

Dişeti Oluğu Sıvısı Kortizol Düzeylerinin HPLC Yöntemi ile Değerlendirilmesi

[Evaluation of Gingival Crevicular Fluid Cortisol Levels with HPLC Method]

Özgün Özçaka¹,
Nurgün Bıçakcı¹,
Şenol Alpak²

¹Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı Bornova, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen
Bilimleri Bölümü Buca, İzmir

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Özgün Özçaka

Ege Üniversitesi,
Dişhekimliği Fakültesi,
Periodontoloji Anabilim Dalı,
Bornova 35100 İzmir
Faks: +90 232 3880325
E-posta: ozgunozcaka@yahoo.com

Kayıt Tarihi : 15 Temmuz 2009 ; Kabul Tarihi : 20 Temmuz
2010

[Registered : 15 July 2009 ; Accepted : 20 July 2010]

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile öncelikle dişeti oluğu sıvısında kortizol düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İkincil amaç ise farklı periodontal hastalıklarda dişeti oluğu sıvısı örneklerindeki kortizol düzeylerinin karşılaştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmaya 15 kronik periodontitis ve 15 agresif periodontitis hastası dahil edildi. Her bir hastanın sıg, orta ve derin cep derinliklerinin bulunduğu dişlerden toplam 90 adet dişeti oluğu sıvı örneği alındı. Dişeti oluğu sıvı örnekleri yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular: Sığ ceplerden alınan dişeti oluğu sıvısı örnek hacimleri (0.05µL>), derin ceplerdekine (1-0.5 µL) göre daha düşük hacimdedir. Sığ ceplerdeki dişeti oluğu sıvı hacimleri belirtme sınırlarının altında bulunmuştur. Diğer taraftan, orta ve derin ceplerden alınan bazı dişeti oluğu sıvı örneklerinde de kortizol seviyelerinin belirtme sınırlarının altında bulunması nedeniyle, örneklerin kortizol düzeylerinin karşılaştırılması mümkün olmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızın sınırları ışığında, dişeti oluğu sıvı örneklerinde yapılacak analizlerde ve farklı periodontal hastalıklarda kortizol seviyelerini değerlendirmede yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin kullanılmasının uygun bir yöntem olmadığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Kortizol, dişeti oluğu sıvısı, periodontitis, stres, HPLC

ABSTRACT

Objectives: The main aim of the present study was to evaluate the cortisol levels in gingival crevicular fluid by high performance liquid chromatography method. Secondary aim was to compare the cortisol levels in several periodontal diseases.

Methods: Fifteen chronic periodontitis and 15 aggressive periodontitis patients were recruited. A total of 90 gingival crevicular fluid samples were collected from 3 teeth that had shallow, moderate and deep probing pocket depth of each patient. Gingival crevicular fluid samples were analyzed by high performance liquid chromatography method.

Results: Gingival crevicular fluid samples of shallow pockets had lower volume (0.05µL>) than deep pockets (1-0.5 µL). Gingival crevicular fluid cortisol levels of shallow pockets were under the limit of detection. On the other hand, some of the gingival crevicular fluid cortisol levels of moderate and deep pocket samples were under the limit of detection. In this respect, it is hard to analyze and compare the cortisol levels of gingival crevicular fluid samples.

Conclusions: Within the limitations of this study, it may be suggested that high performance liquid chromatography method is not an acceptable method to evaluate gingival crevicular fluid samples and to compare the cortisol levels in several periodontal diseases.

Key Words: Cortisol, gingival crevicular fluid, periodontitis, stress, HPLC

Giriş

Periodontal hastalık risk faktörlerinin saptanabilmesi pek çok araştırmaya konu olmuş ve bu araştırmalarda sigara, sistemik hastalıklar, yaş, cinsiyet ve spesifik bakterilerin varlığı risk faktörlerinin başlıcaları olarak saptanmıştır [1]. Yapılan kesitsel çalışmalarda periodontal hastalığın ilerlemesi ile hastanın psikososyal stres durumu arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür [1-4]. Aslında bu görüş periodontolojide yeni değildir. Stres 40 yıldan beri akut nekrotizan ülseratif gingivitisin ortaya çıkmasında önemli bir predispozan faktör olarak kabul edilmektedir [5].

Stres sisteminin ana komponenti, kortizol oluşumunu kontrol eden kortikotropin salınan hormondur. En önemli glukokortikoidlerden biri olan kortizol, adrenal korteksten salgılanan bir hormondur. Kan şekeri konsantrasyonu ve yağ metabolizması üzerine majör etkisi vardır. Bu endokrin etkisinin yanında kortizolün lenfatik doku hiperplazisini indükleyici ve lenfositlerin fonksiyonunu inhibe edici immunsüpresif ve anti-enflamatuvar etkileri de vardır [6,7]. Antikor oluşumu inhibe oldukça humoral immun savunma da belirgin bir azalma olur. Kortizolün aynı zamanda fibroblast proliferasyonunu engellediği dolayısı ile bazı pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini baskıladığı da bildirilmiştir [8-10].

Kortizolün stresin bir göstergesi olmasından dolayı son yıllarda yapılan yayınlarda hastaların kan ya da tükürük örneklerinde kortizol seviyelerinin tayini yöntem olarak tercih edilmektedir [11, 12]. Son araştırmalarla özellikle tedaviye direnç gösteren ve kortizol seviyesinin yüksek olduğu periodontitis olgularında periodontal yıkımın da daha fazla olduğu, dolayısı ile stres ile periodontitis arasında ilişki bulunduğu ileri sürülmektedir [2,4,13-15].

Dişeti oluğu sıvısı, içerdiği bakteri ve ürünleri ile konak enflamatuvar hücreleri ve serum kökenli faktörler nedeniyle son yıllarda periodontal hastalıkların tanısında kanın yanı sıra çok kullanılan bir materyal olmuştur. Böylelikle dişeti oluğu sıvısında saptanabilen biyolojik belirteçler, periodontal hastalığın patogenezinin ortaya konmasına ışık tutmaktadır.

Kortizol tayini kanda ve tükürükte yapılır. Kandaki kortizolün bir kısmı proteinlere bağlanırken serbest kalan diğer kısmı immun reaksiyonlar ve enflamatuvar süreci inhibe eder [16-18]. Diğer steroidler gibi kortizol de tükürükte bulunmaktadır.

Dişeti oluğu sıvısından alınan örneklerin hacimce çok küçük olmasından dolayı kortizolün dişeti oluğu sıvısında doğru olarak saptanabilmesi yöntem açısından zorlayıcı olmaktadır. Yayımlanan bir araştırmada radyoimmuno assay (RAI) yöntemi ile ilk kez dişeti oluğu sıvısında da kortizol varlığı saptanmıştır [19]. Bu pilot çalışma kortizolün stres ile periodontal hastalık arasında iddia edilen ilişkiyi ne oranda etkilediğini araştırabilmek için yeni bir ufuk açmıştır.

İleride yapılacak araştırmalara ışık tutması açısından kortizolün dişeti oluğu sıvısında yüksek performanslı sıvı kromatogram (HPLC) yöntemi ile tayin edilebilirliğinin belirlenmesi bu çalışmanın öncelikli hedefidir. Bu

hedefin yanında, periodontal hastalığın birey üzerinde stres oluşturarak hastalığın patogenezinin olası etkisinin olup olmadığını ortaya koyabilmek için planladığımız bu araştırmada kronik ve agresif periodontitis hasta gruplarında dişeti oluğu sıvısı kortizol seviyelerinin karşılaştırılması ile kortizolün farklı periodontal hastalık gruplarındaki düzeyinin saptanabilmesi de amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırmaya Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na başvuran toplam 30 hasta dahil edilmiştir. Çalışma grubu, sistemik olarak sağlıklı, ilaç kullanmayan 15 kronik periodontitisli (KP) ve 15 agresif periodontitisli (AgP) bireyden oluştu. Çalışma grubundaki bireylerin hepsinin ağızda sığ, orta ve derin olmak üzere üç farklı cep derinliklerine sahip en az üç dişlerinin bulunması şartı arandı. Dişeti oluğu sıvı (DOS) örneklemeleri her bireyin bu üç farklı dişinden alındı. Sığ kabul edilen cepler aynı zamanda her bireyin sağlıklı kontrolünü oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar bilgilendirilerek onayları alındı. Bireylerin dental ve medikal anemnezleri ve sigara içme alışkanlıkları kaydedilerek günde 10'dan fazla sigara içen bireyler çalışma dışı bırakıldı.

Klinik Periodontal Parametreler

Çalışmaya katılan bireylerin ilk seanslarında radyografik değerlendirmeleri ve ağızda bulunan tüm dişlerin 6 bölgesinden sondalanan cep derinlikleri, klinik ataşman kaybı, plak indeks değerleri ile sondalamada kanama değerleri saptanarak 0-3 mm. arasındaki cep derinliğine sahip bölgeler sığ, 4-6 mm. arasındakiler orta ve 7 mm. ve üzerindeki de derin cep olarak nitelendirildi.

Dişeti Oluğu Sıvı (DOS) Örneklerinin Alınması

Çalışmaya katılan her bireyin ağızda sığ, orta ve derin olarak belirlenen periodontal ceplerden DOS örneği alınmadan önce, dişler pamuk rulolarla tükürükten izole edildi. Hava spreyi ile nazikçe kurutulduktan sonra dişlerin kolelerindeki supragingival plak pamuk peletler yardımıyla uzaklaştırıldı. Periopaper strip (ProFlow, Inc., Amityville, NY) dikkatlice dirençle karşılaşıncaya kadar cep içersine yerleştirilerek 30 sn. boyunca bırakıldı. Toplanan dişeti oluğu sıvısının miktarı kalibre edilmiş Periotron 8000 (Harco, NY) cihazı ile saptandı. Daha sonra periopaperlar boş eppendorf tüplerine alınarak çalışılıncaya kadar -40°C derecedeki soğutucuya kondu. Plak indeks değerleri dışındaki diğer klinik periodontal ölçümler travmaya neden olmamak için DOS örnekleri alındıktan sonra gerçekleştirildi. Tüm ölçümler ve DOS örneklerinin alınması tek araştırmacı tarafından yapıldı. DOS örneklerinin 08.45-16.00 saatleri arasında alınmasına dikkat edildi.

DOS Örneklerinde Kortizol Tayini

Araştırmada kullanılan kortizol (Sigma), metanol

(Merck), asetonitril (Merck) ve fosforik asit (Merck) HPLC'ye uygun saflıkta olup kromatogramlar HP Agilent marka ve 1100 kod nolu HPLC cihazı ve Phenomenex Luna 5µ C18(2) 250x4.60 mm kolonu ve Hichrom 5µ C18 125x4.60 mm ve ACE 5µ C18 150x4.60 mm kolonları ile uygun guard kolonlar kullanılarak alınmıştır. Kromatogramlar, 25°C ve 0.85-1 mL/dk. akış hızlarında, %0.1 fosforik asitli saf su/asetonitril/metanol (50/37/13) ve [60/40 (37–13)] karışımı ile elüsyon sonrası 245nm de UV dedektör ile belirleme yoluyla elde edilmiştir. Standartlar 1/1 metanol-su veya metanolde hazırlanmış stok çözeltilerin 10-500 µg/L (ng/mL) derişiminde olacak şekilde 1/1 metanol-su, metanol veya elüsyon çözeltisi ile seyreltilmesi yoluyla hazırlanmıştır. Analiz 20 µL enjeksiyon ile yapılmıştır.

Yöntemin standardizasyonu belirtme sınırı (limit of detection; LOD), % geri kazanım ve kısa süreli madde dayanıklılık testleri ile yapılmıştır. Her gün belirli aralıklarla standart enjeksiyonu ile cihazın ölçüm duyarlılığı kontrol edilmiştir. Yüzde geri kazanım düşük, orta ve yüksek derişimde 3 standart örneğin 5'er µL'si boş periopaper'lara emdirildikten sonra ve 100'er µL ekstraksiyon çözeltisinde önce oda sıcaklığında tutulmuş, daha sonra vorteksenerek ultrasonik su banyosunda bekletilip 5000 devirde 5 dk. santrifüjleme sonrası analizleri yapılarak saptanmıştır.

Örneklerin analizleri, DOS emdirilmiş periopaper'lar ve % geri kazanım işlemleri uygulanarak hazırlandıktan sonra her örneğe 20'şer µL standart eklenerek yapılmıştır.

Bulgular

Çalışmaya katılan kronik periodontitis ve agresif periodontitisli bireylerin demografik özellikleri ve tüm ağız klinik parametreleri Tablo-1 de belirtilmiştir.

Tablo 1: Bireylerin demografik özellikleri ve tüm ağız klinik parametreleri

	Kronik Periodontitis n=15	Agresif Periodontitis n=15
Yaş	45.63 ± 5.21	30.23 ± 3.54
Kadın/Erkek	6/9	8/7
Cep (mm.)	4.06 ± 0.88	3.91 ± 0.36
Ataşman (mm.)	5.47 ± 1.20	4.20 ± 0.56
Kanama (%)	73.12 ± 24.44	42.12 ± 11.64
Plak (%)	92.22 ± 15.22	22.82 ± 10.62

Standartların Analiz Bulguları

Uzun kolon olan Phenomenex Luna 5µ C18(2) 250x4.60 mm kolonu ardışık olarak kullanılmış ve bu kolon ile alınan sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır. 1/1 metanol-su'da 10–500 µg/L derişim aralığında hazırlanan standart kortizol örneklerine ilişkin kromatogram değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Gürültü pik yüksekliği dikkate alınarak belirtme sınırının 10 µg/L olduğu saptanmıştır

(Şekil-1). Standartlar artan pik alanı ve pik yüksekliğinde aynı alıkonma zamanında kaydedilmiştir.

Tablo 2: Farklı derişimdeki standart örneklerin kromatogram değerleri

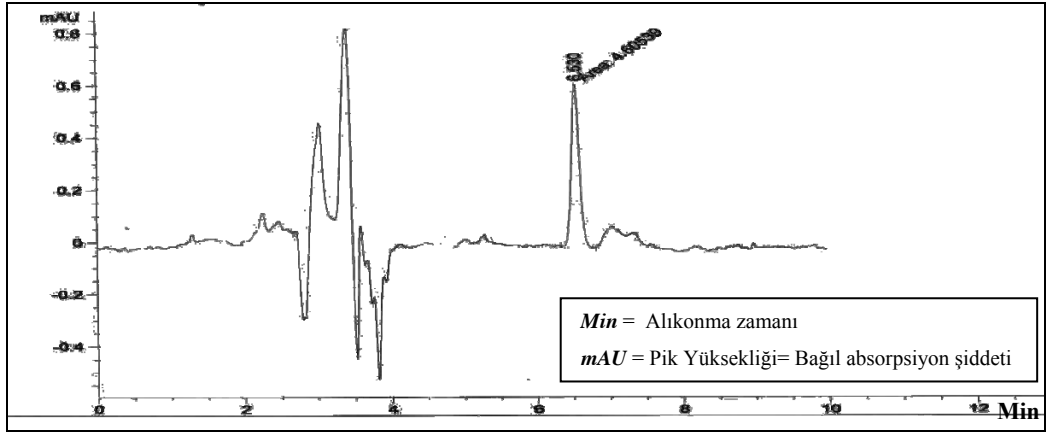
Standart Derişimi (µg/L)	Alıkonma Zamanı (dak)	Pik Alanı (mAU's)	Pik Yüksekliği (mAU)
10	6.627	1.6093	0.1045
20	6.606	1.2998	0.1595
50	6.613	2.9745	0.3789
100	6.611	5.8447	0.7458
200	6.617	11.2903	1.4366
500	6.611	31.1546	3.8033

Örneklerin Analiz Bulguları

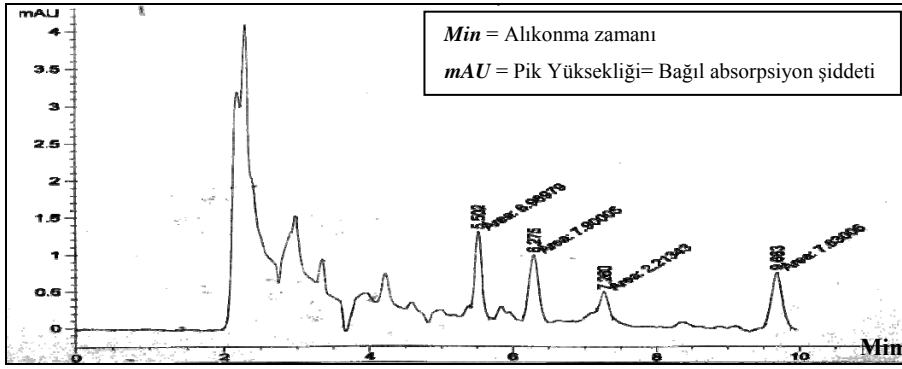
Ön çalışmalardan sonra hastalardan alınan DOS örneklerinin analizine geçildi. 15 agresif ve 15 kronik periodontitisli hastanın sığ, orta ve derin ceplerinden alınan 90 DOS örneği standart katma yöntemi ile incelendi. 80 µL periopaper ekstraktına 20 µL standart (100 µg/L derişiminde) katılarak ölçüm yapıldığından, örnek derişimi de (X) Standart grafiği değeri= $0.8X+0.2 \times 100$ bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre, kör, kortizol emdirilmiş ve bazı standart katmasız ve standart katmalı DOS örneklerine ait karşılaştırılabilir kromatogramları aşağıda verilmiştir (Şekil-2, Şekil-3, Şekil 4A-4B, Şekil 5A-5B).

Şekil-5A ve 5B deki kromatogramlar incelendiğinde, Şekil 5B a2, b2 ve c2 de (standart katılmış) kortizol piki gözlenirken, Şekil 5A'da ise a1, b1 ve c1 kromatogramlarında bu alıkonma zamanında kayda değer, dikkate alınabilir özellikli pik gözlenmemiştir, var ise de diğer gürültü piklerinin arasında kaybolmuştur. Diğer örneklerde de benzer analizler yapıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir: Buna göre;

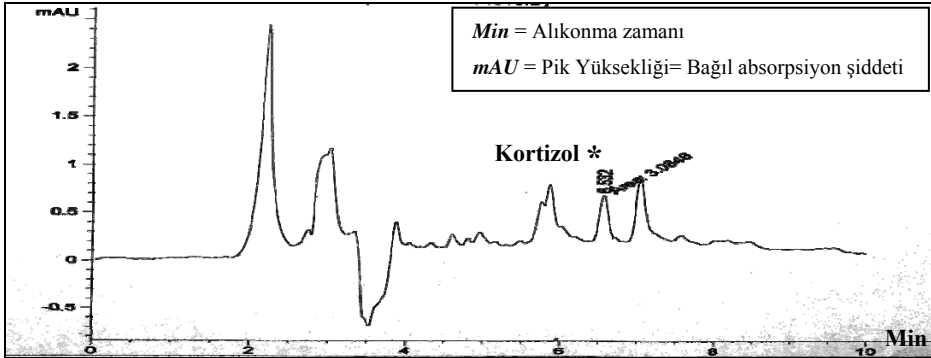
- Bazı örneklerde standart katma sonucu kortizol gözlemlendi. Bu örnekler karşılaştırmalı olarak incelendiğinde kortizolün kimi örneklerde derin ceplerde, kimisinde sığ ceplerde, kimisinde ise orta ceplerde fazla olduğu gözlemlendi (Şekil-6'de AgP'li 8, 9 nolu ve KP'li 24 kod nolu hastaların DOS kortizol miktarları örnek olarak verilmiştir).
- Bazı örnek miktarları ise çok düşük olduğundan, kortizol pikinin gürültü pikleri arasında olduğu düşünülüp ancak standart katma ile fark edilebilir düzeye getirilerek gözlemlendi.
- Geri kalan tüm örneklerin benzer şartlarda analizlerine devam edilmesine karşın kortizole ait temel, belirleyici piklerin alıkonma zamanlarında artmalar gözlenmesi sonuçların güvenilirliği açısından şüphe yarattı; Bütün bunlar dikkate alındığında; analizleri yapılan tüm örnekler için kesin bir değerlendirme yapmak mümkün olmadı.



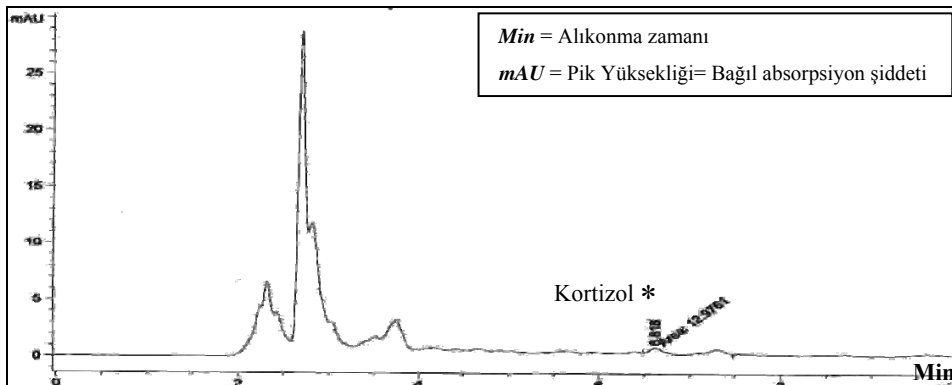
Şekil 1. 10 µg/L Kortizol Standartının Kromatogramı



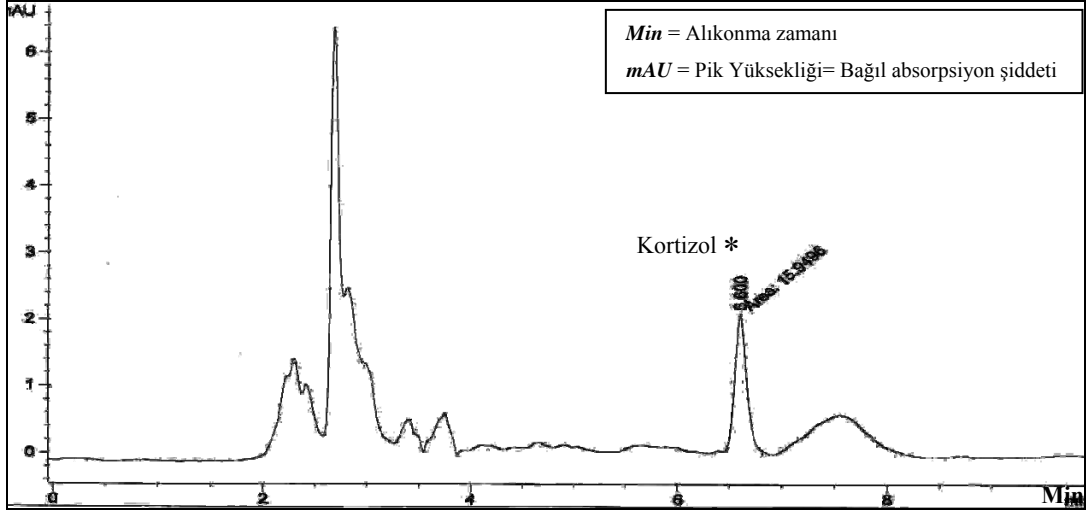
Şekil 2. Boş periopaperların (kör) 100µL çözgen ile ekstraksiyonuna ait kromatogram



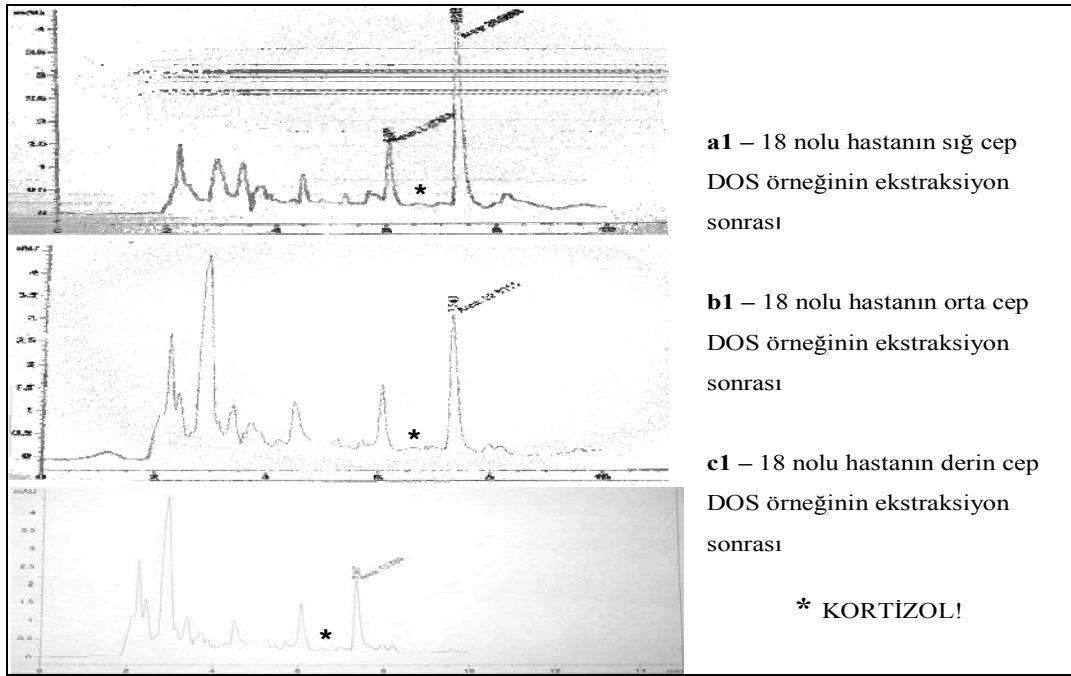
Şekil 3. Kortizol (100 µg/L) emdirilmiş boş periopaper kromatogramı



Şekil 4A. Standart katmasız DOS örneğinde kortizol kromatogramı



Şekil-4B: Standart katmalı DOS örneğinde kortizol kromatogramı

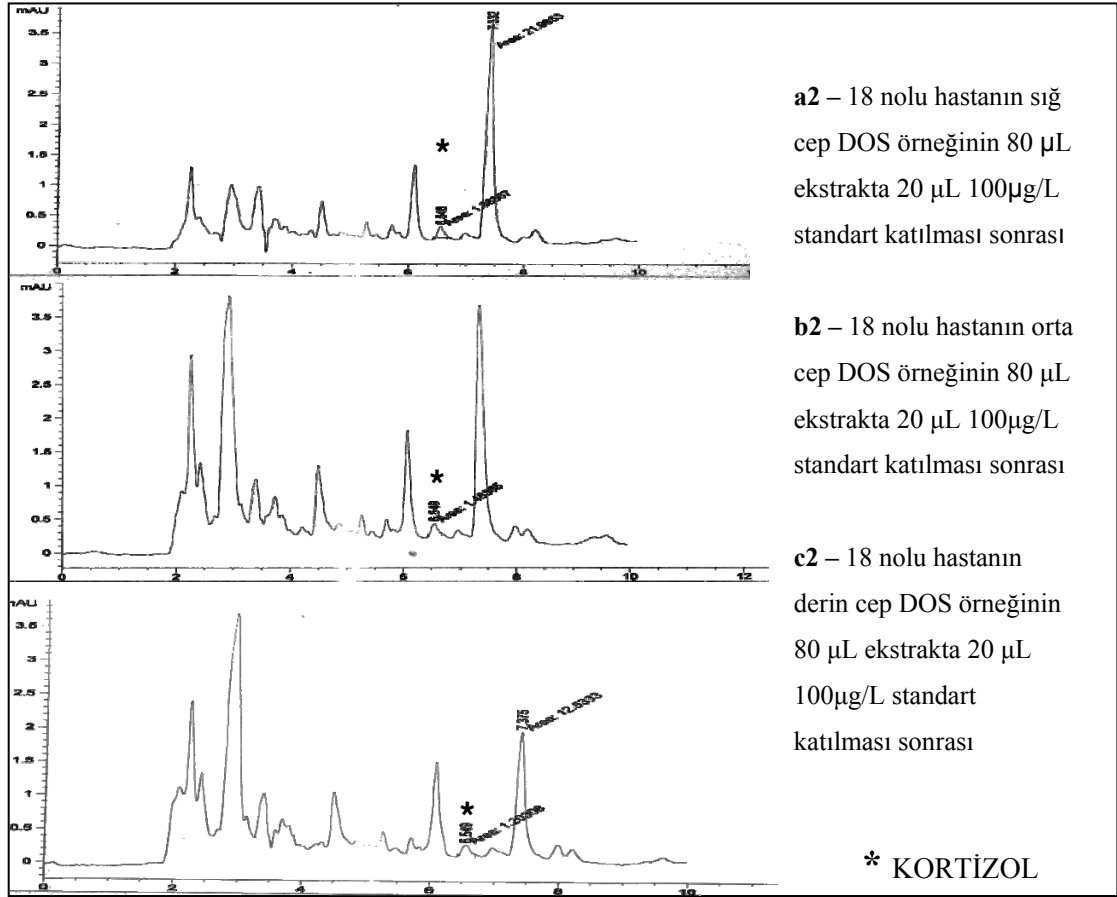


Şekil 5A. Kronik periodontitisli 18 nolu hastanın a1,b1 ve c1'in standart katılmamış kromatogramları

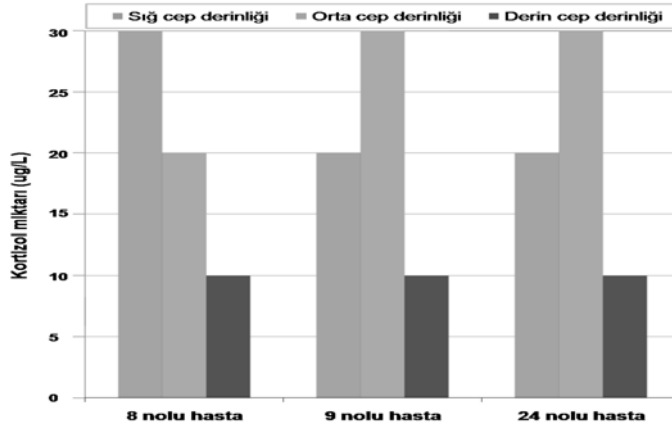
Tartışma

Yapılan çalışmalarla, özellikle tedaviye dirençli periodontitis olgularında stres ile periodontitis arasında bir bağlantı olduğunun gösterilmesinden sonra ilk kez Axtelius ve ark. [19] tarafından dişeti oluğu sıvısında bir stres hormonu olan kortizol tayini yapılmıştır [2,4,15]. Bu çalışmada, değerlendirilen periodontitisli bireylerin yaş, kullandıkları ilaçlar, son dalanan cep derinliklerinin ve sigara alışkanlıklarının kaydedildiği belirtilmişse de, yalnızca bir hastanın son dalanan cep derinliğinden söz edilmektedir. Araştırmada, periodontitisli hastalardan 8.45-16.00 saatleri arasında tükürük ve her hastanın bir

kuadrantında 4 den 8 nolu dişlere kadar dişeti oluğu sıvısı toplanmış ve daha sonra çeşitli uygulamalar geçiren örneklerde kortizol tayini Modifiye Radio Immuno Assay (RIA) yöntemi kullanılarak yapılmıştır [19]. Biz de Axtelius ve ark.'larının, diğer birçok steroid gibi kortizol de tükürükte bulunduğuna göre dişeti oluğu sıvısında da bulunma olasılığı vardır görüşlerine katılıyoruz. Ancak, biz araştırmamızda, Axtelius ve ark.'larının bir pilot araştırma olarak sundukları çalışmalarında saptığımız bazı eksiklikleri dikkate alarak daha ayrıntılı bir çalışma planı gerçekleştirdik [19]. Buna göre, farklı periodontal hastalık gruplarında dişeti oluğu sıvısındaki kortizol düzeylerini karşılaştırabilmek amacı ile kronik



Şekil 5B. Kronik periodontitisli 18 nolu hastanın a2,b2 ve c2'in standart katılmış kromatogramları



Şekil 6. AgP'li 8, 9 nolu ve KP'li 24 nolu hastaların cep derinliklerine göre DOS kortizol miktarları

periodontitis ile agresif periodontitis olguları seçildi. Yanı sıra, kaynaklarda bu konuda yapılmış tek çalışmada seçilen olgularda sistemik hastalıkların varlığı ve bazılarının ilaç kullanıyor olmaları elde edilen sonuçları etkilemiş olabileceğini düşündüğümüzden, hastalarımızın sistemik bir sorunlarının olmamasına, herhangi bir ilaç kullanmıyor olmalarına ve günde 10'dan fazla sigara içmiyor olmalarına özen gösterildi. Enflamasyo-

nun ve periodontal yıkımın şiddetine göre kortizolün miktarında olabilecek olası değişiklikleri saptayabilmek amacı ile de Axtelius ve ark'larının [19] yapmış oldukları çalışmadan farklı olarak hastalarımızdaki sondalanan cep derinliklerini, sığ, orta ve derin olarak sınıflandırıp, aynı zamanda sığ ceplerin her hastanın kendi kontrolünü oluşturacağı düşüncesinden hareketle de sonuçların daha gerçekçi olmasına çalışıldı. Böylelikle, hem farklı

periodontal hastalıklara ve hem de farklı cep derinliklerine göre kortizol miktarındaki olası değişiklikler saptanabilecektir.

Biyolojik sıvılarda kortizol ppb ($\mu\text{g/L}$) düzeylerinde bulunduğundan tayininde duyarlılığı yüksek yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. En çok kullanılan yöntemler yarışmalı protein bağlama (competitive protein binding) [20], radioimmuno assay (RIA) [12, 21], gaz kromatografisi-kütle (GC-MS) [20, 22], likid kromatografi-kütle (LC-MS) [21-24], fluorometri [25] ve HPLC [20-22, 26, 27] gibi yöntemlerdir. Yarışmalı protein bağlama ve RIA yöntemleri duyarlılığı yüksek fakat seçimliliği düşük yöntemlerdir. Çünkü transkordin ve antikorlar kortizol dışındaki steroidleri de bağlayabilirler [22, 23]. GC-MS ve LC-MS duyarlı ve seçimli yöntemler olmakla beraber bu cihazların her laboratuvarında bulunması olası değildir. Fluorometrik yöntemler ise iyi bir duyarlılık sağlasa da kortizolün fluoresans türevine çevrilmesi kontrollü reaksiyon şartlarını gerektirir. Yanısıra, diğer steroidlerin girişim etkisi ve fluoresans türevinin kararlılığı da sorun yaratabilmektedir [21, 23, 27]. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda Axtelius ve ark'larının [19] kullandıkları yöntemin yukarıda belirtilen sakıncalarını göz önünde bulundurarak, kolay örnek hazırlama yöntemi ve kromatografi işlemi ile geniş oranda kullanılan HPLC yöntemini yeğledik. Böylelikle, ilerde yapılacak benzer çalışmalara uyarlanabilecek bir yöntem oluşturma hedefimizi de gerçekleştirebileceğimizi düşündük. Ancak, çalışmamız sonucu elde edilen veriler tartışılabilir özellikte bulundu. Buna göre, DOS örneklerinden bazılarında standart katma yöntemi sonucu kortizol gözlenmiş, bazılarında ise (DOS miktarının çok az ($<0.05\mu\text{L}$) olduğu örneklerde) kortizol pikinin gürlüğü pikleri arasında kaldığı anlaşılmış, fakat standart katma yöntemi sonucu gözlenebilir konuma getirilmiştir. Diğer bazı örneklerde ise kesin belirleme, alıkonma zamanlarındaki uyumsuzluk nedeniyle yapılamamıştır. Sonuç olarak, standart katma yöntemi ile de olsa farklı derinlikteki ceplerde kortizol varlığı gösterilmiştir. Ancak, zaman içinde alınan kromatogramlarda piklerin alıkonma zamanlarındaki farklılaşmalar doğru yorum yapmamıza engel olmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre dişeti oluğu sıvısında kortizol seviyesinin ölçümünde dişeti oluk sıvısından elde edilen sıvı hacminin değerlendirilebilme sınırlarının altında olması ($<0.05\mu\text{L}$) nedeniyle, diş eti oluğu sıvısında bulunan kortizol gibi düşük miktarlardaki örnekler için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminin uygun bir yöntem olmadığı söylenebilir.

Farklı periodontal hastalıklarda, dişeti oluk sıvısı ile yapılacak çalışmalarda daha duyarlı olan kütle bağlantılı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (LC-MS HPLC) kullanılması veya analizlerde yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılacak ise daha uzun ve seçici bir kolon ile analizlerin yapılması ile elde edilen piklerin daha net ve ayrılabilir olacağını düşünmekteyiz.

Kaynaklar

- [1] LeResche L, Dworkin SF. (2002) The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol* 2000 30: 91-103.
- [2] Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. (1996) Review. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 104: 327-334.
- [3] Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. (1999) Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 70: 711-723.
- [4] Monteiro da Silva AM, Newman HN, Oakley DA. (1995) Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 22: 516-526.
- [5] Johnson BD, Engel D. (1986) Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A review of diagnosis, etiology and treatment. *J Periodontol* 57:141-150.
- [6] Shanahan F, Anton P. (1988) Neuroendocrine modulation of the immune system. Possible implications for inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 33:41-49.
- [7] Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. 2007 Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol Behav.* 30;90(1):43-53
- [8] Hagan P, Poole S, Bristow AF. (1992) Immunosuppressive activity of corticotrophin-releasing factor. Inhibition of interleukin-1 and interleukin-6 production by human mononuclear cells. *Biochem J* 281: 251-254.
- [9] Dinarello CA. (1991) Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 3: 941-948.
- [10] Lyson K, McCann SM. (1991) The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 54: 262-268.
- [11] Aardal E, Holm AC. (1995) Cortisol in saliva: reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 927-932.
- [12] Apter D, Janne O, Vihko R. (1975) Lipidex chromatography in radioimmunoassay of serum and urinary cortisol. *Clin Chim Acta* 63: 139-148
- [13] Green LW, Tryon WW, Marks B, Huryn J. (1986) Periodontal disease as a function of life events stress. *J Hum Stress* 12: 32-36.
- [14] Axtelius B, Nilsson A, Söderfeldt B, Edwardsson S, Attström R. (1998) Therapy-resistant periodontitis. Psychosocial characteristics. *J Clin Periodontol* 25: 482-491.
- [15] Axtelius B, Söderfeldt B, Edwardsson S, Attström R. (1997) Therapy-resistant periodontitis (ii). Compliance and general and dental health experiences. *J Clin Periodontol* 24: 646-653.
- [16] Chrousos GP, Gold PW. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267: 1244-1252.
- [17] Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. (1992) Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev.*16:115-130.
- [18] Lovallo WR. (1997) In: Stress and health, Biological and psychological interactions. Pp. 55-74. California: Sage Publications.
- [19] Axtelius B, Edwardsson S, Theodorsson E, Svensater G, Attström R. (1998) Presence of cortisol in gingival crevicular fluid. A pilot study. *J Clin Periodontol* 25: 929-932.
- [20] Björkhem I, Blomstrand R, Lantto O, Löf A, Svensson L. (1974) Plasma cortisol determination by mass fragmentography. *Clin Chim Acta* 56: 241-248.
- [21] Aburuz S, Millership J, Heaney L, McElnay J. (2003) Simple

liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges. *J Chrom B* 798: 193-201.

- [22] Hay M, Mormède P. (1997) Improved determination of urinary cortisol and cortisone, or corticosteron and 11-dehydrocorticosterone by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chrom B* 702: 33-39.
- [23] Jönsson BAG, Malmberg B, Amilon A, Garde AH, Ørbæk P. (2003) Determination of cortisol in human saliva using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chrom B* 784: 63-68.
- [24] Rouits E, Boisdrón-Celle M, Morel A, Gamelin E. (2003) Simple and sensitive HPLC method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol in routine practice for CYP 3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake. *J Chrom B* 793: 357-366.
- [25] Pesce AJ, Kaplan LA. (1987) *Methods in Clinical Chemistry. Cortisol* The C.V. Mosby Company St Louis, Washington P: 224-231
- [26] Gotelli GR, Wall JH, Kabra PM, Marton LJ. (1981) Fluorometric Liquid-Chromatographic determination of serum cortisol. *Clin Chem* 27: 441-443.
- [27] Shihabi ZK, Andrews RI, Scaro J. (1982) Liquid chromatographic assay of urinary free cortisol. *Clin Chim Acta* 124:75-83.