	χ ² = 0,382	0,537 ^b
Erkek	9 (45)	10 (54,5)		

^a: Student t testi, ^b: Pearson Ki-kare testi.

Klinik Periodontal Bulgular

Hastaların klinik periodontal parametrelerine ait plak indeksi (Pİ), gingival indeks (Gİ), sondlama cep derinliği (SCD) ve klinik ataçman seviyesi (KAS) değerlerinin sağlıklı ve periodontitisli hasta grupları arasında karşılaştırmasından elde edilen bulgular Tablo IV’de yer almaktadır. Yapılan incelemede, kontrol ve hasta grupları arasında hastaların değerlendirilen tüm klinik periodontal parametreleri açısından anlamlı derecede fark olduğu

ve hasta grubunda daha yüksek değerlerin elde edildiği görüldü. Kontrol grubunda Pİ ortalama değeri $1\pm0,3$ olarak ölçülürken hasta grubunda $1,9\pm0,4$ değeri elde edildi. Gİ değerlerinin ortalaması kontrol grubunda $0,8\pm0,2$, hasta grubunda $1,7\pm0,4$ olarak bulundu. Kontrol ve hasta grubunda ortalama SCD değerleri sırasıyla; $1,9\pm0,3$ mm, $3,3\pm0,7$ mm KAS değerleri ise sırasıyla; $0,5\pm0,2$ mm ve $3,9\pm0,7$ mm olarak elde edildi.

Tablo II. Çalışma gruplarına göre klinik periodontal değerlendirmeler

	S Grubu (n=20)	P Grubu (n=22)	Test İstatistiği	p [†]
Pİ,				
Ort±ss	0,96±0,3	1,88±0,4	t= -8,743	<0,001
Med (Min-Maks)	0,91 (0,57-1,41)	1,82 (1,28-2,61)		
Gİ,				
Ort±ss	0,76±0,2	1,7±0,4	t= -9,382	<0,001
Med (Min-Maks)	0,79 (0,19-1,08)	1,61 (1,04-2,73)		
SCD, mm				
Ort±ss	1,92±0,3	3,35±0,7	t= -8,674	<0,001
Med (Min-Maks)	1,98 (1,06-2,38)	3,26 (2,32-4,97)		
KAS, mm				
Ort±ss	0,51±0,2	3,94±0,7	t= -21,107	<0,001
Med (Min-Maks)	0,45 (0,23-0,84)	3,92 (2,23-6,01)		

[†]Student t testi.

SCD: Sondlama cep derinliği, Gİ: Gingival indeks, Pİ: Plak indeksi, KAS: Klinik ataçman seviyesi.

DOS Hacmi Bulguları

Çalışma grupları DOS hacmi açısından karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (F=214,2, p<0,001 Tablo III)

Tablo III. DOS hacmi

	S Grubu (n=20)	P _d grubu (n=22)	P _s grubu (n=22)	Test İstatistiği	p [†]
DOS hacmi, µl					
Ort±ss	0,045±0,1	0,51±0,1	0,11±0,1	F=214,2	<0,001
Med (Min-Maks)	0,04 (0,02 0,07)	0,54 (0,25 0,75)	0,10 (0,03 0,20)		

[†]Tek yönlü varyans analizi

Yapılan çoklu karşılaştırmada, DOS hacminin S Grubuna göre P_s Grubunda ve P_d Grubunda ayrıca P_s Grubuna göre P_d Grubunda daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. (p< 0,001, Tablo IV)

Tablo IV. DOS hacmi için çoklu karşılaştırma

	S-P	S-P _s	P _d -P _d
DOS hacmi, µl			
	<0,001	<0,001	<0,001

RANKL, OPG ve IL-35 Düzeyleri

Çalışma gruplarına göre RANKL, OPG, IL-35 düzeylerinin ve RANKL/OPG oranının karşılaştırılmasından elde edilen bulgulara Tablo V'te yer verildi.

Tablo V. Çalışma gruplarına göre RANKL, OPG ve IL-35 düzeyleri

	S (n=20)	P _d (n=20)	P _s (n=20)	Test statistiği	p
RANKL, ng/ml					
Ort±ss	184,257±30,1	224,903±31,9	192,489±34	X ² = 15,16	<0,001 ^a
Med (Min-Maks)	182,2 (134,6-268,45)	216,43 (188,3-305,1)	195,4 (133,9-249,5)		
OPG, ng/ml					
Ort±ss	2,333±0,3	1,478±0,8	1,372±0,5	χ ² = 21,98	<0,001 ^a
Med (Min-Maks)	2,287 (1,94-2,96)	1,134 (0,82-3,67)	1,168 (0,88-2,31)		
IL-35, ng/ml					
Ort±ss	7,158±1,3	11,985±1,4	7,459±1,3	F= 80,36	<0,001 ^b
Med (Min-Maks)	6,942 (5,04-9,76)	12,009 (9,54-14,77)	7,277 (5,23-10,36)		
RANKL/OPG					
Ort±ss	79,7±14,3	180,8±64,7	149±28,7	χ ² = 32,37	<0,001 ^a
Med (Min-Maks)	80,2 (57-122,8)	200,1 (51,3-261,2)	155,5 (101,2-199,4)		

^a: Student t testi, ^b: Pearson Ki-kare testi.

RANKL Bulguları

RANKL düzeyleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında, anlamlı fark tespit edildi ($\chi^2= 15,16$, $p<0,001$). Yapılan incelemede, P_d Grubundan elde edilen RANKL değerlerinin P_s Grubu ve S Grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü (S Grubu-P_d Grubu: $p<0,001$, P_s Grubu-P_d Grubu: $p<0,017$). Ortanca RANKL değerleri, S Grubunda 182,2 (134,6-268,45), P_s Grubunda 195,4 (133,9-249,5) ve P_d Grubunda 216,43 (188,3-305,1) idi.

OPG Bulguları

OPG düzeyleri açısından çalışma grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($\chi^2= 21,98$, $p<0,001$). Yapılan incelemede, S Grubunda, P_s Grubu ve P_d Grubuna göre OPG değerlerinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı ($p<0,001$). Ortanca OPG değerleri, S Grubunda 2,287 (1,94-2,96), P_s Grubunda 1,168 (0,88-2,31) ve P_d Grubunda 1,134 (0,82-3,67) idi.

IL-35 Bulguları

Çalışma grupları IL-35 düzeyleri açısından incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($F=80,36$, $p<0,001$). Yapılan çoklu karşılaştırmada, P_d Grubunda IL-35 düzeylerinin P_s ve S Grubuna göre

anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,001$).

RANKL/OPG Bulguları

RANKL/OPG oranı ele alındığında, çalışma grupları arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($\chi^2=32,37$, $p<0,001$). Çoklu karşılaştırma sonucunda, RANKL/OPG oranının S Grubunda P_d ve P_s Gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Ortanca RANKL/OPG oranı S grubunda 80,2 (57-122,8), P_d grubunda 200,1 (51,3-261,2) ve P_s grubunda 155,5 (101,2-199,4) idi.

S Grubunda klinik periodontal parametrelerin, DOS hacminin, RANKL, OPG, IL35 düzeylerinin ve RANKL/OPG oranının birbirleriyle olan doğrusal ilişkisi incelendi. İnceleme sonuçları Tablo VI'da paylaşıldı. S Grubunda yapılan incelemede, plak indeksi (Pİ), gingival indeksi (Gİ) ve sondalama cep derinliği (SCD) klinik periodontal parametrelerinin birbirleriyle ilişkili olduğu tespit edildi. Pİ ile Gİ arasında pozitif yönlü, Pİ ile SCD arasında ise negatif yönlü orta derecede doğrusal ilişki bulundu (Sırasıyla, $r=0,524$, $p=0,018$, $r=-0,666$, $p<0,001$). Gİ ile SCD için yapılan incelemede, negatif yönlü zayıf ilişki saptandı ($r=-0,457$, $p<0,043$).

KAS ile DOS hacmi arasında negatif yönlü orta derecede doğrusal ilişki bulundu ($r=-0,471$, $p<0,036$). IL-35 ile RANKL arasında pozitif yönlü güçlü ilişki bulunurken IL-35 ile OPG arasında pozitif yönlü orta derecede doğrusal ilişki tespit edildi (Sırasıyla; $r=0,712$,

Tablo VI. S grubunda (n=20) klinik periodontal değerlendirmeleri, DOS hacmi, RANKL, OPG, IL-35 düzeyleri ve RANKL/OPG oranı ilişkisi

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	KAS (mm)	DOS hacmi (µl)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	RANK L /OPG ^a
Pİ -r	1,00	0,52 ^b	-0,666 ^b	-0,353 ^b	0,080 ^b	-0,355 ^b	-0,102 ^b	-0,106 ^b	-0,191 ^a
p		0,02 ^b	0,001 ^b	0,127 ^b	0,738 ^b	0,124 ^b	0,668 ^b	0,657 ^b	0,420 ^a
Gİ -r		1,00	-0,457 ^b	0,213 ^b	-0,256 ^b	0,034 ^b	0,195 ^b	0,293 ^b	-0,068 ^a
p			0,043 ^b	0,366 ^b	0,275 ^b	0,888 ^b	0,410 ^b	0,209 ^b	0,774 ^a
SCD (mm) -r			1,00	0,294 ^b	-0,059 ^b	0,289 ^b	0,067 ^b	0,142 ^b	0,247 ^a
p				0,209 ^b	0,806 ^b	0,216 ^b	0,780 ^b	0,549 ^b	0,294 ^a
KAS (mm) -r				1,00	-0,471 ^b	0,415 ^b	-0,030 ^b	0,333 ^b	0,282 ^a
p					0,036 ^b	0,069 ^b	0,900 ^b	0,151 ^b	0,228 ^a
DOS hacmi (µl) -r					1,00	-0,380 ^b	0,121 ^b	-0,193 ^b	-0,264 ^a
p						0,099 ^b	0,611 ^b	0,415 ^b	0,260 ^a
RANKL (ng/ml) -r						1,00	0,190 ^b	0,712 ^b	0,629 ^a
p							0,423 ^b	<0,001 ^b	0,003 ^a
OPG (ng/ml) -r							1,00	0,540 ^b	-0,365 ^a
p								0,014 ^b	0,113 ^a
IL-35 (ng/ml) -r								1,00	0,262 ^a
p									0,265 ^a
RANKL/OPG -r									1,00
p									

^aSpearman korelasyon analizi. ^bPearson korelasyon analizi**SCD:** Sondlama cep derinliği, **Gİ:** Gingival indeks, **Pİ:** Plak indeksi, **KAS:** Klinik ataçman seviyesi.

p<0,05).

P_d Grubunda klinik periodontal parametrelerin, DOS hacminin, RANKL, OPG ve IL-35 düzeylerinin birbirleriyle olan doğrusal ilişkisi incelendi. İnceleme sonuçları Tablo VII'de paylaşıldı. **P_d** Grubu verileri üzerinden yapılan incelemede, Pİ ve Gİ arasında pozitif yönlü orta derecede doğrusal ilişki bulundu (Sırasıyla, r=0,589, p<0,004). SCD ve KAS arasında pozitif yönlü zayıf bir ilişki tespit edildi (r=0,425, p<0,049). Yapılan incelemede, RANKL ile plak indeksi arasında pozitif yönlü zayıf bir ilişki tespit edildi (r=0,472, p=0,036). RANKL/OPG oranının RANKL ile arasında pozitif yönlü orta derecede, OPG ile arasında negatif yönlü güçlü ilişki bulundu (Sırasıyla; r=0,660, p<0,002, r=-0,705, p<0,001). 57 **P_d** Grubunda diğer parametrelerin birbirleriyle arasında anlamlı bir doğrusal ilişki saptanmadı (p>0,05).

P_s Grubunda klinik periodontal parametrelerin, DOS hacminin, RANKL, OPG ve IL-35 düzeylerinin birbirleriyle olan doğrusal ilişkisi incelendi. İnceleme sonuçları Tablo VIII'de paylaşıldı. RANKL ile OPG, RANKL ile

IL-35 ve OPG ile IL-35 düzeyleri arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki gözlemlendi (Sırasıyla; r=0,878, r=0,893, r=0,806, p<0,05).

S Grubu ve **P_d** Grubunun verilerinin toplamında, klinik periodontal parametrelerin, DOS hacminin, RANKL, OPG ve IL-35 düzeylerinin birbirleriyle olan doğrusal ilişkisi incelendi. İnceleme sonuçları Tablo IX'da paylaşıldı. Klinik periodontal parametrelerin kendi aralarındaki ilişki ele alındığında, pozitif yönlü anlamlı bir ilişki olduğu görüldü (p<0,001). Pİ'nin SCD ve KAS ile arasında orta derecede, Gİ ile arasında ise güçlü anlamlı bir ilişki gözlemlendi (Sırasıyla; r=0,625, r=0,690, r=0,864). Gİ ile SCD ve KAS arasında ve SCD ile KAS arasında güçlü ilişki tespit edildi (Sırasıyla, r=0,710, r=0,745, r=0,860).

DOS hacminin parametrelerle ilişkisi ele alındığında, Pİ ve KAS ile orta derecede, Gİ ve SCD ile güçlü ilişkili olduğu görüldü (Sırasıyla, r=0,660, r=0,694, r=0,711, r=0,744, p <0,001). DOS hacmi ile RANKL arasında pozitif yönlü, OPG ile arasında negatif yönlü zayıf bir ilişki saptandı (Sırasıyla, r=0,463, p<0,003, r=-0,406,

Tablo VII. P_d Grubunda klinik periodontal değerlendirmeleri, DOS hacmi, RANKL, OPG, IL-35 düzeyleri ve RANKL/OPG oranı ilişkisi

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	KAS (mm)	DOS hacmi (µl)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	RANKL /OPG
Pİ -r	1,00	0,589^b	-0,029 ^b	0,052 ^b	-0,342 ^b	0,472^a	0,185 ^a	-0,147 ^b	0,235 ^a
p		0,004^b	0,898 ^b	0,820 ^b	0,120 ^b	0,036^b	0,435 ^b	0,538 ^b	0,319
Gİ -r		1,00	0,272 ^b	0,093 ^b	-0,142 ^b	0,411 ^a	-0,047 ^a	-0,193 ^b	0,40 ^a
p			0,221 ^b	0,681 ^b	0,527 ^b	0,072 ^b	0,845 ^b	0,414 ^b	0,073 ^b
SCD (mm) -r			1,00	0,425^b	0,139 ^b	-0,081 ^a	-0,021 ^a	0,004 ^b	-0,038 ^a
p				0,049^b	0,537 ^b	0,736 ^b	0,930 ^b	0,988 ^b	0,875 ^b
KAS (mm) -r				1,00	-0,002 ^b	0,138 ^a	-0,012 ^a	0,287 ^b	-0,084 ^a
p					0,992 ^b	0,560 ^b	0,960 ^b	0,219 ^b	0,724 ^b
DOS hacmi (µl) -r					1,00	-0,091 ^a	0,264 ^a	-0,020 ^b	-0,145 ^a
p						0,704 ^b	0,261 ^b	0,932 ^b	0,541 ^b
RANKL* (ng/ml) -r						1,00	-0,164 ^a	0,054 ^a	0,660^a
p							0,490 ^b	0,821 ^b	0,002^b
OPG* (ng/ml) -r							1,00	-0,227 ^a	-0,705^a
p								0,336 ^b	0,001^b
IL-35* (ng/ml) -r								1,00	0,123 ^a
p									0,605 ^b
RANKL/OPG* -r									1,00
p									

^aSpearman korelasyon analizi. ^bPearson korelasyon analizi

SCD: Sondlama cep derinliği, Gİ: Gingival indeks, Pİ: Plak indeksi, KAS: Klinik ataçman seviyesi.

Tablo VIII. P_s grubunda klinik periodontal değerlendirmeleri, DOS hacmi, RANKL, OPG, IL-35 düzeyleri ve RANKL/OPG oranı ilişkisi

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	KAS (mm)	DOS hacmi (µl)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	RANKL /OPG
PI -r	1,00	0,589^b	-0,029 ^b	0,052 ^b	0,014 ^b	0,036 ^b	0,051 ^a	-0,067 ^b	0,140 ^a
p		0,004^b	0,898 ^b	0,820 ^b	0,949 ^b	0,881 ^b	0,830 ^b	0,779 ^b	0,556 ^b
GI -r		1,000	0,272 ^b	0,093 ^b	0,014 ^b	-0,094 ^b	-0,232 ^a	-0,022 ^b	0,380 ^a
p			0,221 ^b	0,681 ^b	0,952 ^b	0,694 ^b	0,326 ^b	0,926 ^b	0,098 ^b
SCD (mm) -r			1,000	0,425^b	0,224 ^b	0,049 ^b	0,020 ^a	0,149 ^b	-0,180 ^a
p				0,049^b	0,315 ^b	0,839 ^b	0,935 ^b	0,530 ^b	0,446 ^b
KAS (mm) -r				1,000	-0,042 ^b	0,031 ^b	0,168 ^a	-0,008 ^b	-0,015 ^a
p					0,852 ^b	0,897 ^b	0,478 ^b	0,973 ^b	0,950 ^b
DOS hacmi (µl) -r					1,000	-0,196 ^b	0,032 ^a	-0,082 ^b	-0,377 ^a
p						0,408 ^b	0,895 ^b	0,733 ^b	0,101 ^b
RANKL* (ng/ml) -r						1,000	0,878^a	0,893^a	-0,346 ^a
p							<0,001^b	<0,001^b	0,135 ^b
OPG* (ng/ml) -r							1,000	0,806^a	-0,623^a
p								<0,001^b	0,003^b
IL-35* (ng/ml) -r								1,000	-0,379 ^a
p									0,099
RANKL/OPG* -r									1,000
p									

^aSpearman korelasyon analizi. ^bPearson korelasyon analizi

n=22, *: n=20. SCD: Sondlama cep derinliği, Gİ: Gingival indeks, Pİ: Plak indeksi, KAS: Klinik ataçman seviyesi.

$p<0,009$). DOS hacmi ile IL-35 düzeyleri arasında ise pozitif yönlü güçlü bir ilişki bulundu ($r=0,709$, $p<0,001$). RANKL/OPG oranı ile DOS hacmi arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki tespit edildi ($r=0,505$, $p<0,001$). RANKL, OPG, IL-35 düzeylerinin ve RANKL/OPG oranının birbirleriyle olan ilişkisi incelendiğinde, OPG ile RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında negatif yönlü zayıf bir ilişki olduğu görüldü (Sırasıyla; $r=-0,398$, $p<0,011$, $r=-0,444$, $p<0,004$). RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında ise pozitif yönlü güçlü ilişki bulundu ($r=0,721$, $p<0,001$). RANKL/OPG ile RANKL arasında pozitif yönlü, RANKL/OPG ile OPG arasında negatif yönlü güçlü ilişki gözlemlendi (Sırasıyla; $r=0,776$, $r=-0,829$, $p<0,001$). RANKL, OPG, IL-35 düzeylerinin ve

$r=0,578$, $r=0,607$, $r=0,647$, $p<0,001$). OPG düzeylerinin Pİ, SCD ve KAS değerleri ile arasında negatif yönlü zayıf, Gİ değerleri ile arasında negatif yönlü orta derecede anlamlı ilişki gözlemlendi (Sırasıyla; $r=-0,490$, $p=0,001$, $r=-0,462$, $p=0,003$, $r=-0,479$, $p<0,002$, $r=-0,553$, $p<0,001$). IL-35 düzeylerinin Gİ, SCD ve KAS değerleri ile arasında pozitif yönlü güçlü, Pİ ile arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki bulundu (Sırasıyla, $r=0,751$, $r=0,771$, $r=0,794$, $r=0,697$, $60 p<0,001$).

S Grubu ve P_s Grubu verilerinin toplamında, klinik periodontal parametrelerin, DOS hacminin, RANKL, OPG ve IL-35 düzeylerinin birbirleriyle olan doğrusal ilişkisi incelendi. İnceleme sonuçları Tablo X'da paylaşıldı. DOS hacminin parametrelerle ilişkisi ele alındığında, Pİ,

Tablo IX. S ve P_s grup verilerinin toplamında klinik periodontal değerlendirmeleri, DOS hacmi, RANKL, OPG, IL-35 düzeyleri ve RANKL/OPG oranı ilişkisi

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	KAS (mm)	DOS hacmi (µl)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	RANKL /OPG
PI -r	1,00	0,864 ^a	0,625 ^a	0,690 ^a	0,660 ^a	0,536 ^a	-0,490 ^a	0,697 ^a	0,617 ^a
p		<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a
GI -r		1,00	0,710 ^a	0,745 ^a	0,711 ^a	0,578 ^a	-0,553 ^a	0,751 ^a	0,689 ^a
p			<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a
SCD (mm) -r			1,00	0,860 ^a	0,744 ^a	0,602 ^a	-0,462 ^a	0,771 ^a	0,616 ^a
p				<0,001 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a	0,003 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a
KAS (mm) -r				1,00	0,694 ^a	0,647 ^a	-0,479 ^a	0,794 ^a	0,632 ^a
p					<0,001 ^a	<0,001 ^a	0,002 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a
DOS hacmi (µl) -r					1,00	0,463 ^a	-0,406 ^a	0,709 ^a	0,505 ^a
p						0,003 ^a	0,009 ^a	<0,001 ^a	0,001 ^a
RANKL* (ng/ml) -r						1,00	-0,398 ^a	0,721 ^a	0,776 ^a
p							0,011 ^a	<0,001 ^a	<0,001 ^a
OPG* (ng/ml) -r							1,00	-0,444 ^a	-0,829 ^a
p								0,004 ^a	<0,001 ^a
IL-35* (ng/ml) -r								1,00	0,655 ^a
p									<0,001 ^a
RANKL/OPG* -r									1,00
p									

^aSpearman korelasyon analizi. ^bPearson korelasyon analizi

SCD: Sondlama cep derinliği, **GI:** Gingival indeks, **PI:** Plak indeksi, **KAS:** Klinik ataçman seviyesi.

RANKL/OPG oranının klinik periodontal parametreler ile arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı doğrusal bir ilişki olduğu görüldü ($p<0,001$). RANKL düzeyi ile Pİ, Gİ, SCD ve KAS değerleri arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki saptandı (Sırasıyla; $r=0,536$,

Gİ, SCD ve KAS ile arasında orta düzeyde ilişkili olduğu görüldü (Sırasıyla, $r=0,629$, $r=0,623$, $r=0,673$, $r=0,570$, $p<0,001$). DOS hacmi ile OPG arasında negatif yönlü zayıf bir ilişki saptandı 61 ($r=0,477$, $p=0,002$). RANKL/OPG ile DOS hacmi arasında pozitif yönlü zayıf ilişki

tespit edildi ($r=0,492$, $p=0,001$). RANKL, OPG, IL-35 düzeylerinin ve RANKL/OPG oranının birbirleriyle olan ilişkisi incelendiğinde, OPG ile RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında pozitif yönlü zayıf bir ilişki olduğu görüldü (Sırasıyla; $r=0,334$, $p=0,035$, $r=0,381$, $p=0,015$). RANKL ve IL-35 düzeyleri arasında ise pozitif yönlü güçlü ilişki bulundu ($r=0,831$, $p<0,001$). RANKL ve IL-35 düzeylerinin klinik periodontal parametreler ile arasında anlamlı doğrusal ilişki tespit edilmedi ($p>0,05$). OPG ile periodontal parametreler arasında negatif yönlü orta derecede anlamlı ilişki bulundu ($r=-0,582$, $r=-0,650$, $r=-0,583$, $r=-0,564$, $p<0,001$).

görülmektedir.³⁰

Sondlamada cep derinliği, klinik ataçman seviyesi, plak indeksi, sondlamada kanama ve alveolar kemik kaybının radyografik değerlendirmesi gibi geleneksel tanı ölçütleri, hastalığın ciddiyetini değerlendirmek için yeterli bilgiyi sağlamaktadır.³¹

Hızlı bir şekilde tanıya izin veren, doğru bilgileri sağlayan ve periodontal hastalık durumunun güvenilir bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan basit ve invaziv olmayan bir tanı aracının hem diş hekimleri hem de hastalar için çok değerli olacağı uzun zamandır bilinmektedir. Tez çalışmamızda Pİ, Gİ, SCD ve KAS gibi klinik parametreler periodontitisli hastalarda sağlıklı

Tablo X. S ve P_s grup verilerinin toplamında klinik periodontal değerlendirmeleri, DOS hacmi, RANKL, OPG, IL-35 düzeyleri ve RANKL/OPG oranı ilişkisi

	Pİ	Gİ	SCD (mm)	KAS (mm)	DOS hacmi (µl)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)	IL-35 (ng/ml)	RANKL /OPG
PI -r	1,00	0,864^a	0,625^a	0,690^a	0,629^a	0,063 ^a	-0,582^a	0,120 ^a	0,693^a
p		<0,001^a	<0,001^a	<0,001^a	<0,001^a	0,701 ^a	<0,001^a	0,460 ^a	<0,001^a
GI -r		1,000	0,710^a	0,745^a	0,623^a	0,050 ^a	-0,650^a	0,140 ^a	0,766^a
p			<0,001^a	<0,001^a	<0,001^a	0,761 ^a	<0,001^a	0,388 ^a	<0,001^a
SCD (mm) -r			1,000	0,860^a	0,673^a	0,189 ^a	-0,583^a	0,152 ^a	0,738^a
p				<0,001^a	<0,001^a	0,242 ^a	<0,001^a	0,350 ^a	<0,001^a
KAS (mm) -r				1,000	0,570^a	0,234 ^a	-0,564^a	0,180 ^a	0,769^a
P					<0,001^a	0,146 ^a	<0,001^a	0,267 ^a	<0,001^a
DOS hacmi (µl) -r					1,000	-0,036 ^a	-0,477^a	0,021 ^a	0,492^a
p						0,824 ^a	0,002^a	0,899 ^a	0,001^a
RANKL* (ng/ml) -r						1,000	0,334^a	0,831 ^a	0,205 ^a
p							0,035^a	<0,001 ^a	0,204 ^a
OPG* (ng/ml) -r							1,000	0,381 ^a	-0,802^a
P								0,015 ^a	<0,001^a
IL-35* (ng/ml) -r								1,000	0,077 ^a
P									0,639 ^a
RANKL/OPG* -r									1,000
p									

^aSpearman korelasyon analizi. ^bPearson korelasyon analizi

SCD: Sondlama cep derinliği, GI: Gingival indeks, PI: Plak indeksi, KAS: Klinik ataçman seviyesi.

Tartışma

Periodontitis, spesifik patojenik mikroorganizmalar ve konağın yanıt değişiklikleri ile ilişkili enfeksiyonlardır. Subgingival mikrofloradaki spesifik mikroorganizmaların periodontitis için belirleyici etkenler olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir.^{28,29}

Periodontal dokulardaki konak savunma mekanizmaları, periodontal yıkımı başlatan etkenlerdir ve doku hasarının büyük kısmından sorumlu oldukları

bireylere göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ve bugüne kadar yapılan birçok çalışma ile uyumlu olduğu gözlenmektedir.^{32,33}

DOS, diş eti sulkusundan veya periodontal cepten akan inflamatuvar bir eksüdadır. Toplanan hacim miktarı çoğunlukla düşük olmaktadır (mikrolitre miktarları), genellikle diş eti ve periodontal dokularda artan iltihaplanma ile artış göstermektedir.^{34,35} Çalışmamızda pratik olması, güvenilir sonuçlar vermesi, daha az

maliyetli olması ve yapılan birçok araştırmayla uyumlu olabilmesi adına çalışmamızda DOS örnekleri ELİSA yöntemiyle incelenmiştir.

Son zamanlarda, Treg hücrelerinin in vitro ve in vivo maksimum düzenleyici aktivitesi için gerekli olan Treg hücresine özgü bir sitokin olan IL-35, büyük ilgi görmüştür. IL-35'in, aktive edilmiş veya aktive olmayan Treg'ler tarafından ifade edildiği, ancak T efektör (Teff) hücreleri tarafından ifade edilmediği gösterilmiştir.³⁶ IL-35'in, apoptozu stimüle etmeden G1 fazında mitozu inhibe ederek esas olarak T hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{36,37}

Sağlıklı, kronik periodontitisli ve agresif periodontitisli bireylerle yapılan, diş eti dokularında IL-35 mRNA'nın ekspresyonunu gösteren bir çalışmada IL-35 mRNA seviyelerinin, agresif periodontitis grubuna (4.71 ± 1.43) kıyasla kronik periodontitisli bireylerde (6.87 ± 2.32) daha yüksek ve en az sağlıklı bireylerin bulunduğu grupta (3.03 ± 1.91) eksprese edildiği gösterilmiştir.³⁸ Çalışmamızda periodontitisli hasta grubunda IL-35 konsantrasyon (ng/ml) seviyesi sağlıklı hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek tespit edilmiş olup yapılan çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir.

DOS örnekleri üzerine yapılan başka bir çalışmada kronik periodontitisli hastalarda konsantrasyon bakımından sağlıklı hasta grubuna göre IL-35 seviyesi daha düşük saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu DOS miktarının periodontitis hastalığıyla beraber artmasının göreceli olarak IL-35 konsantrasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bu yüzden araştırmacılar IL-35 konsantrasyonu yerine DOS numunelerindeki toplam IL-35 miktarını esas alarak raporlamayı yapmış ve total miktar bakımından IL-35 seviyesi periodontitisli hasta grubunda sağlıklı gruba göre daha yüksek tespit edilmiştir.³⁹ Araştırmamızda ise konsantrasyon bakımından IL-35 seviyesi Grup P_d 'de Grup A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca Grup S ile Grup P_s arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Grup Pd ile Grup Ps arasında ise IL-35 bakımından istatistiksel olarak anlamlı seviyede Grup Pd daha yüksek bulunmuştur. IL35' in dâhil edildiği başka bir çalışmada IL-35 ve IL-17' nin periodontitisli hastaların DOS örneklerinde sağlıklı katılımcılara göre

daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ise IL-35 periodontitisli hasta grubunda sağlıklı katılımcılara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek saptanmıştır. Çalışmamızın bu verilerle uyumlu olduğu gözlenmektedir. Ayrıca çalışmamızda kontrol grubu ve periodontitisli grubun verileri beraber baz alındığında IL-35 ile KAS, SCD ve Gİ arasında pozitif yönlü güçlü derecede, Pİ ile orta derecede pozitif yönlü korelasyon tespit edilmiştir.

Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada RANKL ve IL-35 tarafından indüklenen RAW264 (RAW) hücrelerinin osteoklastik farklılaşması ve osteoklastogenezi, tartarat dirençli asit fosfat 68 boyama, hidroksiapatit rezorbsiyon deneyleri ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilmiştir. Çalışmada IL-35'in RANKL ile uyarılan sinyal yolları üzerindeki etkisi, western blot analizi ile değerlendirilmiş ve RAW hücrelerinin RANKL ve IL-35 tarafından birlikte uyarılmasının, tek başına RANKL tarafından uyarılmaya kıyasla önemli ölçüde osteoklastogenezi indüklediği ve bu duruma bağlı olarak kemik rezorpsiyonunu artırdığı gösterilmiştir.⁴⁰ Çalışmamızda ise RANKL ve IL-35'in KAS ve SCD gibi klinik parametrelerle pozitif yönlü ilişkisi saptanmıştır. Bu veriler ışığında hastalık şiddetinin artması ile RANKL ve IL-35 konsantrasyon seviyelerinin DOS'da artması belirtilen bu markırların sinerjistik etkisini gösterebilir ve böylece IL-35'in periodontitis patogenezi de ikili bir rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Bu veriler doğrultusunda belirtilen çalışmayla uyumlu olabileceği görülmektedir. Ancak IL-35'in hastalık şiddetinin artmasına bağlı olarak da yükselmiş olabileceği düşünülmektedir.

Deneysel veri tabanı madenciliği ve istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak, IL-35'in doku ekspresyon profillerini ve düzenleyici mekanizmalarını diğer antienflamatuar sitokinelere göre inceleyen bir çalışmada TGF-β gibi antienflamatuar sitokinlerin yapısal olarak eksprese edildiği ve inflamasyona karşı erken evrede dokuda koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. IL-35'in ise dokularda yapısal olarak eksprese edilmediği ve ancak enflamatuar uyaranlara yanıt olarak indüklenebilir olduğu gösterilmiştir.⁴¹ Ancak araştırmamızda gerek sağlıklı gruptan alınan gerekse periodontitis grubunun hastalıktan etkilenmemiş bölgelerinden alınan DOS

örneklerinden IL-35 tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumu klinik olarak sağlıklı diş eti oluşunda bile konakçı ve bakteri arasında her zaman bir etkileşim olduğunu belirtmişlerdir.

Sağlıklı, gingivitisli ve kronik periodontitisli bireyler arasında DOS ve serumdaki IL-35 düzeylerini belirlemek ve cerrahi olmayan periodontal tedavinin etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada kronik periodontitis hastalarında IL-35 konsantrasyonunun en yüksek olduğu, bunu gingivitisli ve sağlıklı bireylerin izlediğini ayrıca tedavi sonrası kronik periodontitis hastalarında IL-35 konsantrasyonunun sağlıklı bireylerin değerlerine yakın olduğu gösterilmiştir.⁴² Çalışmamızda periodontitisli bireylerin IL-35 konsantrasyon seviyesi sağlıklı bireylere göre periodontitisli bireylerde anlamlı seviyede yüksek tespit edilmiştir ve yapılan çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca Gİ, SCD ve KAS değerleri ile arasında pozitif yönlü güçlü, Pİ ile arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki saptanmıştır. Bununla birlikte IL-35'in periodontal hastalık şiddetini göstermede biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bir kültür çalışmasında osteoklastların üretilmesinin, osteoblastlar veya kemik iliği stromal hücreleri gibi öncü hücrelerin spesifik mezenkimal hücrelerle fiziksel temasını gerektirdiği ortaya konulmuştur.⁴³ Bu kritik gözlem, anahtar osteoklastojenik sitokin olan RANKL'in keşfini sağladı. TNF süper ailesinin bir üyesi olan RANKL, osteoblastların hücre membranında yerleşik bir proteindir ve kemik iliği makrofajları üzerindeki reseptörü RANK'ı tanıır ve osteoklast proliferasyonuna neden olur.^{44,45} RANKL aktivitesi, çözünür bir tuzak reseptör olan OPG tarafından inhibe edici olarak düzenlenir.⁴⁶ OPG/RANKL oranındaki bozukluk patolojik durumların kemik rezorpsiyon hızını belirlediği gösterilmiştir.⁴⁷

Periodontal lezyonlarda Th17 hücreleri ve IL-17 de tespit edilmiştir ve ilerlemiş periodontitiste IL-17 seviyesinin, diğer T yardımcı hücrelerden salgılanan sitokinelere kıyasla önemli ölçüde arttığı bir çalışmada gözlenmiştir.⁴⁸ IL-17'nin RANKL ekspresyonunu artırdığı ve aynı zamanda osteoblastik hücrelerde in vitro ve in vivo olarak OPG ekspresyonunu azalttığı ve bir fare artrit modelinde osteoklast oluşumunu ve kemik

erozyonunu artırdığı gösterilmiştir.⁴⁹

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, IL-35'in kolajen kaynaklı artritli etkili bir şekilde azalttığı gözlenmiş, bununla birlikte IL-17 üretimini baskıladığı, ancak IFN- γ sentezini artırdığı belirtilmiştir. Bu nedenle IL-35, düzenleyici T hücrelerinin proliferasyonu ve Th17 hücre gelişiminin baskılanması yoluyla bağışıklık tepkisini baskılayan yeni bir antienflamatuar sitokin olarak belirtilmiştir.²⁶

Ayrıca deneysel olarak kolajenle indüklenmiş artritli sıçanlarda ve kültüre edilmiş fibroblast sinoviyositlerinde, OPG ve RANKL ekspresyonu üzerindeki IL-35'in etkisi araştırılmış, yapılan çalışmada IL-35 tedavisi ile IL-17 ve RANKL ekspresyonunda azalma ve bu duruma OPG ekspresyonunda artış eşlik etmiş böylece artrit gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. Bununla birlikte, IL-35'in, doza bağlı olarak RANKL ekspresyonunu inhibe ettiği ve kültürlenmiş fibroblast benzeri sinoviyosit hücrelerinde OPG ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir.⁵⁰ Bizim yaptığımız çalışmada ise OPG ile IL-35 arasında negatif yönlü zayıf, RANKL ile IL-35 arasında pozitif yönlü güçlü bir korelasyon tespit edilmiş ve IL-35 ile hastalık şiddeti arasında da pozitif yönlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

Periodontitis ve artrit arasında etiyoloji ve patofizyoloji açısından çok benzer kavramsal bir çerçeve vardır.⁵¹ Her iki hastalık için de çevresel faktörler ve genetik faktörler merkezi rol oynamaktadır. Artrit otoimmün, periodontitis mikrobiyal bir hastalıktır.¹³ Her ne kadar artrit ve periodontitis hastalıklarının doğası birbirine benzese de çalışmamızda IL-35'in OPG ile negatif korelasyon ve RANKL ile pozitif korelasyon göstermesi ayrıca IL-35'in RANKL/OPG oranı ile pozitif yönlü korelasyonu nedeniyle periodontitis patogenezinde IL-35'in farklı bir mekanizma gösterebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte IL-35'in periodontal dokularda hastalık şiddetinin artmasına bağlı olarak artmış olabileceği de düşünülmektedir.

Periodontitisli ve periodontal olarak sağlıklı bireylerin DOS örneklerinin ELİSA analizi yapılan bir çalışmada DOS'daki RANKL ve OPG'nin in vivo konsantrasyonlarının periodontitisli hastalardan alınan DOS'da sağlıklı hasta grubuna göre RANKL seviyesinin daha yüksek olduğu ayrıca OPG konsantrasyon

seviyesinin periodontitisli hasta grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha düşük olduğu bildirilmiştir.⁵² Tez çalışmamızda RANKL konsantrasyon seviyesi periodontitisli hastalarda istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha yüksek tespit edilmiş olup OPG konsantrasyon seviyesi sağlıklı bireylerde daha yüksek tespit edilmiştir, çalışmamızın bu veriler ışığında belirtilen çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada yine RANKL seviyesinin periodontitisli hastalarda sağlıklı deneklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiş ve OPG seviyesinin de sağlıklı deneklerde periodontitisli hastalara göre anlamlı ölçüde daha yüksek tespit edildiği belirtilmiştir. Ayrıca RANKL/OPG oranının; KAS, SCD ve Pİ ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir.⁵³ Bizim yaptığımız tez çalışmasında, RANKL konsantrasyon seviyesi ile Pİ, Gİ, SCD ve KAS değerleri arasında pozitif yönlü orta derecede anlamlı ilişki, OPG konsantrasyon seviyesinin Pİ, SCD ve KAS değerleri ile arasında negatif yönlü zayıf, Gİ değerleri ile arasında negatif yönlü orta derecede anlamlı ilişki gözlenmiştir. RANKL/OPG oranının da klinik parametrelerle arasında pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır ve RANKL/OPG oranı periodontitisli grupta sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha yüksek saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızın belirtilen diğer çalışmayla uyumlu olduğu görülmektedir.

Periodontal tedavi sonrası DOS'daki RANKL/OPG oranındaki değişiklikleri değerlendiren bir çalışmada, RANKL konsantrasyonu periodontitisli bireylerin patolojik bölgesinden alınan DOS örneklerinde, sağlıklı bireyler ile periodontitisli bireylerin hastalıktan etkilenmeyen bölgesinden alınan DOS örneklerine göre anlamlı seviyede daha yüksek belirlenmiştir. OPG konsantrasyon seviyesi ise sağlıklı bireylerde periodontal olarak patolojik bölgeden alınan örneklerden anlamlı seviyede daha yüksek saptanmıştır. Periodontitisli hasta grubunda sağlıklı bölgelerden alınan örnekler ile sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte tedavi öncesi periodontitisli hasta grubunda patolojik bölgeden alınan RANKL/OPG oranı sağlıklı bireylere göre anlamlı seviyede daha yüksek belirlenmiştir.⁵⁴ Çalışmamızda

RANKL konsantrasyon seviyesi P_d Grubunda, P_s ve S Grubuna göre anlamlı seviyede daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca OPG seviyesi sağlıklı bireylerde periodontitisli bireylere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bununla birlikte RANKL/OPG oranı S Grubunda P_d ve P_s Gruplarına göre anlamlı seviyede daha düşük belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızın sonuçları yukarıda belirtilen çalışmayla uyumlu olduğu gözlenmektedir.

DOS ve peri-implant oluk sıvısı (PİOS)'nda sklerostin, TWEAK, RANKL ve OPG düzeylerini periodontal ve peri-implant dokularında değerlendiren bir çalışmada, RANKL ile OPG seviyesinin ve RANKL/OPG oranının periodontitisli grupta sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir.⁵⁵ Bizim çalışmamızda RANKL seviyesi ve RANKL/OPG oranı periodontitisli hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı seviyede yüksek tespit edilmiştir. Ancak OPG seviyesinin sağlıklı bireylerde periodontitisli hastalara göre anlamlı seviyede daha yüksek olduğu görülmüştür. OPG ve RANKL seviyelerinin DOS'da incelendiği çalışmalarda RANKL konsantrasyon seviyesinin ve RANKL/OPG oranının anlamlı derecede daha yüksek ayrıca OPG konsantrasyon seviyesinin periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede daha düşük olduğu bildirilmiştir.^{56,57} Çalışmamızda RANKL ve RANKL/OPG oranının periodontitisli bireylerin hastalıktan etkilenen bölgesinden alınan örneklerde sağlıklı bireylerin örneklerine göre anlamlı seviyede daha yüksek, OPG seviyesinin de sağlıklı bireylerde periodontitisli bireylerin hastalıktan etkilenen bölgelerinden alınan örneklere kıyasla anlamlı seviyede daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızın yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Kaynaklar

1. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):745-59.
2. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med: an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 1998;9(3):248-66.
3. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1601-8.
4. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S173-s82.
5. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S149-s61.
6. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:49-59.
7. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1569-76.
8. Chakravarti A, Raquil MA, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood.* 2009;114(8):1633-44.
9. Kang W, Hu Z, Ge S. Healthy and Inflamed Gingival Fibroblasts Differ in Their Inflammatory Response to *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide. *Inflammation.* 2016;39(5):1842-52.
10. Rajendran M, Looney S, Singh N, Elashiry M, Meghil MM, El-Awady AR, et al. Systemic Antibiotic Therapy Reduces Circulating Inflammatory Dendritic Cells and 87 Treg-Th17 Plasticity in Periodontitis. *J Immunol (Baltimore, Md : 1950).* 2019;202(9):2690-9.
11. Balci Yuce H, Gokturk O, Aydemir Turkal H, Inanir A, Benli I, Demir O. Assessment of local and systemic 25-hydroxy-vitamin D, RANKL, OPG, and TNF levels in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Oral Sci.* 2017;59(3):397-404.
12. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000.* 2007;43:65-84.
13. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:87-107.
14. Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Cafferata EA, Monasterio G, Vernal R. Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:7806912.
15. Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, Culshaw S. T cells, teeth and tissue destruction - what do T cells do in periodontal disease? *Mol Oral Microbiol.* 2016;31(6):445-56.
16. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203(12):2673-82.
17. Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Diaz-Guerra E, Silva A, et al. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *J Clin Periodontol.* 2014;41(5):451-9.
18. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Periodontol Invest.* 1999;103(9):1345-52.
19. Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunological reviews.* 2008;226:248-62.
20. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(7):521-31.
21. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews.* 2004;202:96-105.
22. Pusic KM, Pusic AD, Kemme J, Kraig RP. Spreading depression requires microglia and is decreased by their M2a polarization from environmental enrichment. *Glia.* 2014;62(7):1176-94.
23. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507(7492):366-70.
24. Wirtz S, Billmeier U, McHedlidze T, Blumberg RS, Neurath

- MF. Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1875-86.
25. Mitani A, Niedbala W, Fujimura T, Mogi M, Miyamae S, Higuchi N, et al. Increased expression of interleukin (IL)-35 and IL-17, but not IL-27, in gingival tissues with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2015;86(2):301-9.
26. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European journal of immunology*. 2007;37(11):3021-9.
27. Löe HJTJoP. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. 1967;38(6):610-6.
28. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63(4 Suppl):322-31.
29. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994;65(3):260-7.
30. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(4 (Pt 1)):327- 34.
31. Polson AM, Goodson MJJoP. Periodontal diagnosis: current status and future needs. 1985;56(1):25-34.
32. Yan Oosten MA, Mikx FH, Renggli HH. Microbial and clinical measurements of periodontal pockets during sequential periods of non-treatment, mechanical debridement and metronidazole therapy. *J Clin Periodontol*. 1987;14(4):197-204.
33. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Haffajee AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984;11(7):448-58.
34. Armitage GCJP. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. 2004;34(1):109-19.
35. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:216-29.
36. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
37. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1093-101.
38. Kalburgi NB, Muley A, Shivaprasad BM, Koregol AC. Expression profile of IL-35 mRNA in gingiva of chronic periodontitis and aggressive periodontitis patients: a semiquantitative RT-PCR study. *Dis Markers*. 2013;35(6):819-23.
39. Köseoğlu S, Sağlam M, Pekbağrıyanık T, Savran L, Sütçü R. Level of Interleukin35 in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Plasma in Periodontal Disease and Health. *J Periodontol*. 2015;86(8):964-71.
40. Kamiya Y, Kikuchi T, Goto H, Okabe I, Takayanagi Y, Suzuki Y, et al. IL-35 and RANKL Synergistically Induce Osteoclastogenesis in RAW264 Mouse Monocytic Cells. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(6).
41. Li X, Mai J, Virtue A, Yin Y, Gong R, Sha X, et al. IL- 35 is a novel responsive antiinflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PloS one*. 2012;7(3):e33628.7
42. Raj SC, Panda SM, Dash M, Patnaik K, Mohanty D, Katti N, et al. Association of Human Interleukin-35 Level in Gingival Crevicular Fluid and Serum in Periodontal Health, Disease, and after Nonsurgical Therapy: A Comparative Study. *Contemp Clin Dent*. 2018;9(2):293-7.
43. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7260-4.
44. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesisinhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):3597-602.
45. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.
46. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.

47. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(5-6):243-53.
48. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(1):1-6.
49. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenende Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol. (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(5):2655-62
50. Li Y, Li D, Li Y, Wu S, Jiang S, Lin T, et al. Interleukin-35 upregulates OPG and inhibits RANKL in mice with collagen-induced arthritis and fibroblast-like synoviocytes. *Osteoporos Int*. 2016;27(4):1537-46.
51. Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? 2011;38:106-13.
52. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83(2):166-9
53. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Periodontol*. 2007;34(5):370-6.
54. López Roldán A, García Giménez JL, Alpiste Illueca F. Impact of periodontal treatment on the RANKL/OPG ratio in crevicular fluid. *PloS one*. 2020;15(1):e0227757.
55. Yakar N, Guncu GN, Akman AC, Pinar A, Karabulut E, Nohutcu RM. Evaluation of gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid levels of sclerostin, TWEAK, RANKL and OPG. *Cytokine*. 2019;113:433-9.
56. Balli U, Aydogdu A, Dede FO, Turer CC, Guven B. Gingival Crevicular Fluid Levels of Sclerostin, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand in Periodontitis. *J Periodontol*. 2015;86(12):1396-404.
57. Baltacıoğlu E, Kehribar MA, Yuva P, Alver A, Atagün OS, Karabulut E, et al. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2014;85(2):317-26.