

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN
PERİODONTAL HASTALIKLARLA İLİŞKİLİ İNFLAMASYONA KARŞI
İMMÜNOMODÜLATÖR ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Hikmet CAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYOTA KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN PERİODONTAL HASTALIKLARLA İLİŞKİLİ İNFLAMASYONA KARŞI İMMÜNOMODÜLATÖR ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Hikmet CAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fadime KIRAN

Sadece diş dokusuna değil vücudun farklı sistemlerine de zarar verebilen periodontal hastalıklar, büyük kitleler üzerindeki önemli etkileri ve sosyo-ekonomik zararları dikkate alındığında “sessiz” ancak küresel bir salgın olarak önem arz etmektedir. Periodontal hastalıkların etiyopatolojisi çok faktörlü olup dental biyofilmlerdeki mikroorganizmalar ile konakçının immüno-inflamatuvar yanıtı arasındaki bir dizi karmaşık bağlantı ile özetlenebilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, anne sütü ile beslenen bebek fekal mikrobiyotasından izole edilen *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait çeşitli postbiyotik mediatörlerin (PM: hücre bağımsız süpernatant, hücre yüzeyine bağlı ekzopolisakkarit, serbest ekzopolisakkarit, hücre lizatu, hücre yüzey proteini, inaktive hücre) *Porphyromonas gingivalis* enfeksiyonunun insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücrelerinde oluşturduğu inflamasyona karşı immunodülatör rollerini belirlemektir. Bu amaçla, farklı yöntemler kullanılarak hedef PM’ler izole edilmiş ve iPDLF hücreleri üzerinde sitotoksik etki sergilemeyen dozları MTT analizi ile belirlenmiştir. Her bir PM için seçilen dozların iPDLF hücrelerinde *P. gingivalis*’e ait LPS ile uyarılan inflamasyon üzerindeki etkisi ELIZA yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen veriler IL-8 açısından değerlendirildiğinde, *P. gingivalis*’e ait LPS’nin IL-8 üretimini indüklediği, PM’lerin ise bu etkiyi azalttığı tespit edilmiştir. Anti-inflamatuvar özellik sergileyen IL-10 üretiminin ise PM’ler tarafından doza bağlı olarak indüklendiği belirlenmiştir. Ancak, IFN-gama üretiminde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuç olarak, PM’lerin periodontal hastalıklara karşı kullanımları oldukça yeni bir alan olmasına rağmen, *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen ve biyolojik olarak aktif ve işlevsel molekülleri içeren PM’lerin periodontal doku inflamasyonunu kontrol etmek amacıyla potansiyel adaylar olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

Nisan 2023, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Periodontal hastalıklar, *Porphyromonas gingivalis*, inflamasyon, *Lactiplantibacillus plantarum*, postbiyotik

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF THE IMMUNOMODULATORY ROLE OF MICROBIOTA DERIVED POSTBIOTICS AGAINST INFLAMMATION ASSOCIATED WITH PERIODONTAL DISEASES

Hikmet CAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fadime KIRAN

Periodontal diseases that can damage not only the dental tissue but also different systems of the body, are considered as a “silent” but important global outbreak considering their significant impacts on the huge audiences and socio-economic damage. The etiopathology of periodontal diseases is multifactorial and can be summarized by a complex series of links between microorganisms in dental biofilms and the host's immuno-inflammatory response. The aim of this thesis is to determine the immunomodulatory roles of various postbiotic mediators (PM: cell free supernatant, cell surface bound exopolysaccharide, release exopolysaccharide, cell lysate, cell surface protein, inactivated cell) of *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 strain isolated from breastfed infant fecal microbiota, against inflammation in human periodontal ligament fibroblast (iPDLF) cells caused by *Porphyromonas gingivalis* infection. For this purpose, target PMs were isolated using different methods and their doses that did not show cytotoxic effects on iPDLF cells were determined by MTT analysis. The effect of selected doses for each PM on *P. gingivalis* derived LPS-induced inflammation in iPDLF cells was determined by ELISA. When the data were evaluated in terms of IL-8 production, it was determined that LPS of *P. gingivalis* induced IL-8 production, while PMs reduced this effect. It has been also determined that the production of IL-10 with anti-inflammatory properties, was dose-dependently induced by PMs. However, no significant change was detected in IFN-gamma production. In conclusion, although the use of PMs against periodontal diseases is a relatively new field, it has been shown that PMs produced by *L. plantarum* EIR/IF-1 strain, containing biologically active and functional molecules can be used as potential candidates to control periodontal tissue inflammation.

April 2023, 70 pages

Key Words: Periodontal diseases, *Porphyromonas gingivalis*, inflammation, *Lactiplantibacillus plantarum*, postbiotics

TEŞEKKÜR

Hayatımda her zaman örnek aldığım ve örnek almaya devam edeceğim, kendisinden her anlamda çok şey öğrendiğim, her zaman hayatıma olumlu dokunuşları olan, iyi niyetini, güler yüzünü ve her anlamda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Fadime KIRAN'a

Çalışmalarımın her anında desteğini esirgemeyen, değerli vakitlerini her zaman ayıran, güler yüz ve iyi niyetini esirgemeyen Hazal KİBAR DEMİRHAN, Emine OMER OGLOU, Ozan HALİŐÇELİK, Sultan GÖLPEK, Buket ÇELİK, İlknur AĞUN, Seval TALİBOĞLU'na (Ankara Üniversitesi, Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Grubu)

Benimle gurur duyacaklarından emin olduğum, bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, beni büyütüp yetiştiren, her anlamda kendime örnek aldığım, her zaman özlemimi hissettiğim canım annem Fatma CAN ve canım babam Yaşar CAN'a, yaşanan tüm zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, yaşanan mutlu anlarda birlikte güldüğümüz, desteklerini esirgemeyen canım abim Ahmet CAN ve canım ablam Ayşe AKSOY'a, ailemize yeni katılan ve neşe getiren yiğenim Rümeyya Narin AKSOY'a

Nihayetinde hayallerinin peşinden gidip çaba gösteren kendime teşekkür ederim...

Bu tez çalışması; "Periodontal hastalıklar için post-biyotik mediatörleri içeren kollajen/keratin temelli membranların geliştirilmesi ve *in vitro/in vivo* koşullarda etkinliklerinin değerlendirilmesi" başlıklı ve 119S865 nolu TÜBİTAK (1001) projesi tarafından desteklenmiştir.

Hikmet CAN
Ankara, Nisan 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	3
2.1 Periodontal Hastalıklara Giriş.....	3
2.2 Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi	4
2.3 Periodontal Hastalıkların Etiyolojisi.....	6
2.4 Periodontal Hastalıkların Evreleri	9
2.4.1 Gingivitis	10
2.4.2 Periodontitis.....	12
2.5 Periodontal Hastalıklarda İnflamasyon.....	13
2.6 Periodontal Hastalıklarda <i>Porphyromonas gingivalis</i> Bakterisinin Rolü	17
2.7 Oral Mikrobiyotanın İmmünomodülatör Rolü.....	19
2.8 Postbiyotik Mediatörlerin İmmünomodülatör Rolü	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1 Materyal.....	26
3.1.1 Bakteri kültürü, gelişim ve saklama koşulları.....	26
3.1.2 iPDLF hücreleri ve gelişim koşulları.....	27
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Postbiyotik mediatörlerin elde edilmesi	27
3.2.1.1 Hücre bağımsız süpernatant (HBS) eldesi	27
3.2.1.2 İnaktive hücrelerin eldesi	28
3.2.1.3 Hücre lizatının eldesi.....	29
3.2.1.4 Ekzopolisakkarit (EPS) eldesi.....	31
3.2.1.5 Hücre yüzey proteinlerinin eldesi.....	35
3.2.2 Postbiyotik mediatörlerin immünomodülatör etkilerinin belirlenmesi	37
3.2.2.1 PM'lerin iPDLF hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi	37
3.2.2.2 PM'lerin iPDLF hücre bağımlılık cevabı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1 Postbiyotik Mediatörlerin Miktarları	42
4.2 Postbiyotik Mediatörlerin Sitotoksik Olmayan Dozlarının Seçimi	45
4.2.1 iPDLF hücrelerinin kültürü	45
4.2.2 PM'lerin iPDLF hücre canlılığı üzerine etkileri	45

4.3 Postbiyotik Mediatörlerin iPDLF Hücreleri Üzerindeki İmmunomodulator	
Rolu	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	53
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	70



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat (Celcius) derece
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
pg	Pikogram
W	Watt
α	Alfa
β	Beta
γ	Lambda

Kısaltmalar

AMP	Antimikrobiyal peptitler
BSA	Bovin serum albumin
CPI	Topluluk periodontal indeksi
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler modeller
dH ₂ O	Distile su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS-b	Bağlı ekzopolisakkarit
EPS-r	Serbest ekzopolisakkarit
FBS	Fetal bovin serum
FimA	Fimbria A
HbA1c	Glikosile edilmiş hemoglobin
HBS	Hücre bağımsız süpernatant

HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ISAPP	Uluslararası probiyotik ve prebiyotik birliği
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
iPDLF	İnsan periodontal ligament fibroblast
LiCl	Lityum klorür
LPS	Lipopolisakkarit
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	Sodyum klorür
NF-kB	Nükleer faktör kB
NLRP	NOD benzeri reseptör
OPG	Osteoprotegerin
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler modeller
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PRR	Örüntü tanıma reseptörleri
RANK	Nükleer faktör –kappa B
SF	Serum fizyolojik
TCA	Trikloroasetik asit
Th1	T yardımcı hücresi 1
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Diş genel anatomik görüntüsü	3
Şekil 2.2 Gingivitis ve periodontitis aşamaları	10
Şekil 2.3 Periodontal hastalıkların ana aşamaları	13
Şekil 2.4 Postbiyotik mediatörlerin ana gruplarının gösterimi	22
Şekil 2.5 PM'lerin immunomodülatör rolünün şematik gösterimi	23
Şekil 3.1 HBS eldesinin şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.2 İnaktive hücre eldesinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.3 Hücre lizati eldesinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.4 EPS-r eldesinin şematik gösterimi	33
Şekil 3.5 EPS-b eldesinin şematik gösterimi	34
Şekil 3.6 Hücre yüzey protein eldesinin şematik gösterimi.....	36
Şekil 3.7 İnvirt faz konstarast mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 3.8 Hücre sayım yönteminin temel basamakları.....	38
Şekil 3.9 MTT yönteminin şematik özeti.....	39
Şekil 3.10 ELIZA yönteminin temel aşamalarının şematik özeti	41
Şekil 4.1 Liyofilize olarak elde edilen PM'lerin genel görüntüleri ve miktarları	43
Şekil 4.2 Glukoz standart eğrisi	44
Şekil 4.3 Farklı glukoz konsantrasyonlarında meydana gelen renk değişimi.....	44
Şekil 4.4 BCA standart eğrisi.....	45
Şekil 4.5 iPDLF hücrelerinin mikroskop görüntüleri	46
Şekil 4.6 HBS'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	47
Şekil 4.7 İnaktive hücrelerin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	47
Şekil 4.8 EPS-b'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi.....	48
Şekil 4.9 EPS-r'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	48
Şekil 4.10 Hücre lizatının iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	49
Şekil 4.11 Hücre yüzey proteinlerinin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	49
Şekil 4.12 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 'e ait LPS'nin farklı konsantrasyonlarının iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi	50
Şekil 4.13 Rekombinant sitokinlerin bilinen miktarlarını içeren standartlara ait kalibrasyon eğrileri	51
Şekil 4.14 PM'lerin <i>P. gingivalis</i> LPS'si ile indüklenmiş iPDLF hücrelerinin IL-8 üretimine etkisi.....	52
Şekil 4.15 PM'lerin <i>P. gingivalis</i> LPS'si ile indüklenmiş iPDLF hücrelerinin IL-10 üretimine etkisi.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışma kapsamında kullanılan besiyeri içerikleri	26
Çizelge 3.2 Glukoz standartı için kullanılan konsantrasyonlar.....	35



1. GİRİŞ

Sadece diş dokusuna değil vücudun farklı sistemlerine de zarar verebilen periodontal hastalıklar, büyük kitleler üzerindeki önemli etkileri ve sosyo-ekonomik zararları dikkate alındığında “sessiz” ancak küresel bir salgın olarak önem arz etmektedir (Gotsman vd. 2007). Mikrobiyal dental plağa verilen konak immun yanıtının genetik ve çevresel koşulların etkisi ile şekillenmesi sonucu gelişen periodontal hastalıklar, diş yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası uzaklaştırılmadığı takdirde alveolar kemik, periodontal ligament ve kök sementumu da dahil olmak üzere periodonsiyumun yok olmasına neden olabilmekte ve etkin bir şekilde tedavi edilemedikleri sürece progresif periodontal kemik kaybına ve sonrasında erken diş kayıplarına yol açabilmektedir. Gingivitis ve periodontitis insanlarda en sık görülen periodontal hastalıklar olarak kabul edilmektedir. Diş eti altında mikrobiyal dental plak (biyofilm) içerisinde bakterilerin birikmesi çevre dokularda inflamasyona neden olmakta, bu durum ise gingivitis (diş eti iltihabı) olarak tanımlanmaktadır. Eğer meydana gelen mikrobiyal dental plak ortamdaki uzaklaştırılmaz ise diş etinde gelişen enfeksiyon periodonsiyumun diğer dokularını etkileyerek alveolar (çene kemiği) kemiğe ilerleyebilmekte ve sonrasında agresif bir patoloji olarak nitelendirilen periodontitisin oluşmasına neden olabilmektedir. Başarılı bir şekilde tedavi gerçekleştirilemediğinde ise erken diş kayıpları kaçınılmaz son olmaktadır (Shende vd. 2018). Periodontal dokuda agresif patolojinin oluşmasının en önemli nedeni patojen özellik sergileyen mikroorganizmaların kolonizasyonundaki artışa bağlı olarak bağışıklık sistemi hücreleri tarafından oluşturulan inflamasyondur. Patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunda meydana gelen artış, periodontal dokuda bulunan homeostatik dengenin bozulmasına ve neticede konak bağışıklık sistemi tarafından inflamasyonun tetiklenmesine neden olmaktadır (Kinane vd. 2007). Dolayısıyla, biyofilm oluşumunu takiben periodontal dokuda hasarın gelişmesi ile sonuçlanan periodontal hastalıklarda temel hasarın konak organizmanın bağışıklık hücrelerinin sergilediği aşırı aktivasyon sonucunda oluşan inflamasyondan kaynaklandığı dikkate alındığında hedef tedavi stratejilerin sadece biyofilm giderimini değil inflamasyonu azaltma özelliklerine de sahip olması beklenmektedir.

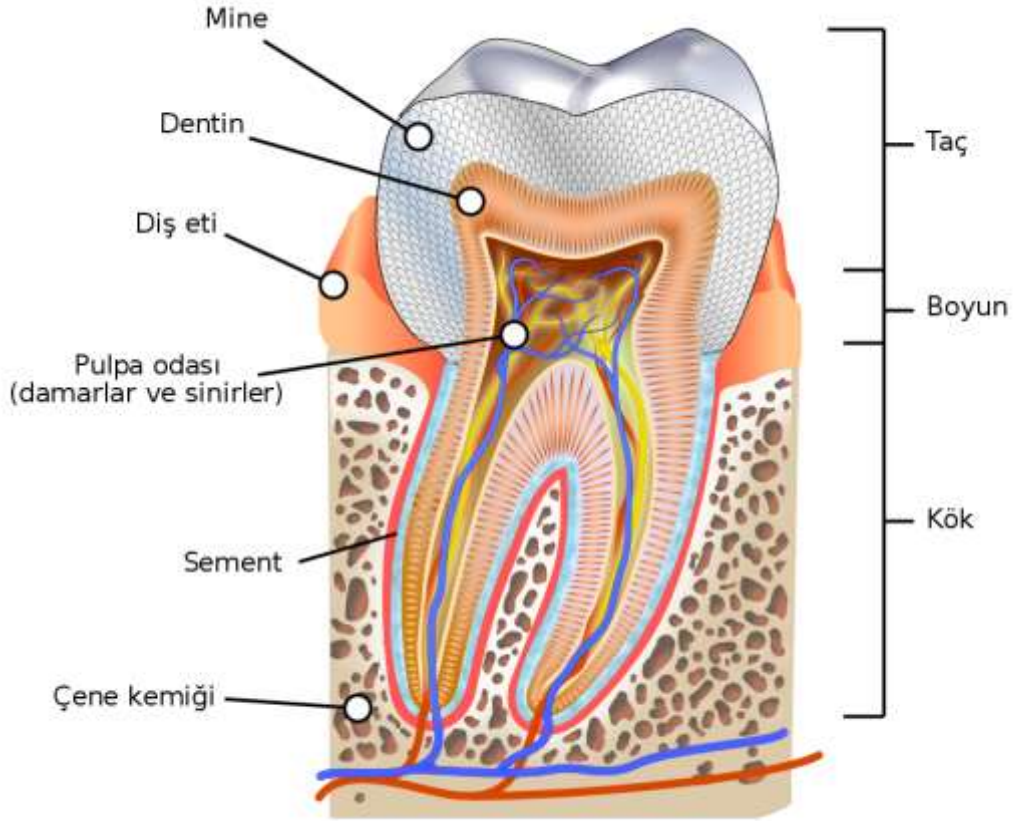
Periodontal hastalıklar kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, alzheimer gibi birçok sistemik hastalıkla bağlantılı olması açısından da oldukça önem arz etmektedir (Linden vd. 2013). Bu bağlantının başlıca nedeni, oral patojen mikroorganizmaların kan-damar bariyerini aşarak kan dolaşımına katılması ve konağın diğer dokularına taşınarak kolonize olmasıdır. İnflamasyonun periodontal hastalıklar ile sistemik hastalıklar arasında da oldukça önemli bir rolü bulunmaktadır (Hajishengallis ve Chavakis 2021). Gerek periodontal inflamasyon sonucunda meydana gelen diş kayıpları gerekse sistemik hastalıklar ile olan bağlantısı, periodontal hastalıklar için geliştirilecek yeni ve etkin tedavi stratejilerini oldukça önemli kılmaktadır.

Faydalı mikroorganizmalar tarafından fermentasyon neticesinde üretilen çeşitli metabolitler için şemsiye bir terim olarak kullanılan postbiyotik mediatörler; antibakteriyel, antiinflamatuvar, antioksidan aktivitelerinin yanısıra konak bağışıklığını modüle edebilmeleri sayesinde oldukça önemli kabul edilmektedir (Balta vd. 2021). Bu tez çalışmasının amacı; insan mikrobiyotasından izole edilebilen ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenen *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 bakterisinden elde edilen postbiyotik mediatörlerin periodontal hastalıklarla ilişkili inflamasyon üzerindeki immünomodülatör etkilerini *in vitro* koşullarda belirlemektir.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1 Periodontal Hastalıklara Giriş

Periodontoloji; diş eti, alveolar kemik, periodontal ligament ve kök sementumu gibi dişleri destekleyen dokuların (Şekil 2.1) toplamı olan periodonsiyum ile ilgilenen bilim dalıdır. Periodonsiyumda doku bütünlüğünün bozulması neticesinde oluşan olgular ise periodontal hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Periodontal patolojiye ilişkin kanıtlar çok eski zamanlardan günümüze kadar insanlığın bu hastalıktan müzdarip olduğuna dair bir kanıt oluşturmaktadır (Czarnetzki vd. 2003).



Şekil 2.1 Diş genel anatomik görüntüsü

Periodontal hastalıklar periodonsiyum bölgesinde gerçekleşen inflamasyon sonucu meydana gelmektedir. Periodontal hastalıklara neden olan inflamasyonun başlıca etkeni periodontal bölgede kolonizasyon artışı gösteren patojen özellikteki mikrobiyal

topluluklardır (Dentino vd. 2013). Bu mikrobiyal topluluklar konakçının yaşam tarzına ve genetiğine bağlı olarak hem kendi içinde hem de total çeşitliliğinde farklılık göstermektedir. Gerçekleştirilen araştırmalar, periodontal inflamasyona neden olan yaygın mikroorganizmaların bakteriler olduğunu göstermektedir (Tonetti vd. 2018). Bu durumun en temel nedeni ise ağız boşluğunda yer alan bakterilerin çeşitli çevresel uyaranlardan korunmak adına biyofilm yapıları içerisinde organize olma yetenekleridir (AI vd. 2015). Konak ağız boşluğunda tür çeşitliliğine bağlı olarak hem yararlı hem de fırsatçı mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar homeostasis adı verilen bir denge halinde yaşamaktadır. Ancak hijyen başta olmak üzere çeşitli faktörler neticesinde oral mikrobiyotadaki bu mikrobiyal denge bozulmakta ve disbiyosise neden olmaktadır. Disbiyosis neticesinde gelişim şansı bulan fırsatçı patojenler ise önce dental plak (biyofilm) oluşumuna, uzaklaştırılmadığı takdirde ise periodontal hastalıklara sebebiyet vermektedir (Hornef vd. 2002).

Periodontal hastalıklar, gingivitis ve periodontitis olmak üzere iki aşamalı gerçekleşmektedir. Diş eti yumuşak dokusundaki inflamasyonu ifade eden gingivitis diş eti ile diş minesinin arasının açılmasına neden olmaktadır. Gingivitis kişisel hijyenin güçlü olması ve kişisel bakımın yeterli olması durumunda geri dönüştürülebilir bir olgu olmaktadır. Periodontitis ise gingivitisin tedavi edilmediği ya da kişisel bakımın yeterli olmadığı durumlarda inflamasyonun diş eti açıklığından ilerleyerek periodonsiyuma ilerlemesiyle meydana gelmektedir. Bu aşamada halen etkili bir tedavi gerçekleştirilmemişse inflamasyon alveolar kemiğe kadar ilerlemekte ve kemik doku kaybına bağlı olarak diş kayıpları gerçekleşmektedir (Hughes 2015). Dolayısıyla, periodontitisin şiddetini belirleyen başlıca faktörler kişisel bakım başta olmak üzere genetik ve çevresel birçok etkeni içerebilmektedir. Bu nedenle, periodontitisin çok faktörlü bir süreç olduğu kabul edilmektedir (Vargas vd. 2015).

2.2 Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi

Periodontal hastalıklar özelinde epidemiyoloji; hastalığın belirli bölgelerde, belirli bir toplumda, belirli bir ülkede vb. unsurlardaki görülme sıklığının çalışılması (tanımlayıcı epidemiyoloji) ve görülme sıklığının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin

araştırılması, incelenmesi ve geliştirilmesi (analitik epidemiyoloji) için çalışılan bir bilimsel alandır. Ancak, tarihsel açıdan incelendiğinde periodontal epidemiyolojinin tanımlanması ile ilgili birçok farklı yöntem olduğu görülmektedir. Bu yöntemler arasında en sık kullanılan yöntemin ise geliştirilmiş topluluk periodontal indeksi (CPI) olduğu belirtilmektedir. Bu yöntem kapsamında sondalamada kanama, cep derinlikleri ve ataşman kaybı şiddeti gibi faktörler birbirinden bağımsız değerler olarak incelenmektedir (Baelum ve Lopez 2004).

Ağız ve diş hastalıkları, kronik hastalıklar arasında en sık rastlanılan durum olmakla birlikte; yaygınlığı, birey ve toplum üzerindeki etkileri ve tedavilerinin maliyeti dikkate alındığında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak önem arz etmektedir. Diş çürüğü, periodontal (diş eti) hastalıklar, diş kaybı, dudak ve ağız boşluğu kanserleri ağız hastalıkları arasında sıklıkla rapor edilen olgular arasında yer almaktadır. Periodontal hastalıklar, tüm dünya genelinde en yaygın görülen hastalıklardan biri olarak önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (Tonetti vd. 2018, World Dental Federation 2018). Peridontitisin tüm dünyada kalp hastalıklarından sonra en yaygın görülen 2. kronik hastalık olduğu belirtilmektedir. 291 hastalık arasından en çok karşılaşılan 6. hastalık olarak kayıtlara geçmiştir (Global Burden of Disease Study). Dünya çapında % 11 prevalansa sahip olup yaklaşık 743 milyon insanı etkilediği düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Kasım 2022 tarihinde periodontal hastalıklar ile ilgili paylaştığı veriler dünya çapında 1 milyardan fazla kişinin periodontal hastalıklardan müzdarip olduğunu ifade etmektedir (WHO 2022). Genel olarak, insan popülasyonunun % 15'inin hayatlarının bir döneminde periodontitis olgusuyla karşılaştığı, 30 yaş ve üstündeki erişkinlerin ise % 47'sinden fazlasına en az bir tür periodontal hastalık teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir. Yaşla birlikte artış gösteren periodontal hastalıklar, 65 yaş ve üstü yetişkinlerin % 70'inden fazlasında görülmektedir (Wu vd. 2020). CPI değerine göre yayınlanan veriler dikkate alındığında 35 ile 44 yaş aralığındaki bireylerde, agresif periodontitis görülen çoğu popülasyonların % 5 ile % 15'inde diş kaybı görüldüğü belirtilmektedir. Avrupa Periodontoloji Federasyonu'na göre; Avrupa'daki nüfusun yaklaşık % 30'u periodontal hastalıklardan muzdariptir.

Dünya Sağlık Örgütü ağız hastalıklarının birçok ülkede tedavi edilmesi en pahalı olan dördüncü hastalık olduğunu bildirmektedir (Petersen 2003). 2015 yılında dünya çapında diş hastalıklarının tedavi maliyetinin 357 milyar ABD Doları olduğu, aynı yıl Avrupa Birliği genelinde ağız hastalıklarının tedavisine 90 milyar Euro harcandığı belirtilmektedir. Bu maliyet bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında diyabet ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra üçüncü en yüksek harcama olarak dikkat çekmektedir (Peres vd. 2019). Ağız sağlığı, genellikle birinci basamak sağlık hizmetleri kapsamında bulunmadığından, bireyler ve toplum için önemli masraflara yol açmaktadır. Bu durum, özellikle dezavantajlı nüfusları olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu sayısal veriler ışığında; periodontal hastalıkların büyük bir popülasyonu etkilediği tartışmasız bir gerçektir. Ancak bu hastalıkların sadece diş dokusunu değil, tedavi edilmediği takdirde vücudun farklı sistemlerini de etkileyen önemli bir olgu olduğu ve kardiyovasküler hastalıklar, tip-2 diyabet, romatoid artrit, kronik böbrek hastalığı, obezite gibi bir dizi sistemik hastalık ile ikili ilişkileri olduğu unutulmamalıdır (Nasajpour vd, 2018). Örneğin; diyabetli kişilerin, diyabet olmayanlardan daha fazla periodontitis riski taşıdıkları belirlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya genelinde 2014 yılında 422 milyon yetişkin diyabetli yaşamaktadır. Bu sayının 2025 yılına kadar iki katına çıkması beklenmektedir. Avrupa'da ise 2017 yılında 58 milyon insan diyabet hastası olup bu sayının, 2035 yılında 70 milyona ulaşması beklenmektedir. Ayrıca, küresel geriatric popülasyondaki artışın da periodontal hastalıkları olan hasta sayısını arttıracığı öngörülmektedir (Tonetti vd. 2017). Birçok nedenle meydana gelen hastalık yükündeki bu artış ise küresel periodontal ürün pazarının hareketlenmesinde kilit rol oynamaktadır.

2.3 Periodontal Hastalıkların Etiyolojisi

Periodontal hastalıkların nedeni olarak gösterilen disbiyosis (ağız boşluğunda bulunan mikrobiyal topluluklar arasındaki dengenin bozulması) birçok faktöre bağlı olabilmektedir (Vargas vd. 2015). Bu faktörler genel olarak kontrol edilebilen faktörler ve kontrol edilemeyen faktörler olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Kontrol edilebilen faktörler konak organizmaya bağlı oluşan ve dış etkenler neticesinde mikroorganizma – konak dengesinin bozulmasının neden olan faktörleri (oral mikrobiyota,

sigara ve alkol kullanımı, HIV ve AIDS gibi hastalıklar, beslenme, stres gibi) kapsarken, kontrol edilemeyen faktörler konak organizmadaki genetik faktörlere bağlı oluşan bağışıklık sistemi ilişkili faktörleri ifade etmektedir (Aljehani 2014). Tüm bu faktörlerin sonucunda ise patojen özellik sergileyen fırsatçı oral bakteriler periodontal bölgede baskınlık sağlayarak kolonize olmaktadır. Simbiyotik dengenin değişmesi sonucunda oral patojenlerin kolonizasyonunda meydana gelen bu artış ise biyofilm oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bu durum neticesinde gerekli önlemler alınmadığı takdirde periodontal inflamasyon gerçekleşmekte ve periodontal hastalıklar gözlemlenmektedir (Ruby ve Barbeau 2002).

Periodontal hastalıklarla ilişkilendirilen temel bakteri toplulukları genellikle subgingival bölgelerde yaşamaktadır. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* ve *Treponema denticola* en çok bilinen patojen bakteriler olarak bilinmektedir. Patojen mikroorganizmalar ile periodontal dokuların enfeksiyonuna bakteriyel lökotoxinler, kollajenazlar, fibrinolizinler ve diğer proteazların salınımı eşlik etmektedir (Socransky ve Haffajee 1994). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, özellikle genç erişkinlerde yaygın olarak hastalıklarla ilişkilendirilen başka bir türdür (Doğan vd. 2008). Gerçekleştirilen çalışmalar, periodontal hastalıkların patogenezinde rol alan çeşitli mikroorganizma popülasyonlarının farklı bireylerde farklı şekillerde katkıda bulunabildiklerini göstermektedir (Bruce 2005). Patojen aktivite gösteren bakterilerin yanısıra ağız boşluğunda kolonizasyon gösterebilen bazı virüslerin de konak organizmanın bağışıklığında değişikliklere sebebiyet verebildiği bilinmektedir. Bu değişiklikler ise patojenik aktivite gösteren bakterilerin kolonizasyonunun ve buna bağlı inflamasyonun artmasına olanak verebilmektedir (Ezhilarasan vd. 2022). Dolayısıyla, patojen bakterilerin yanısıra patojenik aktivite sergileyen diğer mikroorganizmaların da (örneğin virüsler) periodontal inflamasyona katkıda bulunduğu ve dolaylı yoldan periodontal hastalıkların nedeni olabildiği bilinmektedir (Vargas vd. 2015).

Konak organizmanın patojen mikroorganizma varlığında geliştirdiği inflamasyonun konak bağışıklık sistemi ile ilişkili olduğu dikkate alındığında, inflamasyonla ilişkili faktörleri etkileyebilecek genetik bir mutasyon periodontitis ile ilişkili faktörleri arttırabilmektedir. İlaveten, sitokin gen polimorfizmleri, metabolizma ile ilgili gen

polimorfizmleri, antijen tanıma ile ilgili gen polimorfizmleri ve hücre yüzey reseptörlerinde gerçekleşebilecek gen polimorfizmleri de periodontitisi etkileyebilmektedir (Kozak vd. 2020). Bununla birlikte, konak organizma DNA'sının epigenetik modifikasyonları da inflamasyonda gerçekleşen bağışıklık konak yanıtlarının genetiksel anlamda işleyişini etkileyebilmekte ve periodontitise neden olabilmektedir (Loos ve Dyke 2020). Genetik faktörlere örnek olarak haim-munk ve papillon-lefevre hastalıkları verilebilmektedir. Bu hastalıklar, çocukluk döneminde hem süt dişleri hem de kalıcı dişlerin erken kaybı ile ilişkili periodontitisin başlangıcı ile ilişkili olan ancak çok fazla rastlanılmayan otozomal resesif hastalıklar olarak bilinmektedir. Çocukluk döneminde görülen bu hastalığa katepsin C geninin kromozomal bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar neden olmaktadır (Hart vd. 2005).

Sigara kullanımı periodontal hastalıkların etiolojisinde önemli bir yere sahiptir. Sigara kullanan bireylerde sigara kullanmayan bireylere göre periodontitis gelişme olasılığının daha yüksek olduğu gerçekleştirilen bilimsel çalışmalar neticesinde vurgulanmaktadır (Bergström 2004). Uzun süre sigara içen bireylerde periodontal hastalık gelişme riskinin akciğer kanseri görülme olasılığı ile eşit olduğu belirtilmektedir (Warnakulasuriya vd. 2005). Sigara kullanımı neticesinde oral bölgede gerçekleşen oksidatif stres ise bu durumun başlıca nedeni olarak gösterilmektedir. Ağızdan alınan dumansız tütün ürünleri ise (nikotin sakızı gibi) diş etinde iltihap oluşumuna, diş destekleyen yapının kaybına ve diş etinde müdahil olduğu yerde kanser öncesi diş eti lökoplakisinin görülmesine neden olabilmektedir (Christen vd. 1979). Ayrıca, sigara kullanımı konak hücre bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilemekte ve periodontal tedavi ile diğer oral cerrahi müdahalelerin etkinliğini azaltmaktadır (Zhang vd. 2019).

Beslenme, periodontal hastalıklar ile ilişkilendirilen bir diğer önemli faktördür. Asitli ve şekerli gıdaların tüketimi mikrobiyal biyofilm oluşumuna katkı sağlamakta ve periodontal inflamasyonun ilerlemesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, bireylerin bağışıklık sisteminde etkili besinleri tüketmeleri konak bağışıklığının korunması adına önem teşkil etmektedir. Özellikle C vitamini içeren gıdaların tüketimine dikkat edilmemesi kollajen oluşumunun azalmasına, periodontal inflamasyonun artmasına,

periodontal bölgede kanama ve ilerleyen inflamasyon ile doku ve neticesinde diş kayıplarına neden olabilmektedir (Enwonwu vd. 2000).

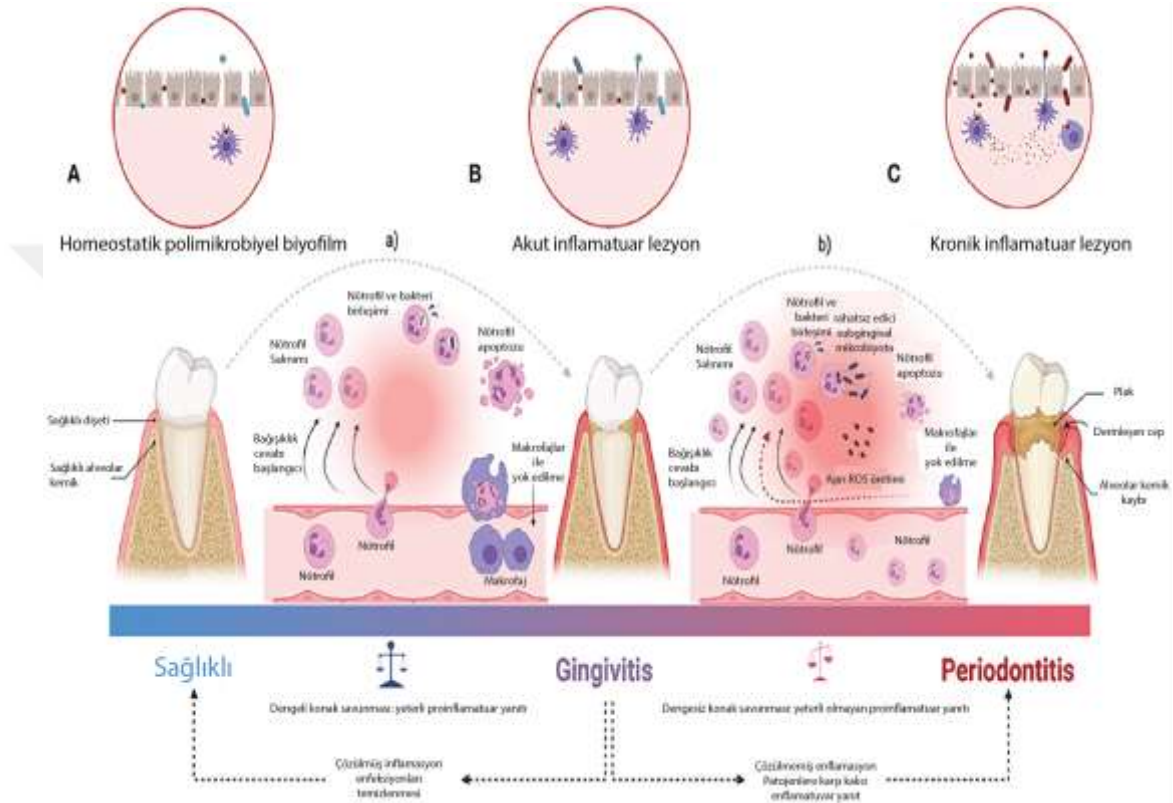
Çeşitli metabolik ve kronik hastalıklar da periodontal hastalıkların etiolojisinde önemli bir yere sahiptir. Gerçekleştirilen araştırmalar, tip 1 ve tip 2 diyabet hastalığı olan bireylerin hastalık gözlemlenmeyen bireylere kıyasla daha yaygın ve şiddetli periodontal hastalık geliştirdiğini göstermektedir (Taylor 2001). Bu durum aslında, diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan yöntemler ve tedavinin nasıl kontrol edildiği ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin diyabet hastalığı tedavisi iyi yönetilen bireyler de diyabet tedavisi kötü yönetilen hastalara göre periodontitis görülme olasılığı daha düşüktür (Soskolne ve Klinger 2001). Diyabet hastalarında, yara iyileşmesine dayanarak antijenlere karşı abartılı monosit tepkisi ve konak tarafından kontrol edilemeyen nötrofil kemotaktik tepkileri şiddetli periodontitis görülmesi açısından beklenen bir durumdur. Dolayısıyla, diyabet hastaları periodontal inflamasyon açısından her zaman risk taşımaktadır (Tervonen ve Oliver 1993).

Bireyin yaşamı sürecinde karşılaştığı travmatik durumlar veya psikososyal durumlar ile gelişen stres, hijyen eksikliklerinin görülmesine ve periodontal hastalığın gelişme olasılığında artışa neden olmaktadır. Ancak hastalığın patogenezindeki rolü henüz kesin olarak bilinmemektedir (LeResche ve Dworkin 2002).

2.4 Periodontal Hastalıkların Evreleri

Kronik diş eti iltihabı gingivitis ve kronik periodontitis, diş plağını (biyofilm) oluşturan mikroorganizmalar tarafından başlatılmakta ve sürdürülmektedir. Biyofilm yapıları; mikroorganizmaların yüzeylere tutunması ve kolonizasyonu için mikroorganizmalar tarafından hücre dışına üretilen yapılar olarak tanımlanabilmektedir. Biyofilmler; yüzeye tutunma sonucunda mikroorganizmaların madde alışverişi fiziksel kuvvetten korunma, antibakteriyel ajanlardan korunma, kendi özelinde bir habitat oluşturma, konak bağışıklık hücrelerine karşı korunma gibi mikroorganizma adına birçok avantaj sağlayan yapılar olarak bilinmektedir. Bu nedenle biyofilm oluşumu oldukça karmaşık, dinamik ve çok aşamalı bir süreçtir (Xu vd. 2020). Bu mikroorganizmaların oluşturduğu dental plak ya

da biyofilm giderilmediği takdirde mikrobiyal kontaminasyon diş etinden peridonsiyum tabakasına ilerlemekte ve inflamasyona bağlı bağışıklık hücre elemanları savunmaya geçmektedir. Bu savunmanın sonucu olarak metalloproteinaz gibi enzimler sentezlenmekte ve kemik kaybı ile sonuçlanan bir senaryo ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Gingivitis ve periodontitis aşamaları (Martinez-Garcia ve Hernandez 2021)

2.4.1 Gingivitis (Diş eti iltihabı)

Diş eti pembe renkli yumuşak bir doku olup dişleri kemik soketlerinde periodontal ligamentlerden sıkıca periosteuma yapıştırarak tutmaktadır. Gingiva terimi diş eti, gingivitis ise diş etlerinin inflamasyonu olarak tanımlanmaktadır. Gingivitis, dişleri çevreleyen ve destekleyen diş eti dokusunun bir enfeksiyonudur. Konakçının hassas olması, patojenik türlerin varlığı veya faydalı bakterilerin azlığı gibi faktörler hastalığın etiolojisinde oldukça önemlidir. Sağlıklı diş eti sulkusu, Gram pozitif kokların, özellikle *Streptococcus* spp. ve *Actinomyces* sp. türlerinin eşit oranda baskın olduğu bir

mikrobiyotaya sahiptir (Kesic vd. 2008). Hastalık sürecinde plak olgunlaştıktan sonra diş eti sulkusundaki mikrobiyal türler Gram pozitif mikroorganizmalardan ağırlıklı olarak Gram negatif, anaerobik, kemoorganotrofik ve proteolitik organizmalara dönüşmektedir. Bununla birlikte periodontal hastalıklarla ilişkili fırsatçı patojenler sağlıklı bireylerde de sıklıkla bulunmakta ve bu nedenle bireyin ağız içerisinde değişen ortama karşı vereceği tepki hastalık sürecindeki en kritik nokta olmaktadır (Jasberg 2017).

Periodontal hastalıklar diş yüzeyi ve diş eti üzerinde oluşan mikrobiyal bir biyofilm olan diş plağındaki bakterilerin meydana getirdiği lokalize iltihaplı gingivitis ile başlamaktadır. Periodontal dokuda gingivitis gerçekleşmesi için ilk aşama olarak periodontal bölgede patojen özellik sergileyen mikroorganizmaların biyofilmler aracılığı ile kolonizasyon gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu kolonizasyon genel anlamda üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak canlı veya cansız yüzeylere tutunabilecek hücre dışı yapılar üretilmektedir. İkinci aşamada diğer mikroorganizmaların aynı bölgede bir araya gelmesiyle bir mikrokoloni oluşumu gerçekleşmektedir. Bu mikrokoloniye hücrelerin eklenmesiyle büyüyen mikrokolonilerde olgunlaşma aşaması gerçekleşmektedir. Büyüme gerçekleştiren mikrokolonilerde oluşan doygunluk ile üçüncü aşama olan mikroorganizmaların ayrılması ve yeni mikroorganizmaların eklenmesi ile ayrılma aşaması gerçekleşmektedir (Xu vd. 2020).

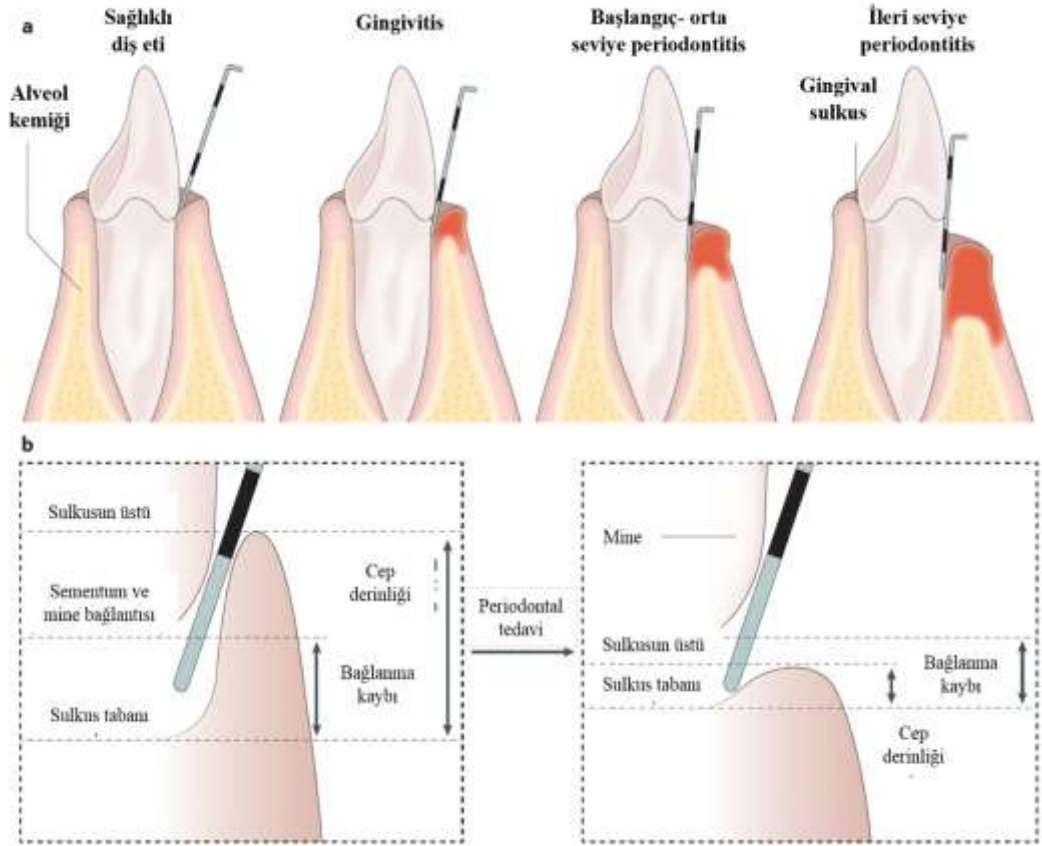
Periodontal dokuda patojen özellikteki mikroorganizmaların kolonizasyonu neticesinde konak organizma bağışıklık sistemi tarafından inflamasyon meydana gelmektedir. Oluşan inflamasyon ile konak periodontal doku hücreleri arasında bulunan homeostatik dengenin geri kazanımı amaçlanmaktadır (Trowbridge vd. 1997). Gingivitis aşaması, periodontal dokuda patojen özellik sergileyen mikroorganizmaların kolonizasyonundaki artış ile gösterdikleri virülans aktiviteyi (biyofilm yapıları, fimbrialar, gingipainler, lipopolisakkarit konformasyonu) ve periodontal doku ile diş minesini arasında cep açıklığı oluşumunu içermektedir (Xu vd. 2020). Bahsedilen cep açıklığı konak organizma tarafından inflamasyonda kullanılan aracı moleküllerin aktivitesi (nötrofil aracılı yıkım gibi) neticesinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Aynı zamanda periodontal doku hücrelerinin bir arada tutunmasını sağlayan kollejenlerin; fagosit hücreleri, fibroblast hücreleri ve epitel hücreleri tarafından üretilen matris metalloproteinaz enzimlerinden

olan kollejenaz enzimleri ile yıkımı, cep açıklığının oluşması ve ilerlemesi adına oldukça önem teşkil etmektedir (Cekici vd. 2014). Kollejenazlar genellikle hücre dışı matriksi ve bazal membran bileşenlerini parçalayan diğer matriks metalloproteinazlar ile birlikte aktivite göstererek doku yıkımında rol oynamaktadır. Dolayısıyla sağlıklı periodontal dokuda matriks metalloproteinazların genetiksel anlamda ifade edilmesinin düşük olması beklenmektedir. Matriks metalloproteinazlar için ana uyarıcılar inflamasyonda görev alan aracı moleküllerdir (Sorsa vd. 2006).

2.4.2 Periodontitis

İlk inflamatuvar süreç olan gingivitis aşamasında gerekli önlemler alınmadığı takdirde patojen bakterinin virülans faktörleri ile matriks metalloproteinaz aktivitesinin etkisinin devam etmesiyle birlikte inflamasyon ilerlemeye devam etmektedir. İnflamasyondaki ilerleme neticesinde konak organizmanın bağışıklık tepkisindeki artış ile inflamasyon şiddetinde artış gerçekleşmektedir. Periodontitis ise diş çevresinde biriken bakteriyel biyofilm tarafından tetiklenen inflamasyonun, dişin destekleyici dokularının daha derin kısımlarına yayılması neticesinde, bağ dokusunun ve alveolar kemiğin zarar görmesine yol açan kronik bir inflamatuvar hastalıktır. İnflamasyonun tedavi edilmemesi sonucunda hastalığın ayırt edici özelliği olan derin periodontal cepler oluşmakta ve sonunda diş kaybına yol açabilen diş eti, kemik ve ligament kaybı meydana gelmektedir (Şekil 2.3.a. Sağlıklı diş eti şemaları, diş eti iltihabı, erken-orta periodontitis ve ileri periodontitis; 2.3.b. cep derinliği ölçümü) (Gao vd. 2018)

Periodontitis temelinde bakterilerin önemli rol oynadığı çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* periodontitise sebep olan önemli bakteriler olarak kabul edilmektedir. Ayrıca periodontitisli bireylerin % 50'sinin hastalık gelişimi için genetik faktörlere sahip olduğu tahmin edilmektedir (Kinane vd. 2017).



Şekil 2.3 Periodontal hastalıkların ana aşamaları (Kinane vd. 2017)

2.5 Periodontal Hastalıklarda İnflamasyon

Mikrobiyal biyofilmin varlığı periodontal hastalığın patogenezi için bir başlangıç aşamasıdır. Oluşan biyofilm uzaklaştırılmadığı takdirde doku hasarına yol açan yüksek bir inflamatuvar durum oluşmaktadır. İnflamatuvar ilişkili bu süreç ise oldukça karmaşıktır (Graves ve Cochran 2003). Periodontal inflamasyon; fiziksel, kimyasal veya patojenler gibi etkilerin neticesinde dokuda gözlemlenebilecek hasar veya yıkıma karşı gelişen fizyolojik bir immün yanıt olayıdır. Periodontal dokuda gerçekleşen bu immün yanıtın oluşabilmesi için dokuda karmaşık hücresel bağlantılar gerçekleşmektedir. Periodontal dokuda gerçekleşen karmaşık hücresel bağlantılar; hücresel dokudaki hasara neden olan ve uyarıcı görevi gören mediatörler, sitokinler, aktivatörler, inhibitörler vb. yapılara karşı durdurucu veya azaltıcı yanıtlar meydana getirmektedir. Dolayısıyla periodontal dokuda yeniden yapılanmanın temelinde inflamasyon bulunmaktadır (Schmid-Schönbein 2006).

Konak organizmanın bağışıklık sistemi genel perspektif olarak enfeksiyona karşı savunma için hücrelerin (fagositik hücreler) ve moleküllerin (sitokinler, kemokinler ve immünoglobulinler) organize edilmesini içermektedir. Bu hücre ve moleküllerin doğal veya adaptif bağışıklık sistemi altında patojenlere verdiği yanıtlar periodontal hastalığın gelişimini ve ilerlemesini belirlemektedir. Periodontal hastalığın gelişebilmesi için bahsedilen bağışıklık sistemi organizasyonunun aktivitesi, konak organizmanın periodontal dokuda inflamasyon geliştirmesine neden olmaktadır (Li ve Collyer 2011). Periodontal bölgede kolonize olan ve patojen özellik gösteren oral mikroorganizmanın (*Porphyromonas gingivalis* gibi) çeşitli virülans faktörleri genellikle periodontal dokuda hasara neden olan faktörleri tetiklemektedir (Eberl 1999). Virülans faktörler neticesinde konak organizma inflamasyon geliştirerek (bağışıklık hücreleri ve molekülleri) bir savunma cevabı vermektedir. Konak organizmanın vermiş olduğu ilk savunma cevabı (inflamasyon başlangıcı) konak organizma adına faydalıdır. Bu aşamada patojen özellik sergileyen mikroorganizmanın virülans faktörleri neticesinde dokuda az miktarda hasar oluşabilmektedir. Bu oluşan ilk hasar ve inflamasyona gingivitis ile sonuçlanmaktadır. Gerekli önlemler alınmadığı veya çeşitli çevresel faktörlerin değiştirilmediği durumlarda dokuda patojen varlığının artması inflamasyonun ilerlemesine neden olarak daha fazla doku hasarı veya diş kayıplarına neden olmaktadır. Dolayısıyla konak organizmanın geliştirdiği inflamasyon bir aşamadan sonra periodontal dokunun daha fazla zararına (doku yıkımı) neden olmaktadır (Papapanou vd. 2018). İleri safhada alveolar kemikte oluşan doku yıkımları ise (gingivitis aşamasının ilerlemiş durumu) periodontitis ile sonuçlanmaktadır. Genel perspektiften bakıldığında, patojen özellik gösteren mikroorganizmalar periodontal hastalıklar için en önemli etken faktör gibi gözükmese de rağmen konak organizmanın geliştirdiği inflamasyon asıl yıkıma neden olan temel faktör olarak dikkat çekmektedir (Di Stefano vd. 2022).

Periodontal inflamasyon süreçlerine göre genel anlamda akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılabilir. Akut periodontal inflamasyon; birkaç saat veya birkaç gün gibi kısa süreli inflamasyonları ifade ederken genel olarak lökositlerin ekstrasvasküler alana hareketi ve plazma proteinlerinin hareketini içermektedir (Markiewski ve Lambris 2007). Kronik periodontal inflamasyon ise genetik yatkınlığın yanı sıra parçalanmayan fiziksel, kimyasal, patojen vb. ajanların varlığı neticesinde makrofaj/monosit ve lökositlerin doku

içinde hareketini ifade etmektedir (Liaskou vd. 2012). Periodontal inflamasyonun gerçekleşmesinde; inflamasyon araçları (reaktif oksijen-nitrojen türleri, sitokinler, akut faz proteinleri, siklooksijenaz ile ilgili metabolitler ve prostaglandinler gibi) ve bağışıklık hücreleri (mast hücreleri, makrofaj hücreleri, nötrofiller, dentritik hücreler, lenfositler ve bazofiller gibi) görev almaktadır (Arulselvan vd. 2016).

Periodonsiyum, patojen özellik sergileyen mikroorganizmaların reseptör-ligand etkileşimi yolu ile konakçı bağışıklık sisteminin hücreleri ile etkileşime girdiği karakteristik bir ortam oluşturmaktadır. Patojen bakterilerinin yüzeyinde bulunan toll benzeri reseptör (TLR), konakçı-patojen etkileşiminde ve bağışıklık hücreleri üzerinde önemli rol oynayan tanıma reseptörleri olarak bilinmektedir (Gu ve Han 2020). TLR'ler toplu olarak patojen ile ilişkili moleküler modeller (PAMP'lar) olarak adlandırılmaktadır. Epitel hücreleri ve bağışıklık hücreleri gibi periodontal dokulardaki heterojen hücre popülasyonları farklı şekilde TLR'yi ifade ederken konak hücreleri tarafından üretilen doğuştan gelen bağışıklık sinyallerinin tanınması PAMP'lere bağlı olmaktadır (Song vd. 2017). Patojen bakterilerin kolonizasyonu, bu bakterilerin oluşturduğu biyofilm konformasyonu ile ilgilidir. Ancak ilk kolonizasyonun oluşması ve ilerlemesi, oral mikrobiyotanın çeşitliliği, konak organizma bağışıklığı, genetiksel faktörler gibi etkilerle de ilişkilendirilmektedir (Ezhilarasan vd. 2022). Diş etinde ve periodontal cep bölgesinde meydana gelen konakçı-patojen etkileşimleri, bakteriler tarafından oluşturulan kemotaktik gradyanlar tarafından yönlendirilen nötrofil ve granülosit (polimorfonükleer hücre) infiltrasyonu ve dendritik hücre antijen sunumunu takip eden inflamatuvar yanıt ve lenfosit infiltrasyonu ile karakterize edilmektedir. Epitel içindeki dendritik langerhans hücreleri, mikrobiyal antijenik materyali tanıyarak lenfositlere sunmak üzere lenfoid dokuya getirmektedir Bunu periodontal lezyon içine nötrofil, granülosit ve lenfosit infiltrasyonu izlemektedir. Ortaya çıkan proinflamatuvar ortam, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökinler, interferon-gama (IFN-gama) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β) gibi sitokinlerin yanı sıra biyofilm bileşenlerine karşı ortaya çıkan antikoları içermektedir. Bununla birlikte, nötrofiller sonunda mikrobiyal biyofilmin büyüklüğü ve kronik kalıcılığı karşısında ölmekte veya diş eti yarığı içindeki bakterilerle etkileşime girerken apoptoz veya nekroz geçirmektedirler. Bu şiddetli kronik inflamatuvar yanıt, osteoklastlar tarafından alveoler kemik rezorpsiyonuna ve matriks metalloproteinazlar

tarafından bağ liflerinin bozulmasına ve granülasyon dokusu oluşumuna yol açmaktadır. Tüm bu patofizyolojik durum mikrobiyal biyofilm ve granülasyon dokusu terapötik olarak başarılı bir şekilde uzaklaştırılana kadar devam etmekte ve sonucunda diş kaybı ile sonuçlanmaktadır (Kinane vd. 2017).

İnflamasyonda görev alan aracı moleküller, kemik rezorpsiyonunun oluşmasından sorumlu yolakların gerçekleşmesinde aktivite göstermektedir. Nükleer faktör –kappa B (RANK) ligantı osteoprotegerin (OPG) ile alveolar kemiğin yeniden şekillenmesinde gerçekleşen moleküler mekanizmalarda görev almaktadır. RANK, öncü osteoklastların reseptörlerini aktive ederek osteoklastların oluşmasını tetiklemektedir. Aynı zamanda OPG, RANK ile etkileşime girerek kemik rezorpsiyonunu engelleyen mekanizmaları oluşturmaktadır. Fizyolojik anlamda alveolar kemiğin yenilenmesi, kemik matrisinin osteoklastlar aracılığı ile parçalanması ve devamında osteoblastlar tarafından yeniden şekillendirilmesini içermektedir. Bu süreç bir denge halinde işlemektedir. Ancak osteoklastlardaki artış neticesinde bozulan denge ile alveolar kemik rezorpsiyonu gerçekleşmektedir. Periodontitiste aktivite gösteren patojen özellikteki mikroorganizmaların lipopolisakarit (LPS) yapıları osteoklast aktivitesini arttıran bir etken olarak bilinmektedir. Dolayısıyla osteoklast aktivitesinin kontrol edilebilmesi konak organizma sağlığı adına elzem olmaktadır (Bhuyan vd. 2022).

Konak organizmanın inflamatuvar süreçte verdiği tepki çeşitli doku hücreleri ve bağışıklık hücreleri tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler (interlökin -1 β (IL-1 β), IL-6, IL-1, IL-8 vd.) ile karakterize edilmektedir (Aral vd. 2020). Gerçekleştirilen araştırmalar periodontitis şiddeti ile IL-1 β miktarının doğru orantılı olduğunu göstermektedir. IL-1 β 'nın periodontal bölgeye salınması diğer inflamatuvar sitokinlerin üretilmesini indüklediğinden dolayı inflamasyon süreci için oldukça önem teşkil etmektedir (Kinane ve Lappin 2002). IL-1 β periodontal endotel hücreleri aktive ederek ve eozinofillerin adezyonunu sağlayarak konak inflamatuvar yanıtını arttırmakta ve ayrıca osteoklast oluşumunu ve aktivitesini teşvik ederek alveolar kemik yıkılmasını da düzenlemektedir (Graves ve Cochran 2003).

2.6 Periodontal Hastalıklarda *Porphyromonas gingivalis* Bakterisinin Rolü

Ağız boşluğunda yaşayan 700'den fazla bakteri türünden biri olan *Porphyromonas gingivalis* anaerobik, Gram-negatif ve basil morfolojiye sahip önemli bir oral patojen bakteridir. *P. gingivalis* üreme anlamında kolonize olduğu ortamda hem proteini veya hemin proteini ile K vitamininin varlığına ihtiyaç duymaktadır (Mei vd. 2020). Genellikle ağız boşluğunda bulunan subgingival sulkus bölgesinde kolonize olan *P. gingivalis* genellikle diş plağında yer alan birincil kolonize edicilerin varlığı sayesinde (örneğin; *Streptococcus gordonii*, *Prevotella intermedia*) ikincil kolonize edici olarak yer almaktadır (How vd. 2016). *P. gingivalis* periodontal dokular üzerindeki ciddi yıkıcı etkileri ile periodontal inflamasyonun başlıca etkenini oluşturmaktadır (Mysak vd. 2014). Diş destekleyen dokuların yıkımında önemli bir etiyolojik faktör olan *P. gingivalis* periodontal dokularda çoğalabilmekte, dokuyu kaplayabilmekte ve bu sayede konak organizma tarafından oluşturulan inflamasyondan (üretilen bağışıklık hücrelerinden) kaçabilmektedir. Bu özelliğini konak organizma adına zararlı etkileri olan virülans faktörleri ile gerçekleştirmektedir (Mysak vd. 2014). *Porphyromonas gingivalis* bakterisinin evrim süreci içerisinde geliştirdiği çeşitli virülans faktörler yaşam sürekliliği için önem teşkil etmektedir (Mei vd. 2020). Oral patojenik bakterilerde bulunan fimbria yapıları bakterilerin subgingival bölgedeki kolonizasyonunu teşvik etmesi nedeniyle önemli bir virülans faktör olarak kabul edilmektedir (Enersen vd. 2013). *Porphyromonas gingivalis* bakterisinin oral bölgedeki kolonizasyonunun ilk aşamalarında uzun fimbrialar biyofilm oluşumunu desteklemektedir. Dolayısıyla bir diğer virülans faktör olan biyofilmler aracılığıyla fimbrialar virülans etki göstermektedir (Enersen vd. 2013). Periodontal inflamasyonun oluşmasında baş rol oynayan *P. gingivalis* bakterisinin 2 fimbria yapısı bulunmaktadır (Amano vd. 2004). Bu fimbriaların üretiminden sorumlu iki farklı geni ifade etmektedir. Bunlardan birincisi fimbrianın FimA proteininden sorumlu olan *fimA* geni, ikincisi ise MFa proteininden sorumlu *mfa1* genidir (Enersen vd. 2013). Farklı şekilde ifade edilen bu iki fimbria, uzunlukları ve kDa'ları açısından farklılık göstermektedir (Hamada vd. 2002). Buna göre uzun olan fimbria FimA, kısa olan fimbria ise MFa şeklinde sınıflandırılmaktadır. Uzun fimbrianın üretilmesinden sorumlu olan *FimA* geni 6 tipte sınıflandırılmaktadır (Amano vd. 2004). Bu farklı tipte *FimA* genleri *P. gingivalis* bakterisinin yüzeylere tutunmasındaki farklılıklara neden olarak bakterinin

virülansını belirlemektedir. Farklı genotiplerden (I, Ib, II, III, IV, V) genotip II, agresif periodontitisli hastalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Dahlen vd. 2019). *Porphyromonas gingivalis* bakterisinde bulunan fimbria yapıları; alveolar kemik rezorbsiyonu ile ilişkilendirilen IL-1 α , IL- β ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi çeşitli sitokinlerin üretimini arttırmaktadır (Enersen vd. 2013). Uzun fimbrialar TLR-2 ve yardımcı reseptör (CD14) aracılığıyla nükleer faktör kB'yi (NF - kB) uyarmaktadır (Hajishengallis vd. 2006). Sonucunda TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8 gibi kemik rezorbsiyonunda görev alan sitokinlerin indüklenmesine neden olduğu yapılan çalışmalar neticesinde anlaşılmaktadır (Ogawa vd. 2002). Bu ilişkinin nedeni ise hücre dışı elemanlar olan fimbriaların konak hücre reseptörleri ile ilk etkileşime giren faktörler olması ve ardından hücre içi sinyal yollarını uyarmasıdır (Enersen vd. 2013). Benzer etkileşimlerin kısa fimbrialar ile de gerçekleştiği bilinmesine rağmen bu etkileşimlerin oldukça karmaşık olması konunun anlaşılması açısından zorluk oluşturmaktadır (Hajishengallis 2011).

Porphyromonas gingivalis bakterisinin bir diğer yapısal bileşeni olan LPS ise yapısında bulunan lipit A ile doğuştan gelen bağışıklık sisteminin tetiklenmesi için önemli bir bileşen olarak kabul edilmektedir (Mei vd. 2020). LPS, *P. gingivalis* gibi Gram negatif bakterilerin dış hücre zarının önemli bir bileşenidir (Darveau vd. 2002). *Porphyromonas gingivalis*'in LPS yapısı kimyasal olarak, 3-hidroksi-15-metilheksadekanoik asit ve 3-heksadekanoiloksi-15 metilheksadekanoik ile açillenmiş bir glukozamin beta-(1-6) disakarit 1-monofosfat olduğu çoklu lipit A formları içermektedir (Dixon ve Darveau 2005). LPS, lipit A kısmında bulunan yağ asitlerinin açillenmesi neticesinde farklı formlar kazanabilmektedir. Dolayısıyla Lipit A yapısına bağlı olarak LPS farklı toksisite gösterebilmektedir (Schromm vd. 2000). Konakçı hücreler için oldukça virülans özellik gösteren LPS yapısı, konak hücrelerinin TLR4 reseptörü tarafından tanınarak bir savunma mekanizması olan inflamasyonu uyarmaktadır. İlk zamanlarda konak yararına olan inflamasyon önlenemediği takdirde konak organizma için doku yıkımına neden olmaktadır (Herath vd. 2013).

Porphyromonas gingivalis'in HBSP60 bileşeni de bağışıklık oluşturma açısından kritik bir öneme sahiptir (Liaskou vd. 2012). Konak kolonizasyonu, konak savunmasının

inaktivasyonu, doku yıkımı ve besin alımında gingipain enzimlerinin doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık üzerinde virülans faktör olarak birçok etkisi olabilmektedir. LPS yapısı ile birlikte en önemli virülans faktörlerden birisi olan biyofilm yapıları konak immün yanıtından kaçınmaya ve *P. gingivalis*'in kendi habitatını oluşturarak kendi simbiyotik dengesini kurması ile inflamasyonun artmasını desteklemektedir. Virülans faktörlerin konak hücrelerinde aktiflik göstermesi neticesinde üretilen sitokinler konak hücre tepkilerinin düzenlenmesine, kemik kaybına ve konakçı dokularında tahribata neden olmaktadır. Dolayısıyla, periodontal inflamasyonun anlaşılması için *P. gingivalis* bakterisinin virülans faktörlerinin iyi araştırılması oldukça önem teşkil etmektedir (Mei vd. 2020).

Bahsedilen tüm bu süreçler neticesinde, *P. gingivalis* bakterisinin diğer oral patojen mikroorganizmalar ile kolonizasyonu mümkün olabilmektedir. Bu kolonizasyon ile oral patojen bakterilerinin sayısındaki artış ise konak immün bağışıklık hücrelerinin sayısında artışa neden olmaktadır. Bu durum neticesinde bağışıklık hücreleri tarafından üretilen sitokinler gibi aracı maddeler periodontal inflamasyonun şiddetlenmesine ve buna bağlı olarak ilerlemesine neden olmaktadır. Dolayısıyla, *P. gingivalis* bakterisinin biyofilm yapıları ile kolonizasyonundaki artış doğrudan ve dolaylı yoldan virülans faktör olarak ifade edilmekte ve inflamasyonu arttırmaktadır (Xu vd. 2020).

2.7 Oral Mikrobiyotanın İmmünomodülatör Rolü

Oral mikrobiyota, ağız boşluğunda yaşayan mikroorganizmaları tanımlamaktadır. İnsan mikrobiyota projesinden elde edilen veriler ağız boşluğunda 700 farklı türün bulunduğunu belirtmektedir (Kilian vd. 2016). Oral mikrobiyotada, konak organizma adına hem yararlı hem de zararlı özellik sergileyen fırsatçı patojen mikroorganizmalar denge halinde bulunmaktadır. Faydalı mikroorganizmalar konak organizma ile simbiyotik bir ilişki içinde varlığını sürdürmektedir. Konak organizma ile simbiyotik ilişki içinde yaşayan mikroorganizmalar oral bölgede bulunan patojenlerin aktivitesini sınırlamak ve savunma sağlamak adına önemli roller üstlenmektedir (Ivanov ve Honda 2012). Doğal oral mikrobiyotada bulunan mikroorganizmalar ve doğal mikrobiyotanın ürettiği metabolik ürünler doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından tanınmaktadır

(Mogensen 2009). Dolayısıyla, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri ve oral mikrobiyota konak organizma ile birlikte faaliyet göstererek konak organizmanın korunmasında ve homeostazın sürdürülmesinde önemli bir rol göstermektedir (Cua ve Tato 2010). Konak organizma adına yararlı olan oral mikrobiyal topluluklar, konak organizmanın immün yanıtı aracılığı ile antimikrobiyal peptitleri (AMP) indükleyerek periodontal dokunun epitel bariyerinin bütünlüğünün korunmasını ve işlevinin gerçekleştirebilmesine yardımcı olan faktörlerden birisini oluşturmaktadır. Epitel hücreleri tarafından üretilen AMP'ler bakteriyal, viral veya fungal tutunmaların önlenmesindeki rolleri ile ağız sağlığının korunması adına işlev göstermektedir (Dale ve Fredericks 2005). Aynı zamanda oral mikrobiyota ile ortak evrime katılan AMP'ler antimikrobiyal aktiviteleri ile oral mikrobiyotanın korunmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca AMP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin yanında konak organizmanın bağışıklık hücreleri için yara iyileşmesi ve konak hücre proliferasyonu gibi bazı önemli katkıları olduğu da bilinmektedir (Hans ve Madaan 2014). Dolayısıyla, konak immün yanıtı ile indüklenen AMP'lerin aktivitesi, oral mikrobiyotanın yararlı immünomodülatör etkisini şekillendirmektedir (Şenel 2021).

Oral mikrobiyotada bulunan fırsatçı patojenler farklı faktörlerin etkisi altında çoğalma şansı bulduklarında mikrobiyotadaki denge bozulmakta ve disbiyosis oluşmaktadır (Dutzan vd. 2018). Bu mikrobiyal toplulukların çeşitli virülans faktörleri neticesinde konak organizma bağışıklık tepkileri etkilenmektedir (Sedghi vd. 2021). Disbiyoz neticesinde periodontal dokuda yüksek seviyede üretilen Th-17 ve nötrofil hücreleri; IL-6, IL-17, IL-23, TNF- α , IFN- γ ve granülosit koloni uyarıcı faktörün yanı sıra C-C motifli ligandlar ile inflamasyonun güçlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca, gerçekleştirilen bazı çalışmalar oral mikrobiyota ile tetiklenen Th-17 hücrelerinin immünopatoloji açısından tetikleyici olduğunu da göstermektedir (Hajishengallis 2014).

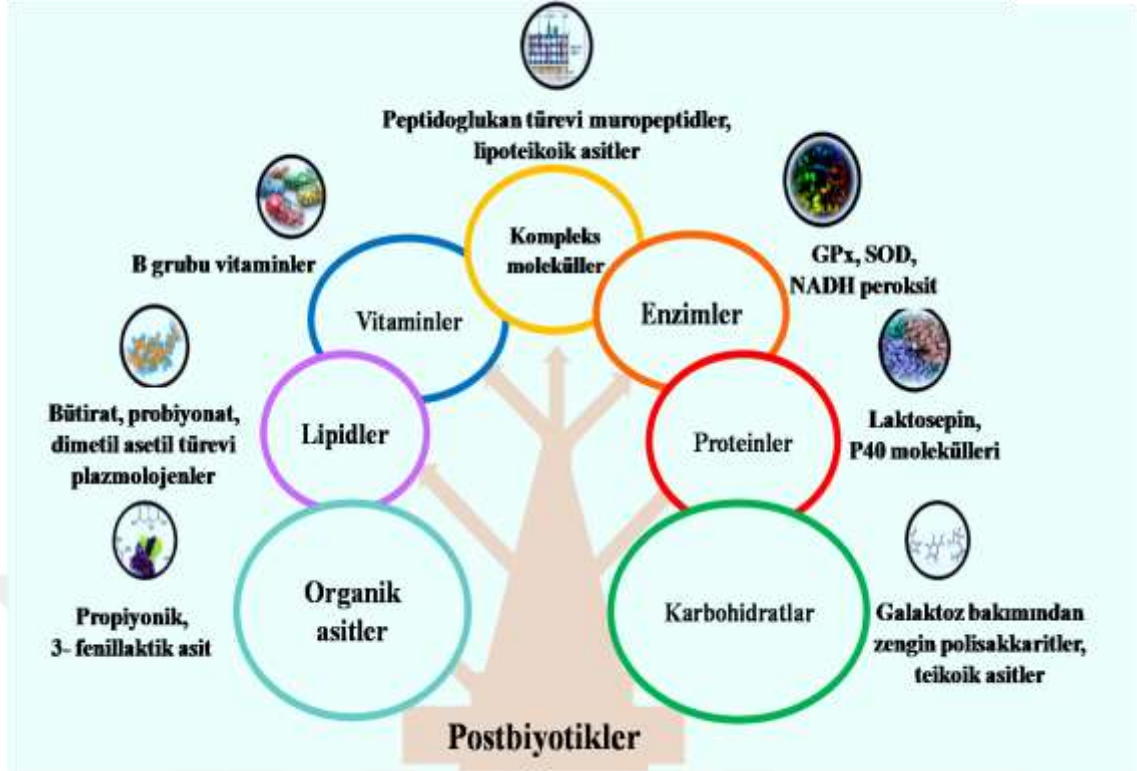
Konak organizma ile oral mikrobiyota arasındaki homeostatik denge konak organizma sağlığı adına önem teşkil etmektedir (Devine vd. 2015). Oral mikroorganizmalar bu dengeyi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar aktivite sergileyerek gerçekleştirmektedir. Dolayısıyla, ağız boşluğunda gerçekleşen hastalıklar sadece sorumlu patojen mikroorganizmalar tarafından değil aynı zamanda oral mikrobiyotanın kompozisyonu ve

aktivitesi ile konak başışıklığı üzerindeki etkileri neticesinde oluşmaktadır (Hooper ve Macpherson 2010).

2.8 Postbiyotik Mediatörlerin İmmünomodülatör Rolü

Geleneksel probiyotik, prebiyotik ve paraprobiyotik tanımlarına uymayan ve güncel bir terim olarak karşımıza çıkan “Postbiyotik” kelimesi için araştırmacılar; canlı olmayan probiyotikler, inaktive edilmiş probiyotikler, biyotik olmayanlar, hayalet probiyotikler ve metabiyotikler gibi farklı terminolojiler önermektedir. Bununla birlikte, “paraprobiyotikler” (hayalet veya inaktif probiyotikler); Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü tarafından küçük değişikliklerle probiyotik tanımına benzer şekilde “yeterli miktarlarda uygulandığında, tüketiciler üzerinde fayda sağlayan inaktive (canlı olmayan) mikrobiyal hücreler” olarak ifade edilmektedir. Son yıllarda oldukça yeni bir kavram olmasına rağmen postbiyotikler ise, “konakçıda biyolojik aktiviteye sahip mikroorganizmalar tarafından üretilen bakteriyel veya metabolik ürünler” olarak tanımlanmaktadır (Nataraj vd. 2020). Probiyotik olarak kabul edilen suşlar tarafından üretilen postbiyotiklerin tüketiciler üzerinde sıklıkla benzer veya tamamlayıcı etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (Aguilar-Toala vd. 2018).

Postbiyotik mediatör (PM) kavramı, farklı biyolojik yolları etkileyerek mikrobiyota üyelerinin faydalı etkilerine aracılık eden çeşitli biyo-aktif metabolitler (mediatörlerin) için kullanılmaktadır. Aynı zamanda hücre bağımsız süpernatant, metabiyotik ve biyojenik olarak da tanımlanan postbiyotik mediatörler; Tsilingiri ve Rescigno’ya (2013) göre mikroorganizma tarafından salınan veya mikroorganizmanın metabolik aktivitesi yoluyla üretilen, konak üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak yararlı bir etki sergileyen herhangi bir maddeyi veya sinerjistik etki sağlayabilen birden çok maddeyi içerebilmektedir. Bu maddelerin konakçuya faydalı etki sağlayan ve probiyotik tanımını karşılamayan tüm biyo-aktif bileşenleri içerebileceği varsayılmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Postbiyotik mediatörlerin ana gruplarının gösterimi (Homayouni vd. 2020)

PM'lerin etki mekanizmaları arasında konak hücrede yerleşik mikrobiyotanın düzenlenmesi, epitelyal bariyer fonksiyonunun artırılması, sistemik veya lokal immün yanıtlarının düzenlenmesi, sistemik metabolik yanıtların düzenlenmesi ve sinir sistemi ile sinyal sistemi yer almaktadır (Favero vd. 2022). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar PM'lerin konak immün yanıtında bağışıklık hücrelerinin modülasyonunu çeşitli mekanizmalar aracılığı ile sağlayabildiğini rapor etmektedir (Şekil 2.5) (Cuevas-Gonzalez vd. 2020). Bu immünomodülatör etki hücre duvar yapıları ile Th1 bağışıklık hücrelerinin uyarılmasıyla sitokin üretiminin artışı ve Th2 bağışıklık hücrelerinin uyarılmasıyla sitokin üretiminin azaltılması şeklinde gerçekleşmektedir. Ayrıca, peptidoglikanların makrofaj hücreleri ile etkileşime girerek bazı sitokinlerin üretimini engellediği de ifade edilmektedir.

Mikroorganizmalar tarafından fermentasyon sonucunda hücre dışına üretilen ve hücre bağımsız süpernatant (HBS) olarak da tanımlanan PM'ler çok sayıda biyolojik aktivite sergileyen çeşitli metabolitleri içerebilmektedir (Hamad vd. 2020). Bu metabolitlerin (yağ asitleri, organik asitler, hidrokarbonlar, aminoasitler, fenol, benzoik asitler, alkoller,

şeker, peptitler) anti-inflamatuvar sitokinlerin gen ifadesini arttırdığı ve pro-inflamatuvar proteinlerin gen ifadesini ise azalttığı bilinmektedir (Lee vd. 2020). *Lactobacillus rhamnosus* GG bakterisi ile yapılan bir çalışmada HBS'lerin anti-inflamatuvar özellikteki IL-4, IL-5 ve IL-10 sitokinlerini modüle ettiğini ortaya konmuştur. Benzer bir çalışmada HBS'lerin anti-inflamatuvar sitokin olan IL-8 modülasyonuna etki ettiği ve makrofajlar tarafından üretilen IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-10 sitokinlerinin üretimini modüle ettiğini gösterilmektedir (De Marco vd. 2018).



Şekil 2.5 PM'lerin immünomodülatör rolünün şematik gösterimi (Yeşilyurt vd. 2021)

PM'ler arasında yer alan bakteriyel ekzopolisakaritler (EPS), bakterilerin hücre yüzeyinde bağlı bulunan (EPS-b) veya hücre dışına salınan (EPS-r) kapsüler yapısı ile

bakterinin hücre yüzeyine tutunmasını sağlayan ve antiinflamatuvar etki sergileyen makromoleküller olarak tanımlanabilmektedir. Bakterilerin türüne göre farklılık gösteren EPS'ler homopolisakkarit veya heteropolisakkarit yapıda olabilmektedir (Sutherland 1972). Homopolisakkaritler tek tür monosakkarit türevinden meydana gelen EPS'leri ifade etmektedir. Hücrelerde glikansükrazların aracılığı ile üretimleri gerçekleşmektedir (Monsan vd. 2001). Heteropolisakkaritler ise bir disakkaritten hektasakkarite kadar farklı monosakkaritlerden oluşmaktadır (De Vuyst ve Degeest 1999). Bakteriler tarafından üretilen EPS'ler bakteriyi virüslerden, fagositoz yapan bağışıklık hücrelerinden veya toksik etki gösteren maddelerden korumakta ve aynı zamanda kolonize olduğu konak organizmanın bağışıklığını, fizyolojik mekanizmalarını, lipid metabolizmalarını ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu da etkilemektedir (Dinic vd. 2018). *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 suşu tarafından üretilen bir EPS farelere uygulanmış ve IL-1 β , TNF- α ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) miktarında azalma ile IL-6 ve IL-10 (antiinflamatuvar sitokinler) miktarında artışa neden olmuştur (Wang vd. 2020). EPS'lerin aynı zamanda oksidatif strese neden olan serbest oksijen türlerinin aktivitesini azaltarak antioksidan aktivite sergilediği de rapor edilmektedir (Liu vd. 2010).

Sıcaklık uygulaması, kimyasal muamele, sonikasyon ve ultraviyole ışınları gibi yöntemlerle inaktive edilen cansız bakteri hücreleri de immunomodülatör etki sergileyebilmektedir. İnaktivasyon anlamında birçok işlem olmasına karşın en yaygın yöntem sıcaklık ile uygulanan inaktivasyon olarak kabul edilmektedir (Taverniti ve Guglielmetti 2011). Gerçekleştirilen çalışmalar, *Lactobacillus* kaynaklı inaktive edilmiş hücrelerin IL-6 ve TNF- α gibi sitokinleri baskıladığını, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin üretilmesinde ise etkili olduğunu göstermektedir (Chung vd. 2019). Üç farklı ısı ile inaktive edilmiş *Lactobacillus* türlerinin fareler üzerinde kullanıldığı bir çalışmada ise inaktive *Lactobacillus* hücrelerinin dentritik ve makrofaj bağışıklık hücrelerini indüklediği, IL-12 mediatörünün üretiminde artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır (Ditu vd. 2014). Bu etkilerinin yanısıra, inaktive edilen hücrelerin serbest radikaller üzerindeki antioksidatif etkileri ile konak organizma tarafından başlatılan inflamasyonun yönetilmesinde de oldukça önem teşkil ettiği belirtilmektedir (Jang vd. 2018).

Hücre yüzey proteinleri, hücrelerin dış zarında bulunarak hücrel madde alış-verişini kontrol eden, çeşitli sinyal yollarına aracılık eden ve hücre-hücre etkileşimlerini sağlayan protein temelli yapılar olarak bilinmektedir. Hücre yüzey proteinleri arasında bulunan ve hücre yüzey tabakasını oluşturan S tabakası proteini, mukus bağlayıcı proteinler, fibronektin bağlayıcı proteinler, kollajen bağlayıcı proteinler gibi yapılar bakterilerin postbiyotik mekanizmalarını oluşturmada ve sergilemede kilit rollere sahiptir (Frece vd. 2005). Konak organizma ile teması mümkün kılan hücre yüzey proteinleri konak organizmada sinyal iletim mekanizmalarının aktive olmasını sağlamaktadır. Sinyal iletim mekanizmalarının aktivitesi neticesinde kemokinler ve sitokinlerin salgılanması gerçekleşmektedir. Kemokin ve sitokinlerin salgılanmasındaki etki, hücre yüzey proteinlerinin immünomodülatör etkisine aracılık etmektedir (Gao vd. 2017). *Lactobacillus rhanmosus* GG bakterisinin hücre yüzey proteinleri ile yapılan *in-vitro* bir çalışmada pro-inflamatuvar özellik sergileyen sitokinlerin aktivitesinin azaldığı ifade edilmektedir. *Lactobacillus* bakterileri ile yapılan bir başka çalışmada ise hücre yüzey proteinlerinin konak organizmada anti-inflamatuvar özellik sergileyen IL-10 sitokinlerinin üretimini arttırdığı ve inflamatuvar etki gösteren TNF- α 'nın üretilmesinin baskılanmasında görev aldığını göstermektedir. Aynı zamanda hücre yüzey proteinlerinin IL-8 sitokinlerinin ifadesini etkilediği de belirtilmektedir (Chandhni vd. 2021).

Konak organizmanın bağışıklık mekanizmalarında modüle edici etkileri olduğu anlaşılan bakteriyel lizatlar, TLR aracılığı ile konak bağışıklık hücreleri olan dentritik hücreler ile etkileşime girerek aktivite göstermektedirler. Dentritik hücrelerin bakteriyel lizatlar ile uyarılmasıyla kemokinlerin salınmakta ve polimorfonükleer nötrofillerin hareketi tetiklenmektedir. Aynı zamanda IL-4 ve IL-13 gibi Th2 hücreleri ile ortama salınan sitokin miktarlarının azaltılmasında da görev almaktadırlar. Bununla birlikte, Th1 ile ortama salınan IFN- γ gibi sitokinlerin miktarının artırılmasından da sorumludurlar (Kaczynska vd. 2022). Bakteriyel hücre lizatı etkilerinin çalışıldığı bir çalışmada bakteriyel lizatların konak organizma tarafından üretilen TNF- α , IL-1 β , IL-6 üretimini teşvik ettiği ifade edilmektedir. Aynı zamanda konak organizmada bulunan PRR reseptörleri ile etkileşime giren bakteriyel hücre lizatı, B hücreleri ile etkileşerek antikor üretiminde kritik rol oynadığı sonucuna varılmaktadır (Coviello vd. 2014). Dolayısıyla, konak bağışıklığını desteklemek adına bakteriyel hücre lizatları da önem arz etmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürü, gelişim ve saklama koşulları

Tez çalışması kapsamında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı bakteri kültür koleksiyonunda bulunan ve anne sütü ile beslenen bebek fekal mikrobiyotasından izole edilerek 16S rRNA dizi analizine göre *Lactiplantibacillus plantarum* olarak tanımlanan EIR/IF-1 suşu kullanılmıştır. Bu bakteri daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalar neticesinde sergilemiş olduğu önemli biyolojik aktiviteleri dikkate alınarak seçilmiştir (Omeroglou vd. 2022, Karaca vd. 2022)

Lactiplantibacillus plantarum EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS (Merck) sıvı besiyerine (Çizelge 3.1) inoküle edilmiş ve 37°C’de 24 saat kültüre edilmiştir. 5.000 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemini takiben üst faz uzaklaştırılmış ve hücreleri içeren pellet 1 mL steril serum fizyolojik su (SF; % 0,85 NaCl) ile yıkanmıştır. İkinci bir santrifüj işlemi ardından hücreler % 50 gliserol (Merck) çözeltisinde süspanse edilmiş ve kriyoviallere (Sarstedt) aktarılarak -80°C’de saklanmıştır (Todorov vd. 1999).

Çizelge 3.1 Çalışma kapsamında kullanılan besiyerleri içerikleri

Besiyeri	İçerik/L
MRS; De Man, Rogosa and Sharpe (Merck)	10 g Pepton 8 g Et ekstraktı 4 g Maya ekstraktı 20 g Dekstroz 2 g Dipotasyum sülfat 1 g Tween 80 2 g Diamonyum sitrat 5 g Sodyum asetat 0.2 Magnezyum sülfat 0.04 Mangan sülfat pH 5,7 ± 0,2

3.1.2 iPDLF hücreleri ve gelişim koşulları

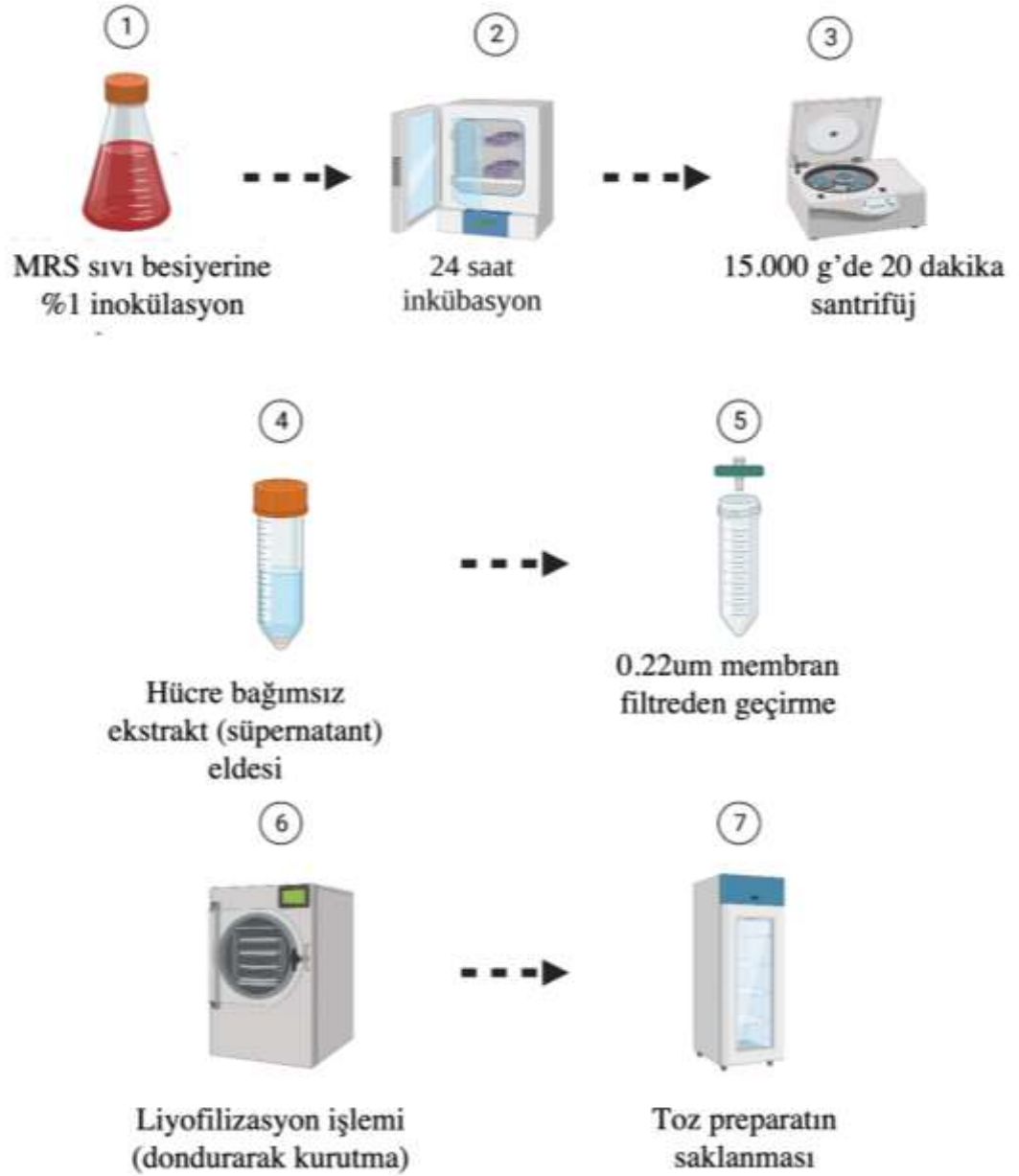
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı hücre kültür koleksiyonundan temin edilen insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücreleri rutin hücre çözme prosedürlerinin ardından ivedilikle fibroblast hücreler için hazırlanan besiyeri (alfa-MEM-Sartorius, % 10 Fetal Sığır Serum-BI, % 1 penisilin-streptomisin-Gibco, % 1 L-glutamin-Sartorius ve %1 esansiyel olmayan amino asit-Gibco) içerisine alınarak 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ ve % 80-90 bağıl nem koşullarını sağlayan bir inkübatörde (Nüve) kültüre edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Postbiyotik mediatörlerin elde edilmesi

3.2.1.1 Hücre bağımsız süpernatant (HBS) eldesi

Genel olarak hücre dışına salınan tüm metabolitleri içeren PM'lerin eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C'de 15.000g'de 20 dakika santrifüj işlemi (Nüve) gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında PM'leri içeren hücre bağımsız süpernatant (HBS) alınmış ve hücrelerinden arındırılmak üzere 0.22 µm çaplı steril membran filtreden (Sarstedt) geçirilmiştir (Mohammedsaeed vd. 2014). Bir gece -20°C'de, ardından -86°C'de dondurulan PM'leri içeren üst faz 24 saat boyunca liyofilizasyon işlemine (donma koşulları -20°C, vakum basıncı: 0.120 mB-kondansör sıcaklığı -58°C; Christ freeze dryer) tabi tutulmuştur. Toz formda elde edilen PM'ler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1 HBS eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

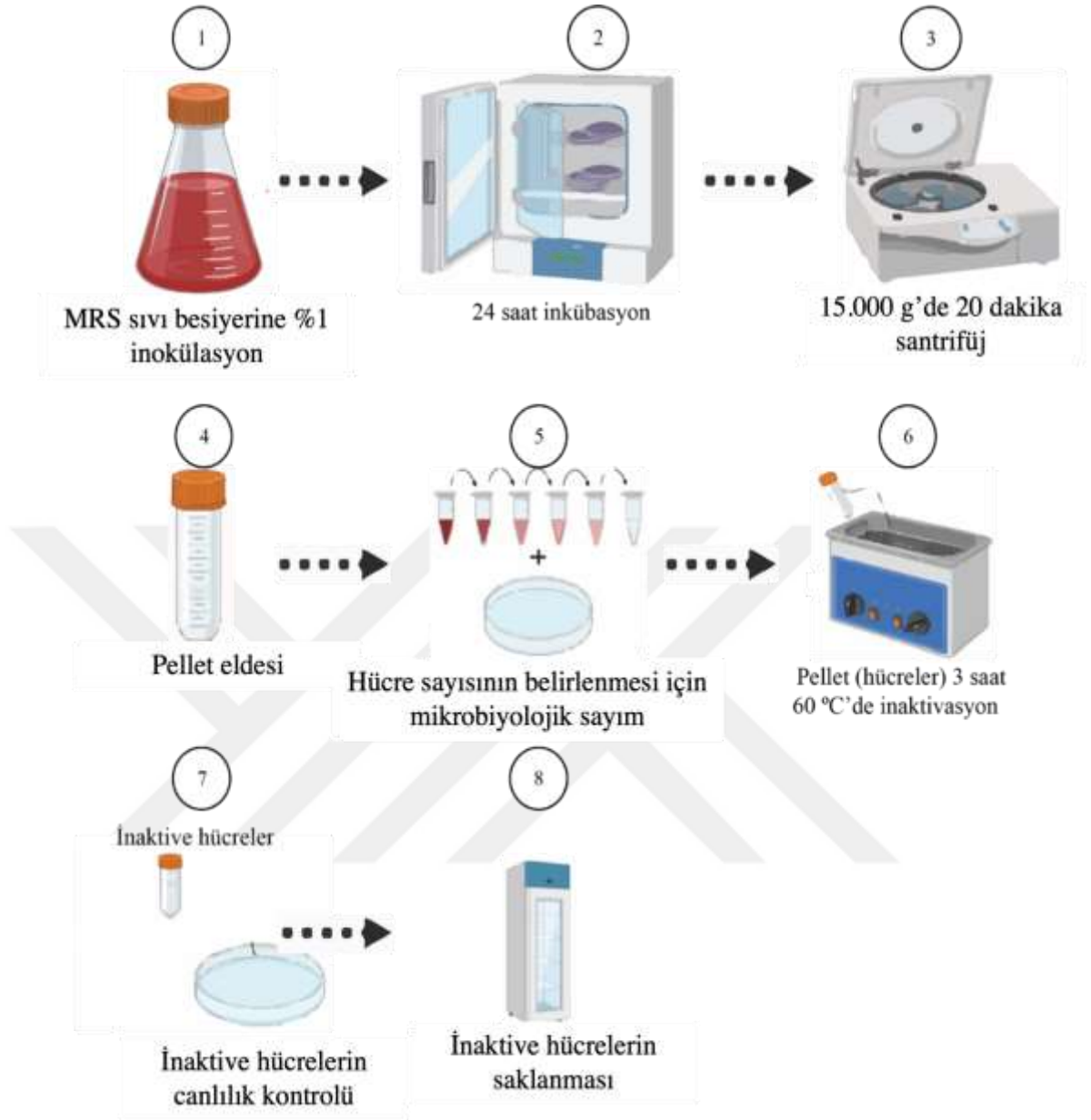
3.2.1.2 İnaktive hücrelerin eldesi

İnaktive hücrelerin eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C'de 15.000g'de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pellet içerisinde bulunan hücre sayısını belirlemek amacıyla steril SF çözeltisinde süspansiyon edilmiş ve seri dilüsyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bir dilüsyon faktöründen

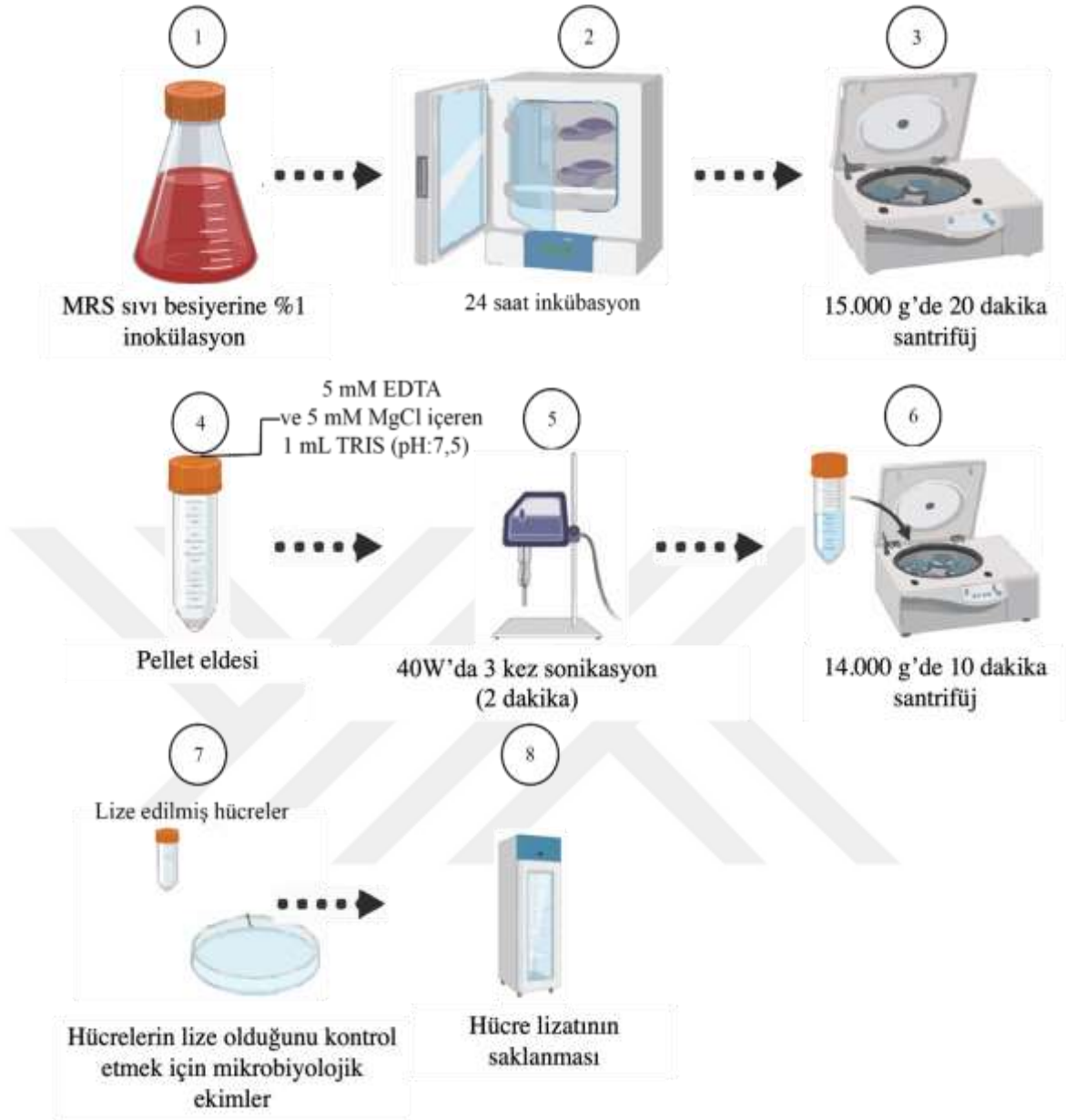
10 µL alınarak MRS katı besiyerine drop-plate yöntemiyle mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben gelişen koloniler sayılmış ve kob/mL olarak hesaplanmıştır. Sayım işlemine tabi tutulan hücrelerin inaktivasyonu ısı uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler su banyosunda (Nüve) 60°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben inaktivasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla MRS sıvı besiyerine 100 µL, MRS katı besiyerine ise 10 µL ekimler gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben kültür gelişimi ya da koloni gelişimi kontrol edilmiştir (Nataraj vd. 2020). Tüm aşamaları aseptik koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde elde edilen inaktive hücreler daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.2'de özetlenmiştir.

3.2.1.3 Hücre lizatının eldesi

Hücre lizatının eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C'de 15.000g'de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücreler (pellet) 5 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, Merck) ve 5 mM magnezyum klorür (MgCl₂, Merck) içeren 1 mL hidröksimetil aminometan (TRIS, Merck) (pH: 7,5) çözeltisi ile çözülmüştür. 40W'da 3 kez sonikasyon işlemi uygulanmıştır (QSonica). 4 °C'de 10 dakika 14.000g'de santrifüjü takiben hücre lizatı elde edilmiştir (Nataraj vd. 2020). Hücrelerin lize olduğunu test etmek amacıyla MRS sıvı besiyerine 100 µL, MRS katı besiyerine ise 10 µL ekimler gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben kültür gelişimi ya da koloni gelişimi kontrol edilmiştir. Tüm aşamaları aseptik koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde elde edilen hücre lizatı liyofilize edilmiş ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.3'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2 İnaktive hücre eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)



Şekil 3.3 Hücre lizatı eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

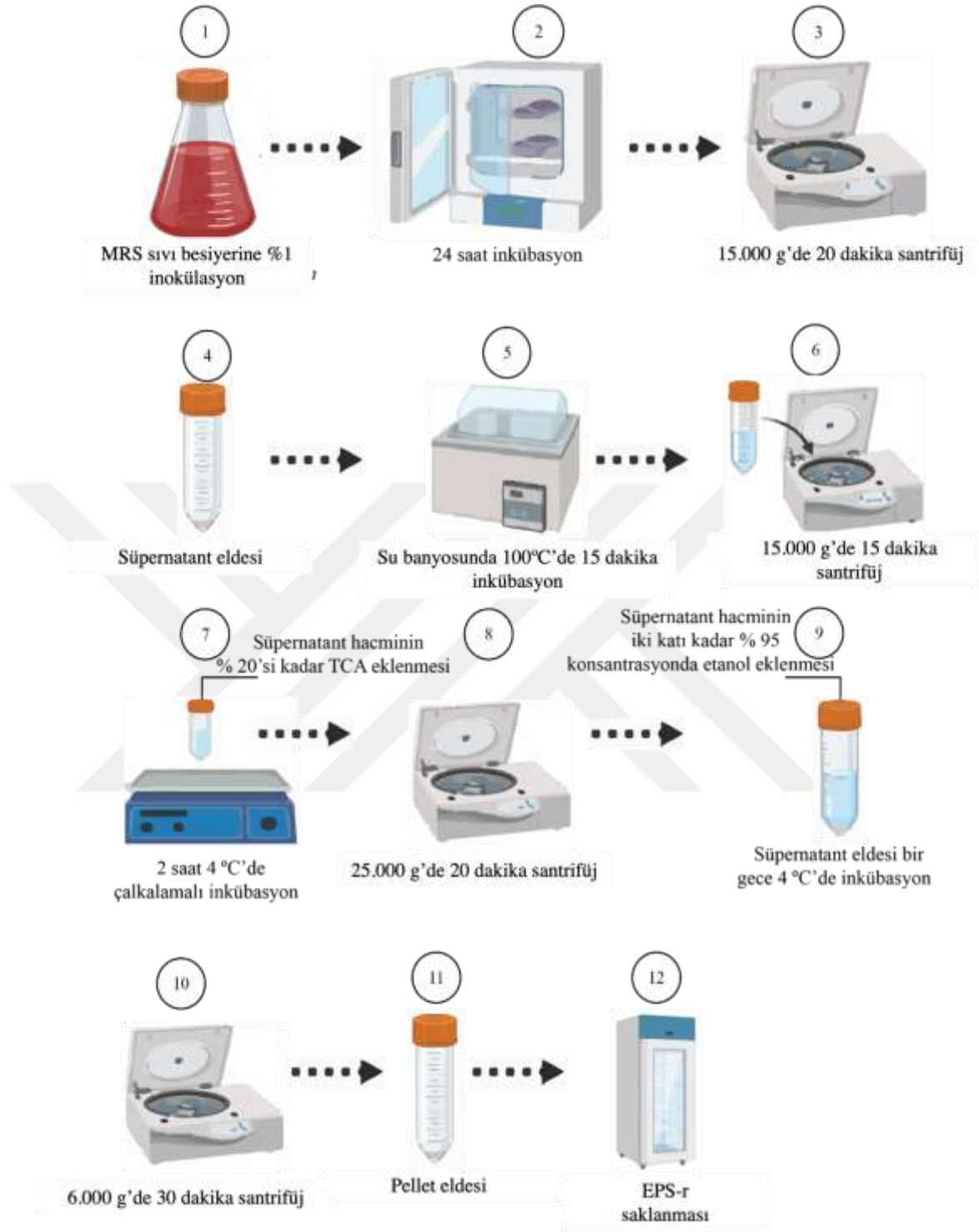
3.2.1.4 Ekzopolisakkarit (EPS) eldesi

Serbest ekzopolisakkaritlerin (EPS-r) eldesi: EPS-r eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C'de 15.000g'de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süpernatant (üst faz) su banyosunda (Nüve) 100°C'de 15 dakika bekletilmiştir. 15.000g'de 15 dakika santrifüj uygulamasını takiben elde edilen süpernatant üzerine, % 20 konsantrasyonda trikloroasetik asit (TCA, Sigma) eklenmiştir.

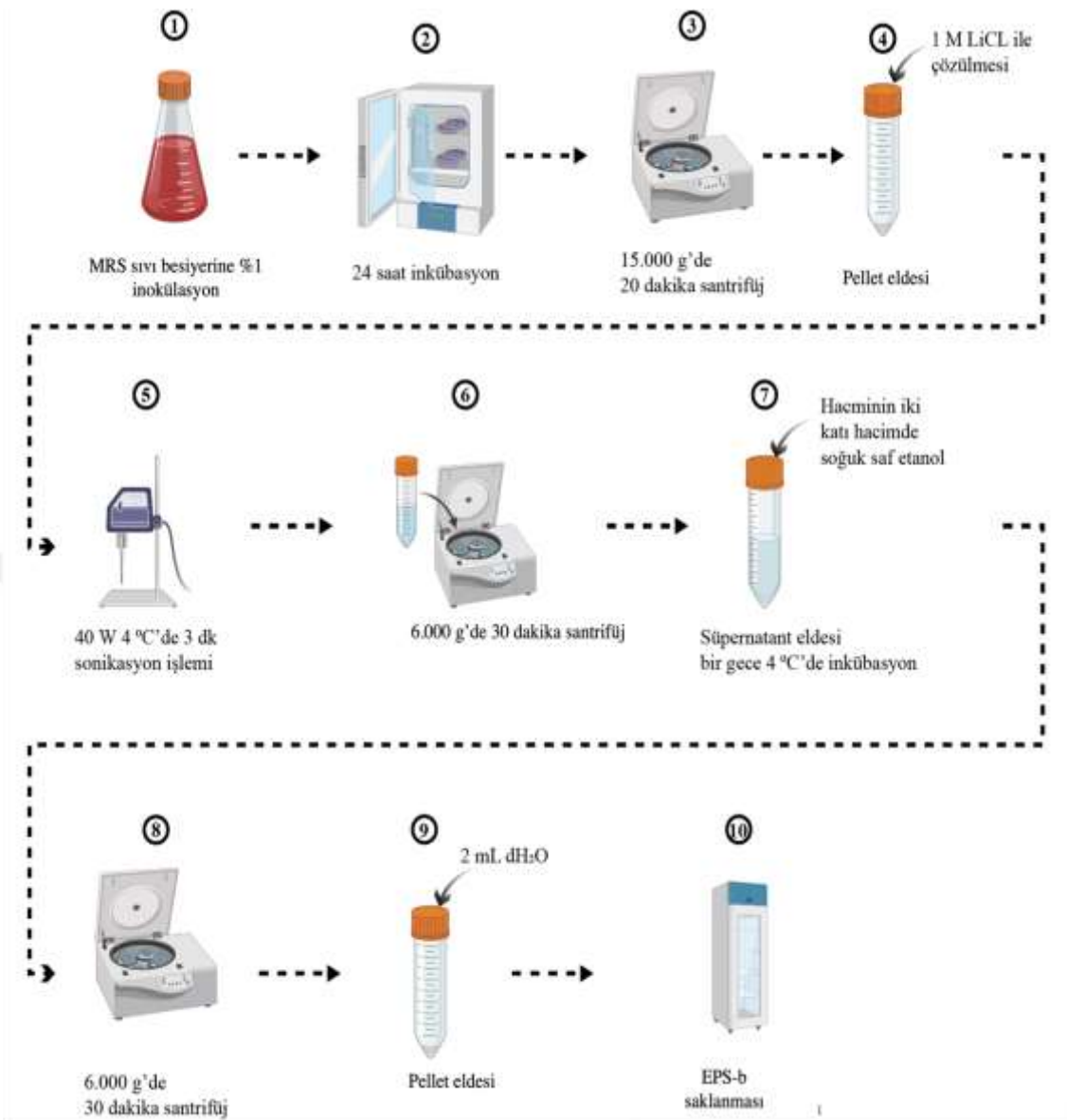
4°C’de 2 saat süreyle çalkalamalı inkübasyonu takiben 4°C’de 25.000g’de 20 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatanta hacminin 2 katı kadar % 95 konsantrasyonda etanol (Merk) eklenerek bir gece inkübasyon uygulanmıştır. 4°C’de 6.000g’de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanarak EPS-r elde edilmiştir (Tallon vd. 2003). Tüm aşamaları aseptik koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde elde edilen EPS-r liyofilize edilmiş ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.4’de özetlenmiştir.

Hücre yüzeyine bağlı ekzopolisakkaritlerin (EPS-b) eldesi: EPS-b eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C’de 15.000g’de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücreler (pellet) 10 mL SF ile yıkanmış ve ardından 5 mL 1 M sodyum klorür (NaCl, Merck) ile süspansiyon edilerek 40W’da 3 dakika sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 4°C’de 6.000g’de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve elde edilen süpernatanta hacminin 2 katı kadar soğuk saf etanol eklenerek 4°C’de bir gece inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 4°C’de 6.000g’de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanarak EPS-b elde edilmiştir (Tallon vd. 2003). Tüm aşamaları aseptik koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde elde edilen EPS-b liyofilize edilmiş ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.5’de özetlenmiştir.

EPS’lerde total glukoz tayini: EPS-b ve EPS-r için total glukoz miktarı Dubois vd. (1956) tarafından önerilen yöntem kullanılarak ve glukoz standartı dikkate alınarak belirlenmiştir. Standart eğri elde etmek için kullanılan glukoz konsantrasyonları çizelge 3.2’de sunulmuştur. Örneklerle ve glukoz standartlarına 1 mL hacimde % 5 fenol ve 5 mL % 96 konsantrasyonda sülfirik asit eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında ardından 37°C’de 15 dakika inkübasyon uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben meydana gelen renk değişimi 490_{nm} dalga boyunda gerçekleştirilen spektrofotometrik okumalar neticesinde belirlenmiştir.



Şekil 3.4 EPS-r eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)



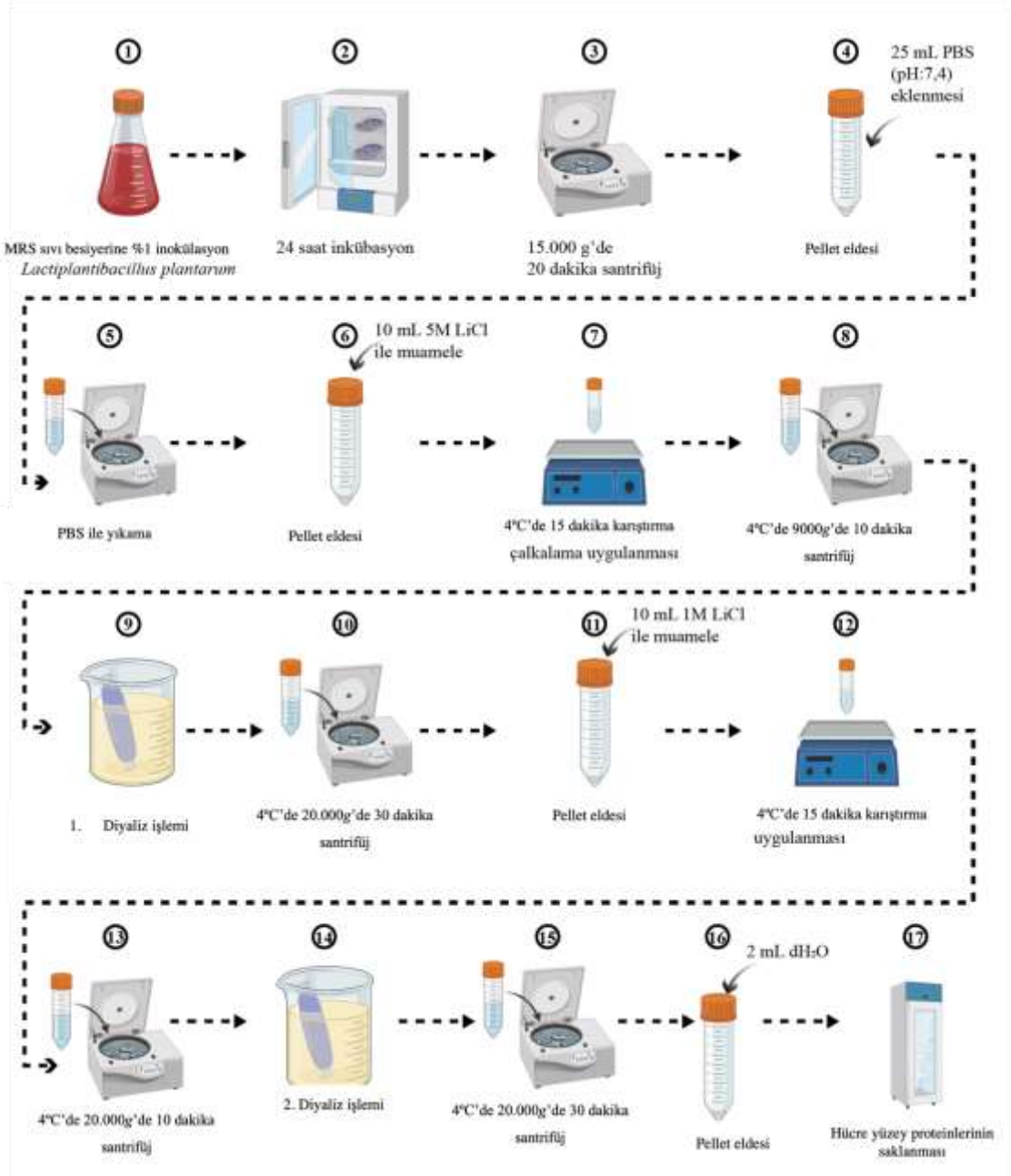
Şekil 3.5 EPS-b eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

Çizelge 3.2 Glukoz standartı için kullanılan konsantrasyonlar

Stok Glukoz Çözeltisi (1000 µg/mL)	dH ₂ O	Toplam Konsantrasyon (µg/mL)
800 µL	200 µL	800
600 µL	400 µL	600
400 µL	600 µL	400
200 µL	800 µL	200
0 µL	1000 µL	0
1000 µL	0 µL	1000

3.2.1.5 Hücre yüzey proteinlerinin eldesi

Hücre yüzey proteinlerinin eldesi amacıyla EIR/IF-1 suşu % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 4°C'de 15.000g'de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pellet 2 kez 25 mL soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS; % 0,12 K₂HPO₄, % 0,022 Na₂HPO₄, % 0,85 NaCl pH: 7,4) ile yıkanmıştır. Ardından 10 mL 5 M lityum klorür (LiCl, Merck) çözeltisi eklenerek 4°C'de 15 dakika karıştırılmıştır. 4°C'de 9000g'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve elde edilen süpernatant 12.000 spektra/por çapına (MWCO) sahip moleküler gözenekli membrana (Sigma) aktararak 24 saat boyunca soğuk distile suya (dH₂O) karşı diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Uygulanan diyaliz işleminde ilk 8 saat içerisinde her 2 saatte bir su değişimi yapılmıştır. Diyaliz edilen çözelti 4°C'de 20.000g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellete 10 mL 1 M LiCl çözeltisi eklenmiş ve ardından 4°C'de 15 dakika karıştırılmıştır. 4°C'de 20.000g'de 10 dakika santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatant diyaliz membranına aktararak tekrar 24 saat diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyaliz edilen çözelti 4°C'de 20.000g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir (Nataraj vd. 2020). Tüm aşamaları aseptik koşullarda gerçekleştirilen analizler neticesinde elde edilen hücre yüzey proteinleri liyofilize edilmiş ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar şekil 3.6'da özetlenmiştir.



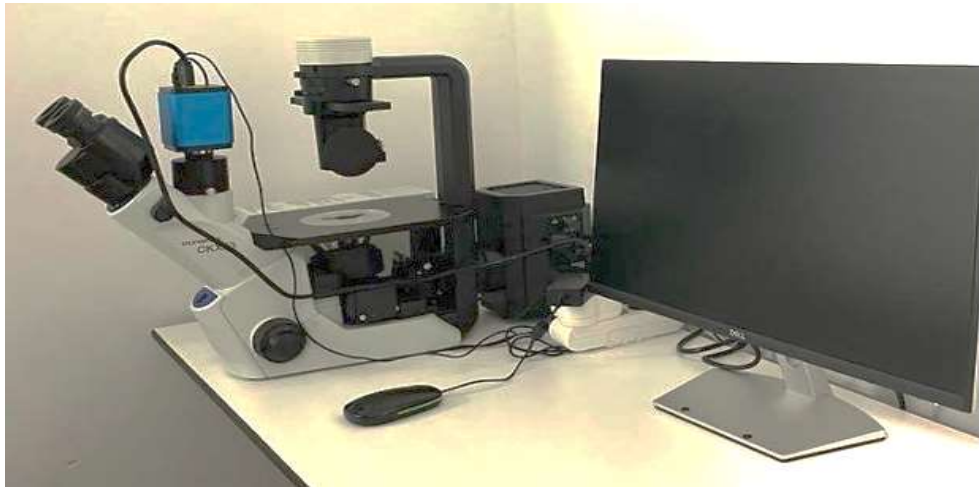
Şekil 3.6 Hücre yüzey protein eldesinin şematik gösterimi (BioRender programı ile çizilmiştir)

Elde edilen hücre yüzey proteinlerinin total protein tayini ise BCA Protein Test Kiti (Smith yöntemi; TaKaRa) kullanılarak ve üreticinin önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Analiz için 2mg/mL olan BSA stok çözeltisinden 125 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg ve 2000 µg/mL olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlanmıştır. 96 doku kültür plaka kuyularına hücre yüzey protein solüsyonundan 25 µL eklenmiş ve üzerine 200 µL BCA reaktifi ilave edilmiştir. 37°C’de 30 dakika inkübasyonu takiben BCA reaktifinin bakır iyonları ve proteinlerin peptit bağları arasında oluşan reaksiyon neticesinde mor renkte bir son ürün elde edilmiştir. Meydana gelen renk değişimi ise 562_{nm} dalga boyunda gerçekleştirilen spektrofotometik okumalar neticesinde belirlenmiştir.

3.2.2 Postbiyotik mediatörlerin immünomodülatör etkilerinin belirlenmesi

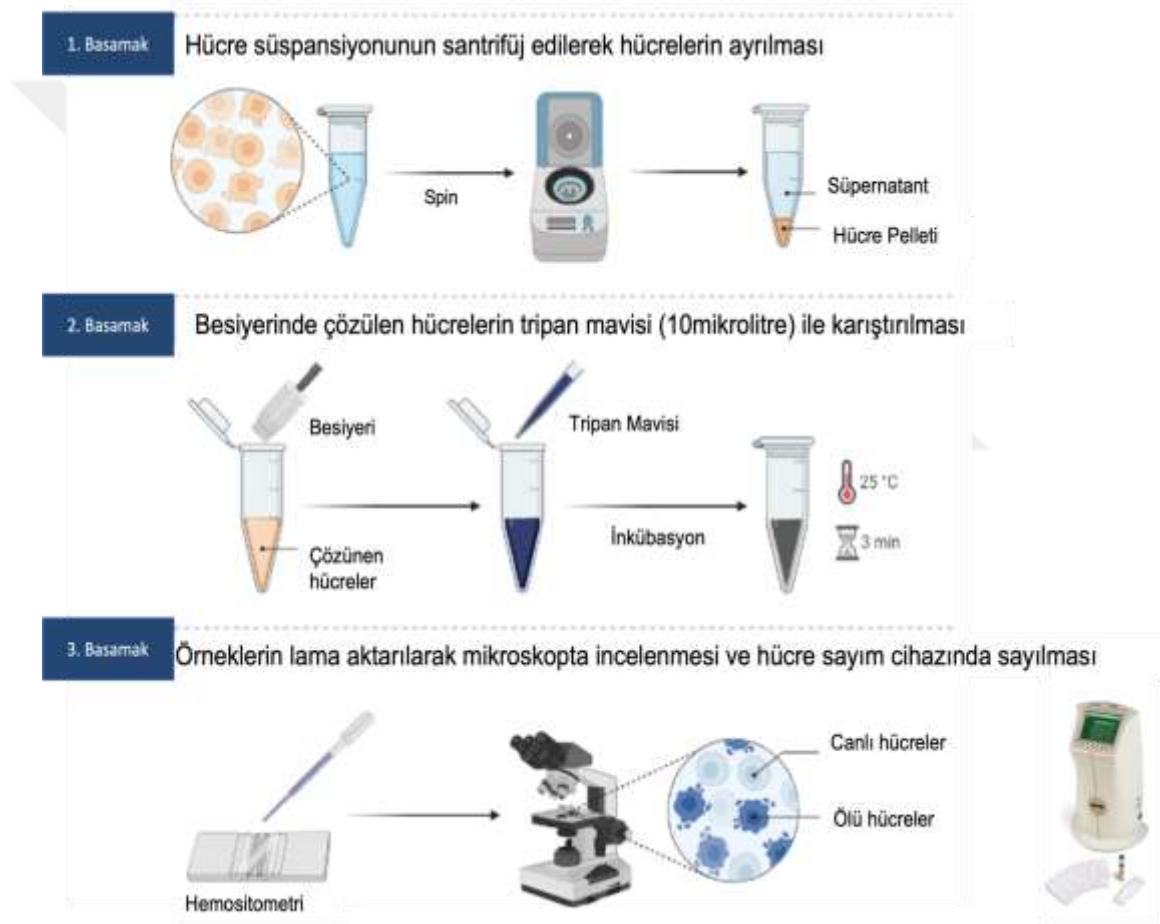
3.2.2.1 PM’lerin iPDLF hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi

Bölüm 3.1.2’de belirtildiği şekilde T75 flasklar içerisinde kültüre edilen hücreler 1 hafta boyunca 3 günde bir besi ortamları tazelenerek 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ ve % 80-90 bağıl nem koşullarını sağlayan bir inkübatörde çoğaltılmıştır. Belirli aralıklara invert faz kontrast mikroskopta (Olympus, Şekil 3.7) incelenen ve % 85-90 doluluğa (confluency) ulaştığı tespit edilen hücreler üzerinden besiyeri alınmış ve 10 mL PBS tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 İvert faz kontrast mikroskop görüntüsü

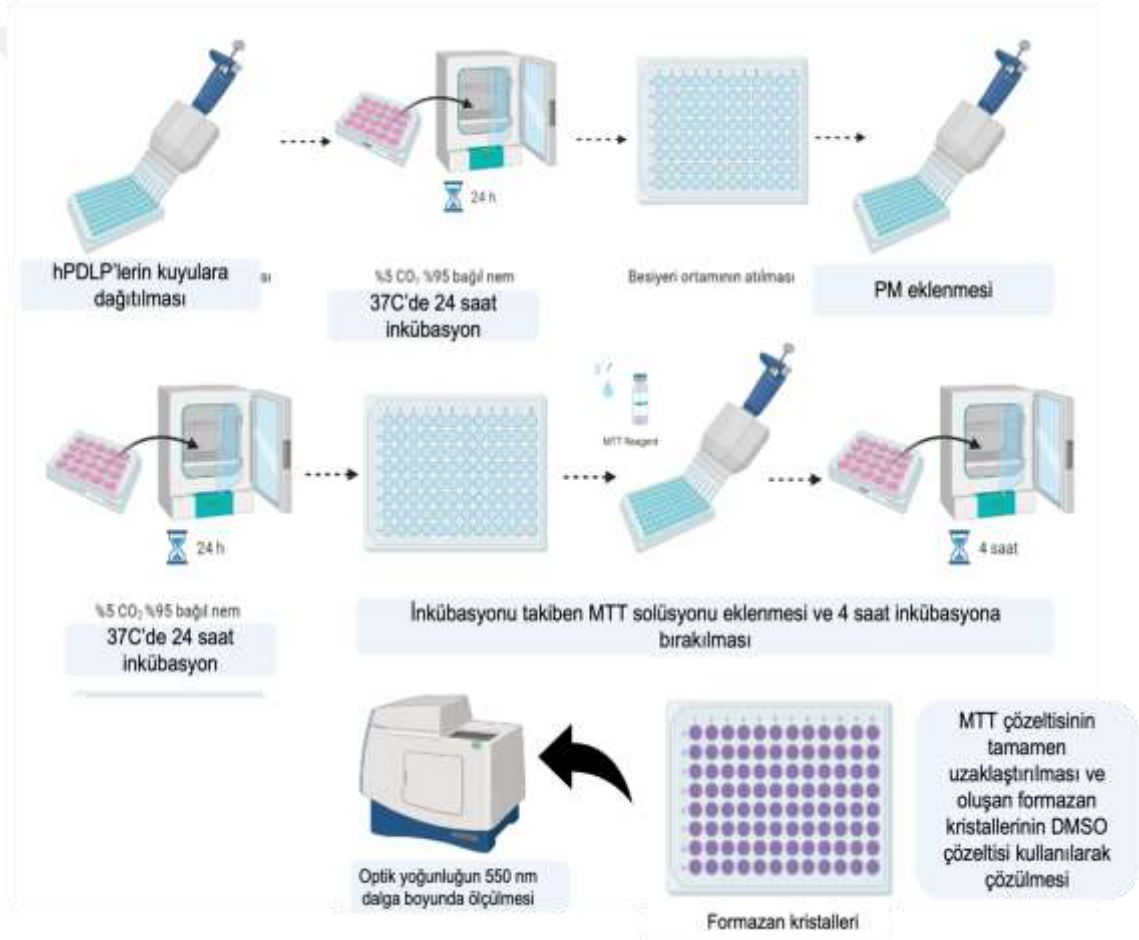
Yıkama sonrasında flask içerisinde PBS alınarak 2-3 mL % 0,25 Tripsin-53 mM EDTA eklenmiş ve 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. 3-5 dakika inkübasyonun ardından eklenen Tripsin-EDTA'nın 2 katı hacminde besiyeri kullanılarak flask içerisindeki hücreler toplanmış ve 200g'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılarak hücre pelleti 1 mL besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Hücreler otomatik hücre sayım cihazında (Bio-Rad) tripan mavisi ile boyama neticesinde (Şekil 3.8) sayılmış ve 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu doku kültür plakalarına ekilerek tekrar inkübatöre alınmıştır.



Şekil 3.8 Hücre sayım yönteminin temel basamakları (BioRender programı ile çizilmiştir)

24 saatlik inkübasyon süresini takiben hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri tamamıyla atılmış ve farklı konsantrasyonlarda HBE (10-1000 µg/mL), EPS-r (10-1000 µg/mL), EPS-b (10-1000 µg/mL), hücre lizatı (0,1-1000 µg/mL), hücre yüzey proteinleri (0,1-100 µg/mL) e inaktive edilmiş hücre (10⁶-10¹⁰ kob/mL) içeren besiyeri ayrı ayrı ve 3 tekrar

olacak şekilde kuyulara ilave edilmiştir. PM içermeyen kuyular pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 24 saat inkübasyon süresini takiben hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen uzaklaştırılmış, hücreler steril PBS (pH 7,4) ile birkaç tur nazikçe yıkanmış ve MTT testi ile hücre canlılıkları belirlenmiştir (Şekil 3.9). Bu kapsamda her bir kuyuya 10 µL MTT solüsyonu (5 mg/mL, Serva) eklenmiş ve 4 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra solüsyon uzaklaştırılmıştır. Proliferasiyona uğrayan hücrelerde artan dehidrojenaz enzim aktivitesi neticesinde tetrazolyum tuzunun (sarı renk) oluşturduğu formazan (mor) kristalleri DMSO (Sigma) ile çözülmüş ve oluşan rengin optik yoğunluğu 550_{nm} dalga boyunda mikroparka okuyucuda (BioTek, Epoch) ölçülmüştür (Denizot vd. 1986).



Şekil 3.9 MTT yönteminin şematik özeti (BioRender programı ile çizilmiştir)

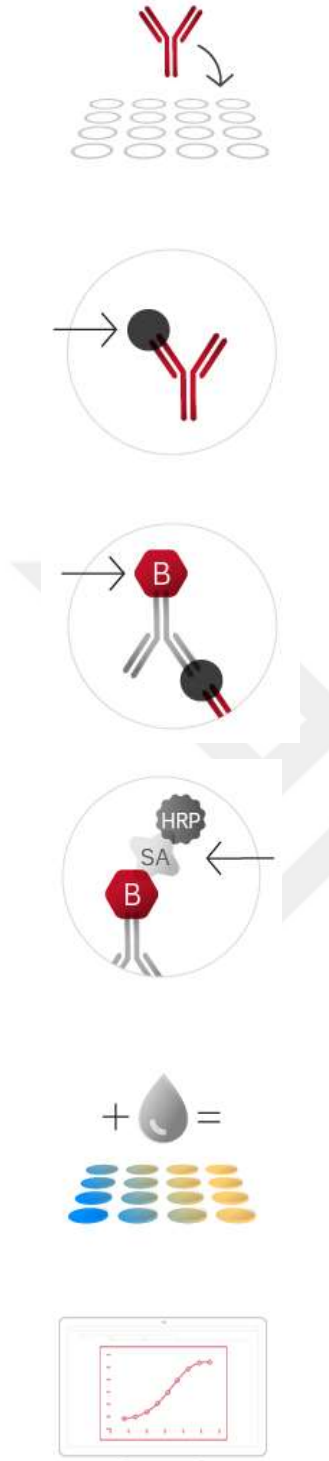
3.2.2.2 PM'lerin iPDLF hücre bağıklık cevabı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

Bu aşamada öncelikli olarak hedef hücreler üzerinde inflamasyonu indükleyebilmek amacıyla *P. gingivalis* bakterisine ait LPS (Sigma) kullanılmıştır. iPDLF hücreleri 100.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu doku kültür plakalarına dağıtılmıştır. LPS'in toksik olmayan dozunu belirlemek amacıyla öncelikle 1 µg/mL, 5 µg/mL ve 10 µg/mL LPS konsantrasyonları ile stimülasyon gerçekleştirilmiş ve 24 saat inkübasyon takiben MTT analizi ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

İkinci aşamada ise; LPS'nin sitotoksik etki sergilemeyen en yüksek dozu ile PM'ler birlikte inkübe edilmiş ve 24 saat inkübasyon sonrasında hücre süpernatantlarındaki interlekin (IL)-10, IL-8 ve interferon (IFN)-gama seviyeleri ELIZA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, MabTech) kullanılarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen tüm ELIZA aşamaları şekil 3.10'da özetlenmiştir.

3.2.3 İstatistiksel analizler

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm analizler 3 teknik tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve GraphPad (GraphPad Prism v.3.0, GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Tukey testi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiş ve tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık derecelerini belirlemek için Prism'in sınıflandırma sistemi kullanılmıştır ($0.0001 < p < 0.001$ = son derece anlamlı***, $0.001 < p < 0.01$ = çok anlamlı**, $0.01 < p < 0.05$ = anlamlı* ve $p > 0.05$ = anlamlı değil, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).



1. 96 kuyulu mikropalaklar (Immulon 2HB, Thermo Labsystems) 1XPBS'de hazırlanan IL-10 (1 µg /mL), IL-8 (0.6 µg /mL) ve IFN-γ (1 µg /mL) monoklonal antikorları (MabTech, 100 µL) ile kaplanmış ve bir gece +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından antikorları içeren karışım dökülmüş ve plaka kuyularına 200 µL bloklayıcı tamponu (% 0.1 Bovin serum albumin ve % 0.05 Tween 20 içeren 1XPBS) eklenerek 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Yıkama işlemi ise yıkama tamponunda (500 mL 10XPBS, 2.5 mL Tween 20 ve 4.5 L dH₂O) beş kez 5'er dakika aralıklarla gerçekleştirilmiş ve ardından suda yıkanan plakalar kurutulmuştur.

2. Plaka kuyularına PM'ler ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar eklenmiş ve 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

3. Biotinlenmiş ikincil tespit antikorları T-hücre tamponunda (500 mL 1X PBS, 0.25 mL Tween 20 ve 25 mL % 5 FCS), 1:1000 seyreltme oranında hazırlanmış ve 100 µL olacak şekilde kuyulara eklenerek oda ısısında 2 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

4. Yıkama işleminin ardından T-hücre tamponunda 1:1000 seyreltme oranında hazırlanmış streptavidin alkalın fosfataz (SA-AKP; Thermo Scientific) enzimi 100 µL olacak şekilde kuyulara eklenerek oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

5. Para-nitrofenil fosfat (Pnpp; ThermoScientific) 100 µL olacak şekilde substrat olarak kuyulara eklenmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucunda sarı renk oluşumu takip edilmiş ve optik yoğunluk otomatik olarak mikropalaka okuyucuda (Molecular Devices, SoftmaxPro Software, V5) 405_{nm}'de, standart dördümlü parametre satürasyonuna gelene kadar okunmuştur.

6. Her bir sitokinin miktarı rekombinant sitokinleri bilinen miktarlarını içeren standartın kullanımı neticesinde elde edilmiştir.

Şekil 3.10 ELIZA yönteminin temel aşamalarının şematik özeti

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Postbiyotik Mediatörlerin Miktarları

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen farklı aşamalar neticesinde *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 suşundan elde edilen çeşitli PM'ler hücre kültürü çalışmaları için hazırlanmıştır (Şekil 4.1). Ana stok konsantrasyonu 500 mg/mL olacak şekilde steril dH₂O ile sulandırılan HBE 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve çalışmalara dahil edilmiştir. Isı ile inaktive edilen hücreler inaktivasyondan önce mikrobiyolojik yöntemler neticesinde sayılmış ve 10¹¹ kob/mL olarak belirlenmiştir. İnaktiavsyonu takiben gerçekleştirilen ekimler neticesinde ise sıvı kültürde ve katı ortamda herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Bu sonuç, hazırlanan inaktive hücre solüsyonunda canlı hücre kalmadığını ve inaktivasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Benzer sonuçlar lize edilen hücreler de gözlenmiş olup hücrelerin lize olduğu doğrulanmıştır.

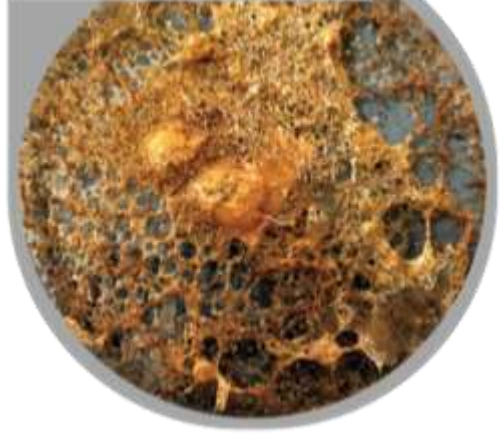
EIR/IF-1 suşundan ekstrakte edilen çeşitli EPS'lerin glukoz miktarı hazırlanan standart eğri (Şekil 4.2) kullanılarak hesaplanmıştır. Standart eğri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz çözeltilerinde meydana gelen renk değişiminin (Şekil 4.3) 490_{nm} dalga boyunda gerçekleştirilen spektrofotometik okumaları neticesinde oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, EPS-b'nin 140,71±2,4 mg/L EPS-r'nin ise 741,63±18,2 glukoz içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

EIR/IF-1 suşundan izole edilen hücre yüzey proteinlerinin total protein miktarı BCA kiti kullanılarak analiz edilmiş ve hazırlanan standart eğri (Şekil 4.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler neticesinde hücre yüzey proteinlerinin toplam protein miktarı 1,1±0,4 mg/ml olarak belirlenmiştir.

EPS-b / 9 mg



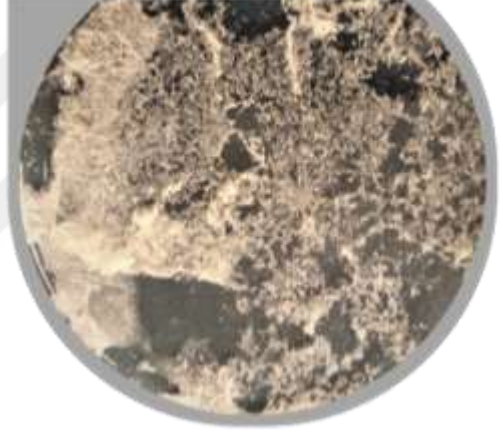
HBE / 3 gr



EPS-r / 120 mg



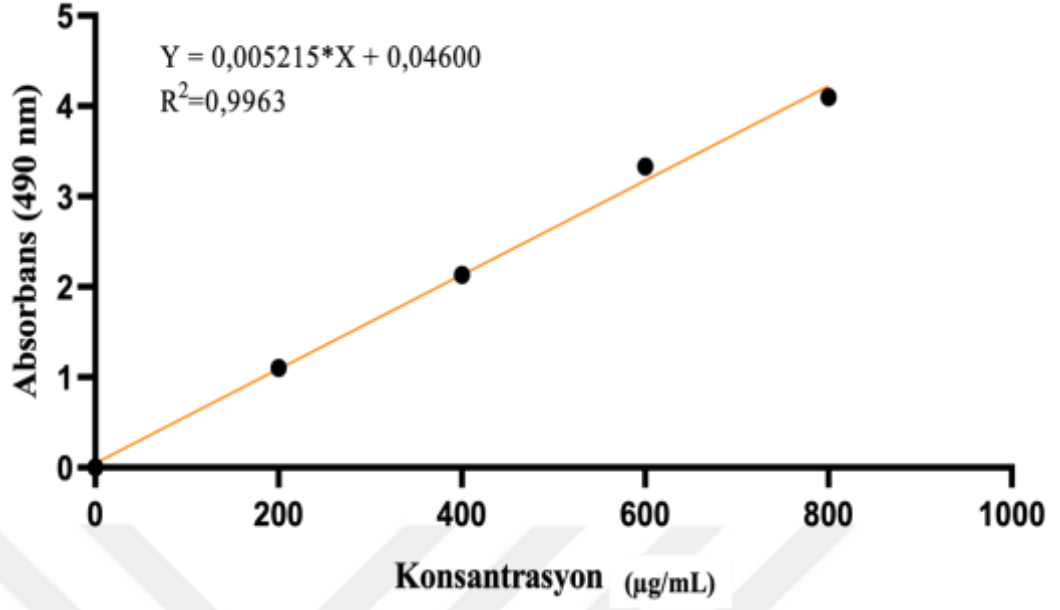
Hücre lizati / 40 mg



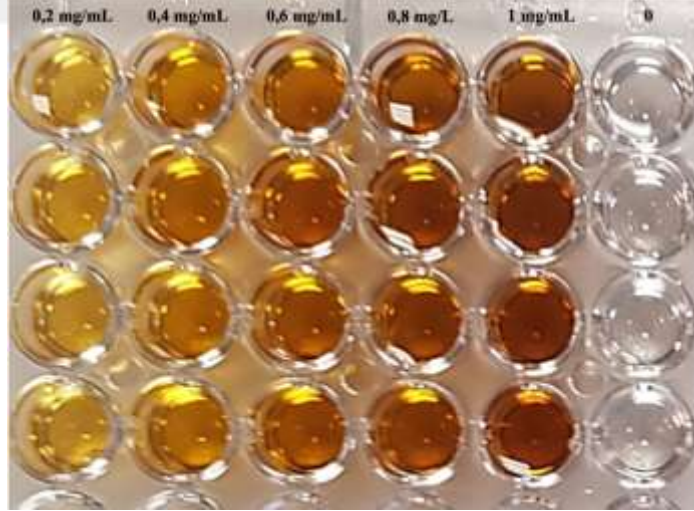
**Hücre yüzey
proteini / 10 mg**



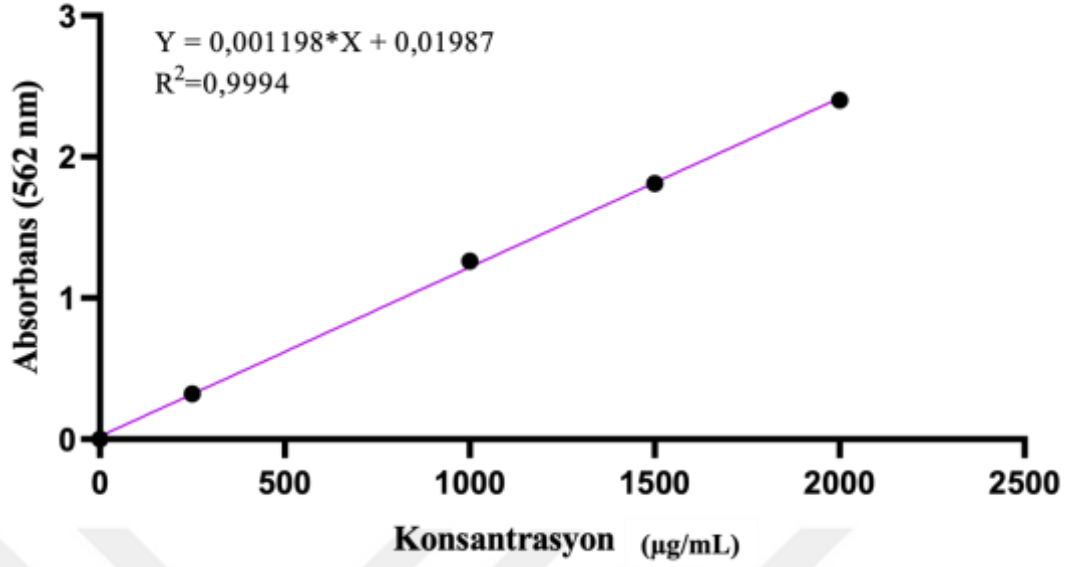
Şekil 4.1 Liyofilize olarak elde edilen PM'lerin genel görüntüleri ve miktarları



Şekil 4.2 Glukoz standart eğrisi



Şekil 4.3 Farklı glukoz konsantrasyonlarında meydana gelen renk değişimi (Analiz 4 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir)



Şekil 4.4 BCA standart eğrisi

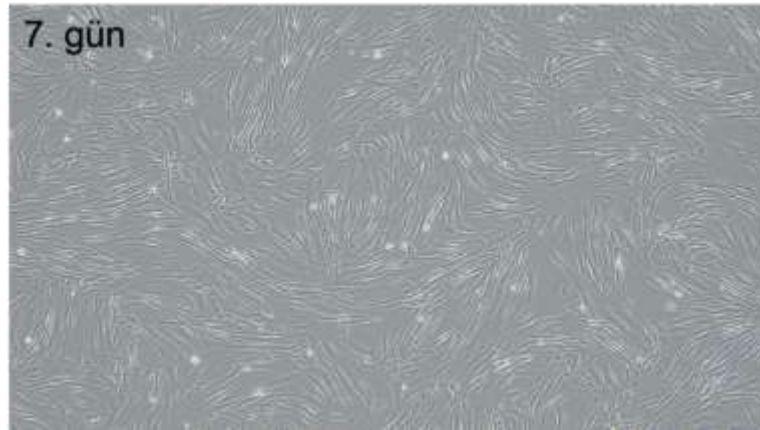
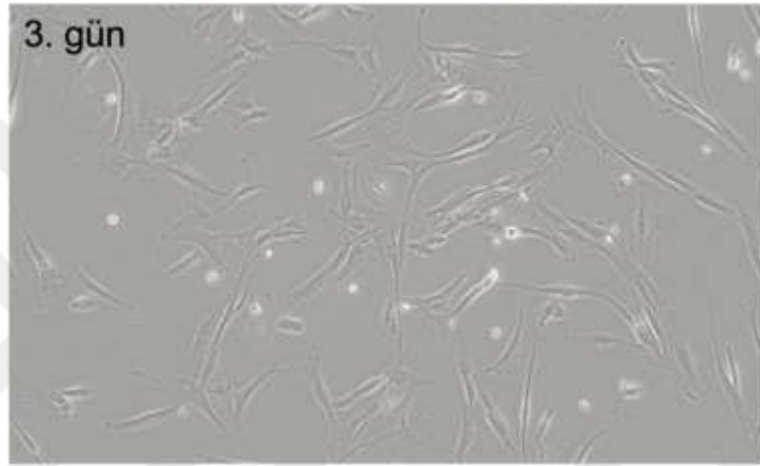
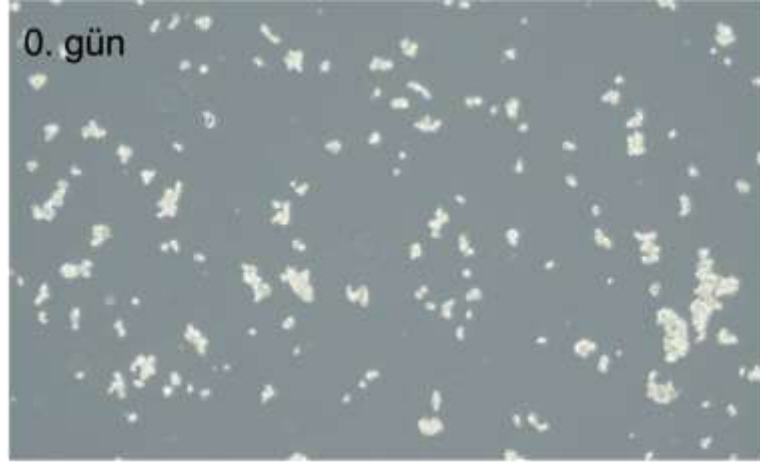
4.2 Postbiyotik Mediatörlerin Sitotoksik Olmayan Dozlarının Seçimi

4.2.1 iPDLF hücrelerinin kültürü

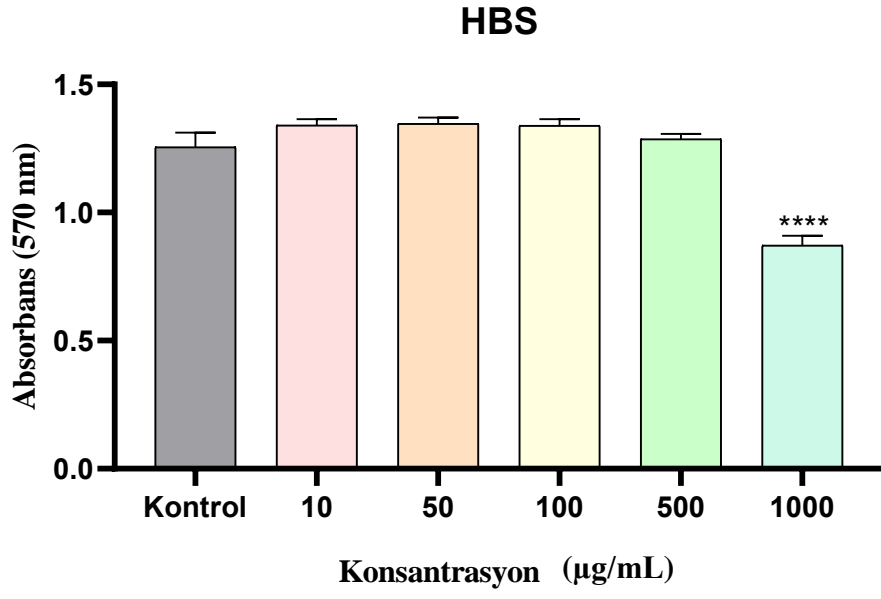
-86°C’de saklanan hücreler kültüre edilmiş ve sitotoksosite çalışmalarında kullanılmak üzere pasajlanmıştır. iPDLF hücrelerinin mikroskopik görüntüleri şekil 4.5’de sunulmuştur.

4.2.2 PM’lerin iPDLF hücre canlılığı üzerine etkileri (Sitotoksosite)

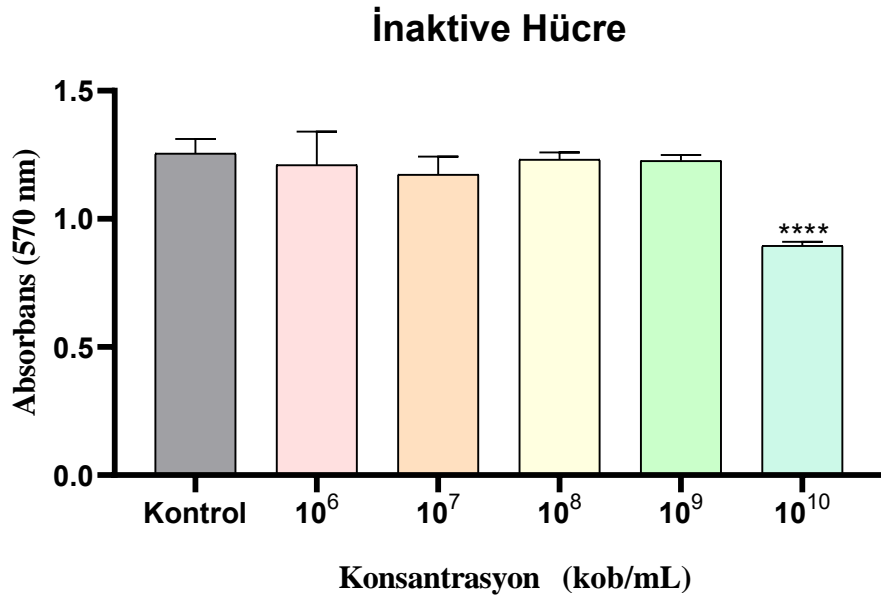
Mikroskopik sayımlar neticesinde 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu doku kültür plakalarında hazırlanan hücreler değişen konsantrasyonlarda PM’ler ile 24 saat birlikte inkübe edilmiş ve MTT testi neticesinde kontrol gruplarından elde edilen absorbans değerleri ile test gruplarından elde edilen absorbans değerleri dikkate alınarak hücre canlılığı analiz edilmiştir. MTT verileri değerlendirildiğinde; HBS, EPS-b, EPS-r ve hücre lizatının 1000 µg/mL dozları ile hücre yüzey proteinlerinin 100 µg/mL dozu, inaktive hücrelerin ise 10^{10} kob/mL dozu hücreler üzerinde toksik etki sergilemiştir (Şekil 4.6-4.11).



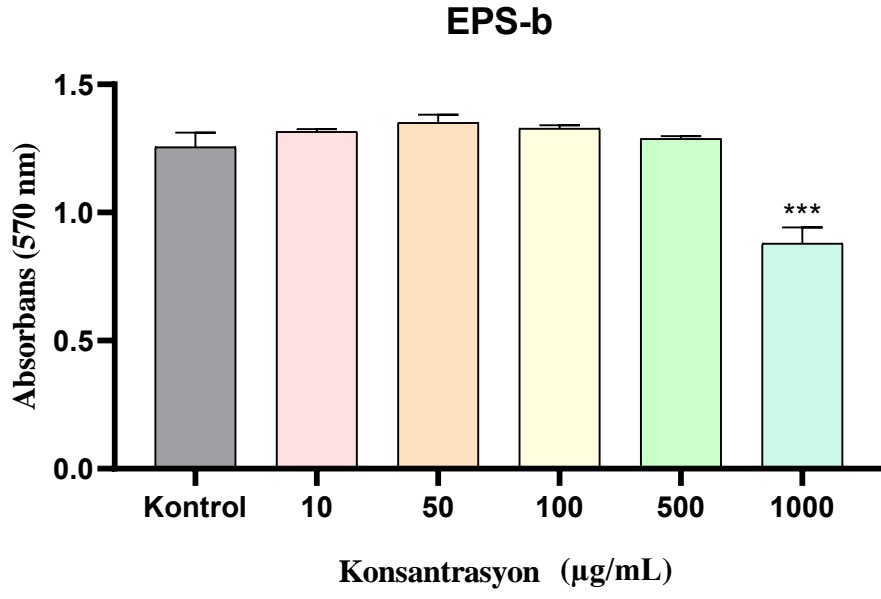
Şekil 4.5 iPDLF hücrelerinin mikroskop görüntüleri (4x ve 40x)



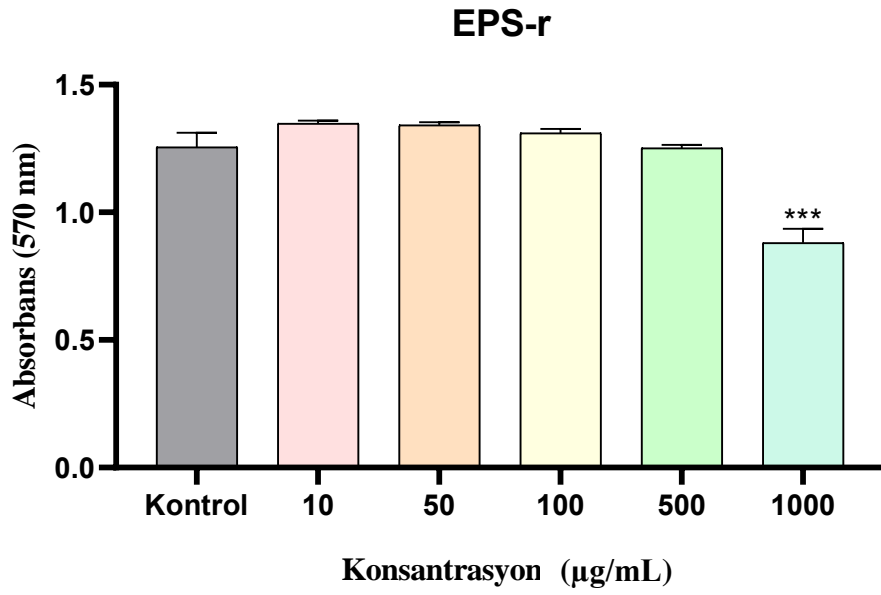
Şekil 4.6 HBS'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi



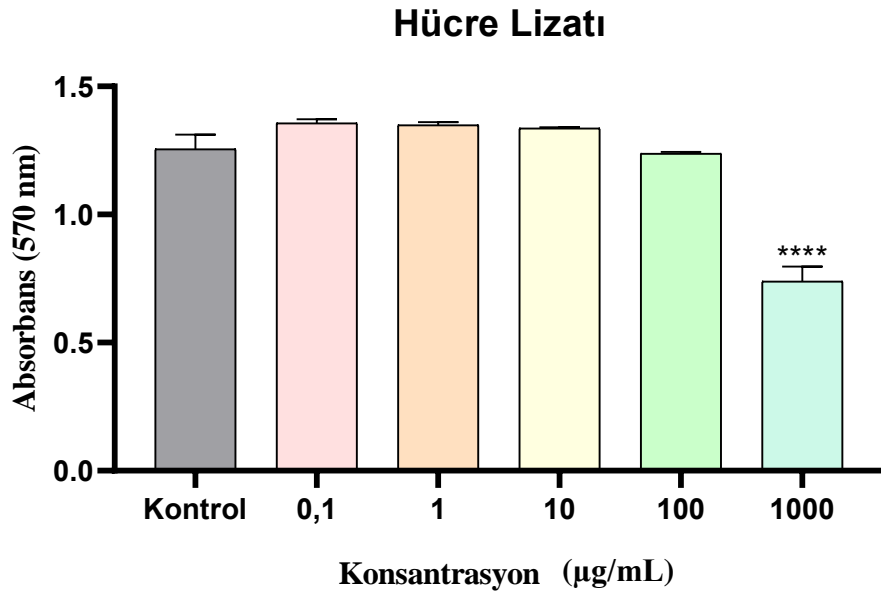
Şekil 4.7 İnaktive hücrelerin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi



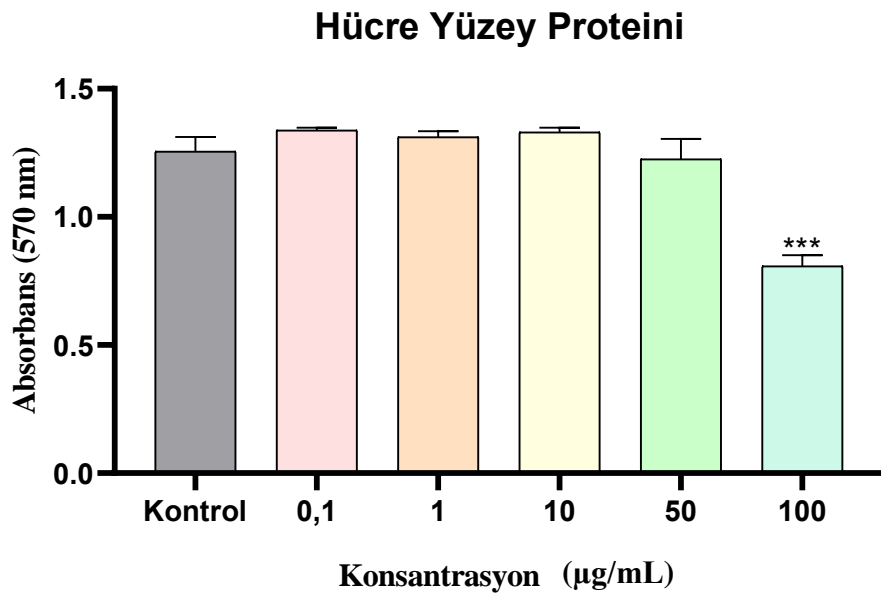
Şekil 4.8 EPS-b'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi



Şekil 4.9 EPS-r'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi



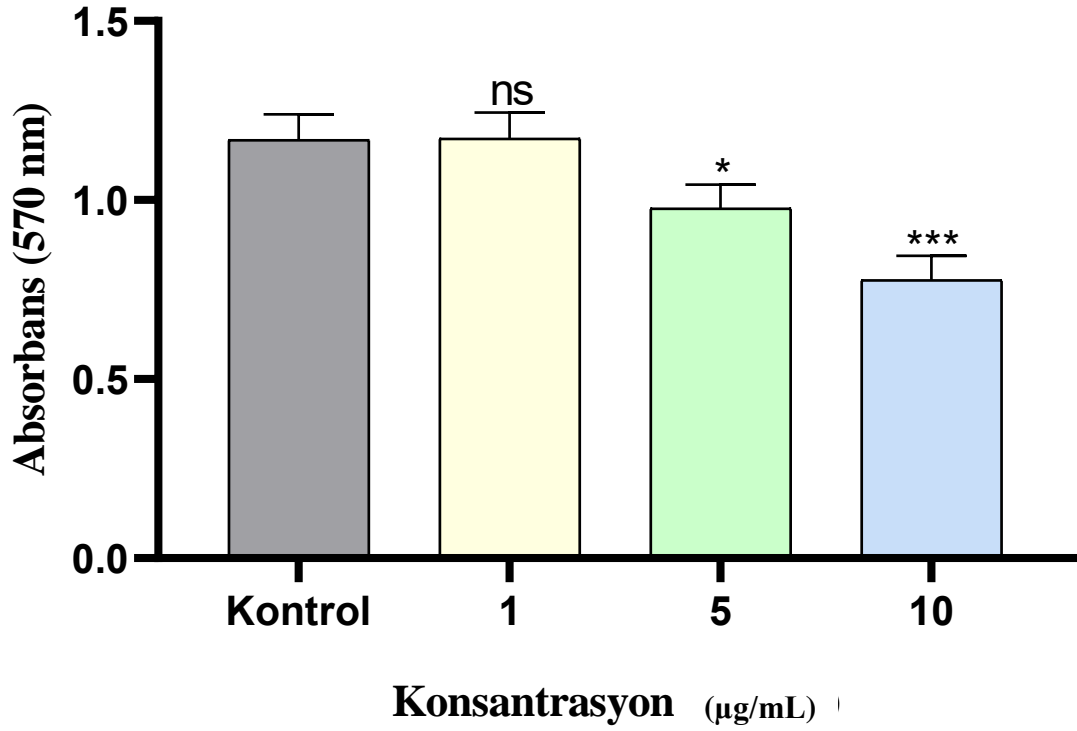
Şekil 4.10 Hücre lizatının iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi



Şekil 4.11 Hücre yüzey proteinlerinin iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi

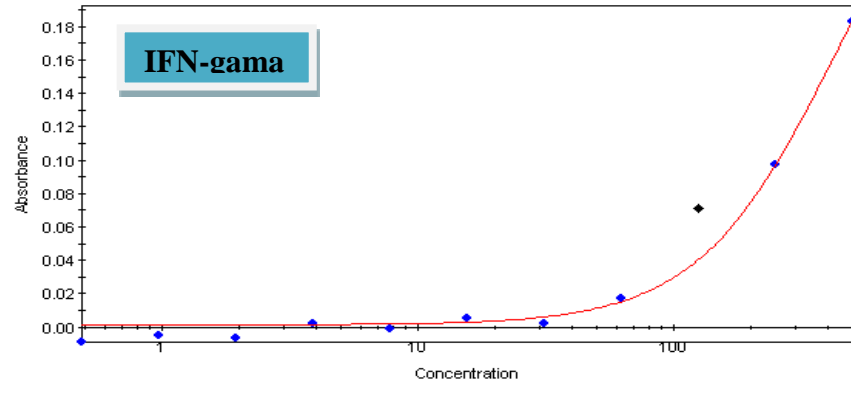
4.3 Postbiyotik Mediatörlerin iPDLF Hücreleri Üzerindeki İmmunomodülatör Rolü

Bu aşamada öncelikli olarak iPDLF hücrelerinde inflamasyonu indükleyebilmek amacıyla kullanılan *P. gingivalis* suşuna ait LPS'nin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine olan etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen veriler neticesinde çalışmaya dahil edilen LPS'nin 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığı belirlenmiş olup sitotoksik etki göstermediği belirlenen doz olarak 1 µg/mL hücre stimülasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir.

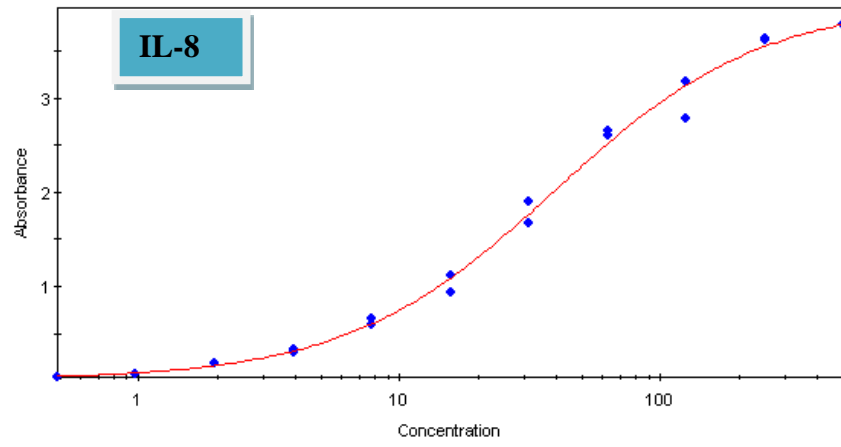


Şekil 4.12 *Porphyromonas gingivalis*'e ait LPS'nin farklı konsantrasyonlarının iPDLF hücre canlılığı üzerine olan etkisi

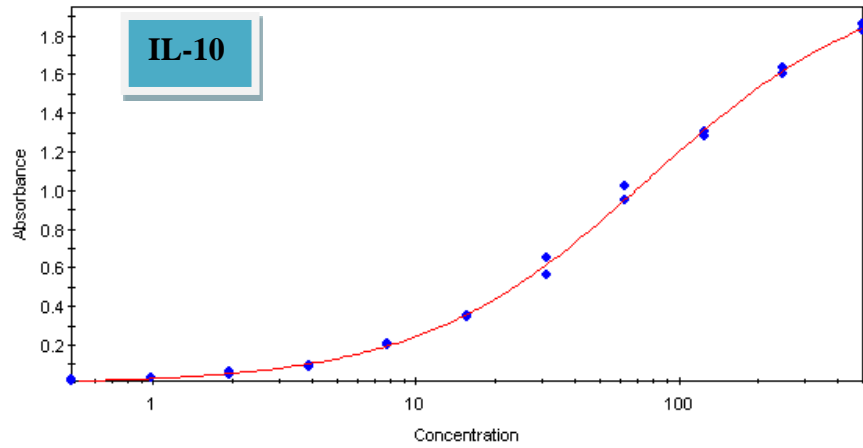
İkinci aşamada iPDLF hücreleri LPS'nin sitotoksik etki sergilemeyen ideal dozu ve PM'lerin seçilen konsantrasyonları ile birlikte inkübe edilmiş ve 24 saat inkübasyon sonrasında hücre süpernatantlarındaki IL-10, IL-8 ve IFN-gama seviyeleri ELIZA ile belirlenmiştir. Analiz neticesinde elde edilen ve rekombinant sitokinlerin bilinen miktarlarını içeren standartların kalibrasyon eğrileri şekil 4.13'de sunulmuştur.



4 Parameter ($y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$)
 A=0.3208 B=-1.6211 C=421.9642 D=0.0014, R-Square = 0.9991



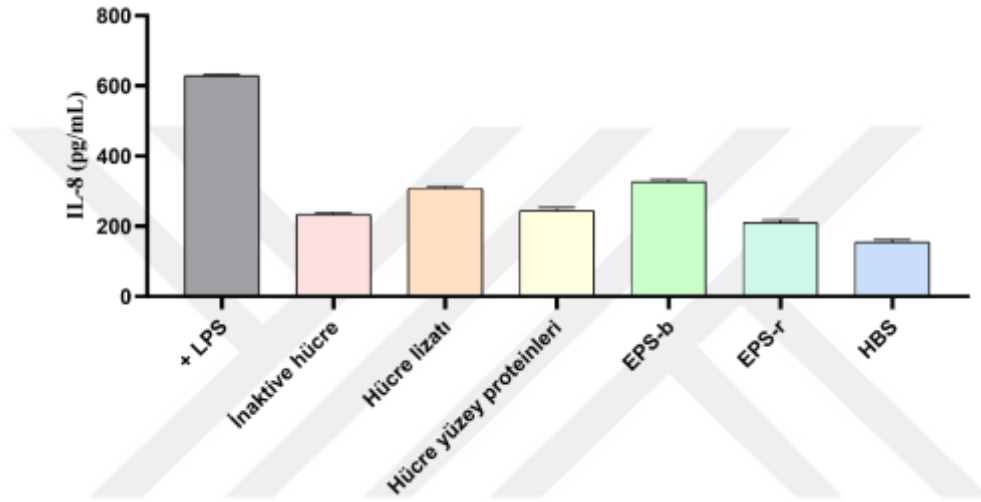
4 Parameter ($y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$)
 A=4.0128 B=-1.0905 C=39.0817 D=0.0134, R-Square = 0.9940



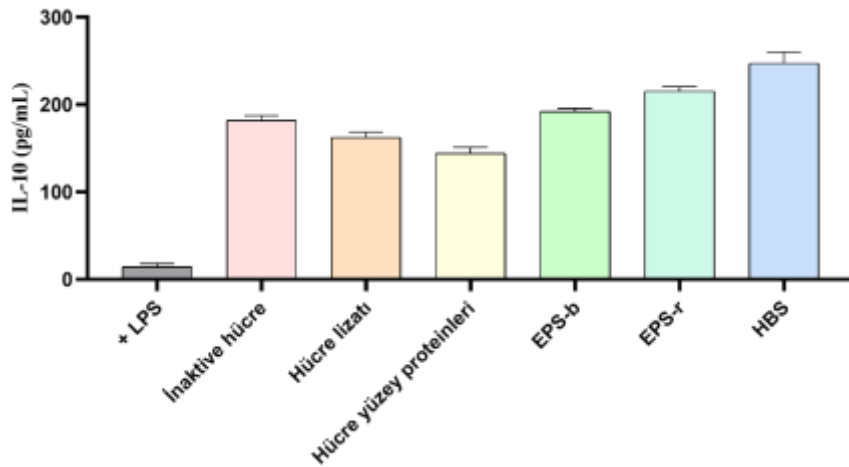
4 Parameter ($y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$)
 A=2.1134 B=-1.0024 C=76.0174 D=0.0011, R-Square = 0.9987

Şekil 4.13 Rekombinant sitokinlerin bilinen miktarlarını içeren standartlara ait kalibrasyon eğrileri

Elde edilen veriler IL-8 açısından değerlendirildiğinde, *P. gingivalis*'e ait LPS'nin IL-8 üretimini indüklediği, PM'lerin ise bu etkiyi azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Anti-inflamatuvar özellik sergileyen IL-10 üretiminin ise PM'ler tarafından doza bağlı olarak indüklendiği belirlenmiştir (Şekil 4.15). Ancak, IFN-gama üretiminde tespit edilebilir bir sinyal saptanamamıştır. Stimülasyon yapılmayan hücrelerde de tüm sitokinler açısından herhangi bir sinyal tespit edilmemiştir.



Şekil 4.14 PM'lerin *P. gingivalis* LPS'si ile indüklenmiş iPDLF hücrelerinin IL-8 üretimine etkisi



Şekil 4.15 PM'lerin *P. gingivalis* LPS'si ile indüklenmiş iPDLF hücrelerinin IL-10 üretimine etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Değişik nedenlere bağlı olarak oluşan, sadece diş dokusu ile kalmayıp vücudun birçok sistemine de yansıyan ve insan hayatını olumsuz yönde etkileyen periodontal hastalıklar, tüm dünya genelinde en yaygın ve en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Genel olarak periodontal hastalıklar disbiyotik bir subgingival biyofilm tarafından belirlenen kronik, enfeksiyöz ve inflamatuvar bir patolojik olgu olarak tanımlanmaktadır. Gelişimi, ileri düzeyde bağ ataşmanı kaybı ve alveoler kemik rezorpsiyonu ile dişlerin destek dokularının yıkımına yol açabilmektedir. Periodontal hastalıkların etiopatolojisi çok faktörlü olup dental biyofilmlerdeki mikroorganizmalar ile konakçının immüno-inflamatuvar yanıtı arasındaki bir dizi karmaşık bağlantı ile özetlenebilmektedir. Bununla birlikte, periodontal hastalığın klinik ve immünolojik yönleri şiddetli periodontitis ile doğrudan ilişkili olan diyabet, sigara, alkol tüketimi ve stres gibi sistemik faktörler ile de ilişkilendirilmektedir. Tüm bu sistemik etkileri ile birlikte periodontal hastalıkların genel sağlığı etkilemede ve sürdürmede kilit bir rol oynadığı ve yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (Tomina vd. 2022).

Porphyromonas gingivalis enfeksiyonu, konakçının immün-inflamatuvar yanıtlarını modüle eden ve normal hücre döngüsünün homeostazını bozarak periodontal doku yıkımına yol açan önemli bir oral patojendir. İnsan periodontal ligament fibroblastları (iPDLF) ise konakçı immün yanıtlarında ve periodontal doku rejenerasyonunda kilit oyuncular olarak kabul edilmektedir (Liu vd. 2015). Bu çalışmanın amacı, *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 bakterisinden elde edilen postbiyotik mediatörlerin (HBE, EPS-b, EPS-r, hücre lizatu, hücre yüzey proteini, inaktive edilmiş hücre) *P. gingivalis* enfeksiyonunun iPDLF'lerde oluşturduğu inflamatuvar sitokin üretimi üzerindeki etkilerini keşfetmektir. Literatür araştırmaları incelendiğinde, probiyotik özellik sergileyen bakterilerin periodontal hastalıklarda inflamasyonu önleyebildiğine yönelik çalışmaların olduğu belirlenmiştir (Zhang vd. 2022). Probiyotiklerin hedef dokudaki bu sistematik etkilerin ise immünolojik yollar aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Minocha 2009). Mukozada artan IgA üretimi sonucunda uyarılmış makrofaj aktivitesi ve fagositoz gibi immünolojik etkiler

gözlemlenmektedir. Bu durum mukozada bakteriyel translokasyonu önleyebilmek adına önemli bir direnç nedeni olmaktadır (Ezendam ve Van Loveren 2006). Probiyotiklerin *Porphyromonas gingivalis* gibi önemli patojenlerin gelişimini inhibe etmeleri, alveolar kemik kaybını azaltmaları, anti-inflamatuvar etkinlikler sergilemeleri (Kobayashi vd. 2017) periodontal hastalıklar için farklı uygulamalara dahil edilebilecekleri fikrimizi desteklemektedir. Ancak, probiyotik bakterilerin oral bölgede sürekli kolonizasyon gerektirmesi ve buna bağlı olarak immünomodülasyonun değişkenlik göstermesi gibi zorlukları bulunmaktadır. Ayrıca, probiyotikler konağın mikrobiyal topluluklarının bileşimini değiştirebilmekte ve değişen mikrobiyotanın homeostazı ve disbiyozu, sırasıyla sağlığa veya hastalığa yol açabilmektedir. Bununla birlikte, yerleşik ağız mikrobiyotasına eksojen probiyotik bakterilerin kolonize olması da oldukça zor olmaktadır. Canlı hücrelerin hedef lokasyonda kullanımı oldukça düşük olsa da sepsis gibi riskleri, ya da hücre canlılığı gibi teknik problemleri beraberinde getirebilecektir (Chen vd. 2020). Bu nedenle, probiyotik ilişkili sınırlamalar üstesinden gelinmesi gereken önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu çözülmeyi bekleyen ve halen tartışma yaratan güncel sorunların üstesinden gelebilmek adına, canlı probiyotiklerin olumlu etkilerinde kilit rol oynayan probiyotik kaynaklı PM'lerin periodontal inflamasyonun önlenmesinde/giderilmesinde kullanımına yönelik alternatif bir saha oluşmaktadır. Literatür bilgileri, periodontal inflamasyonun postbiyotik mediatörler ile önlenmesi veya postbiyotik mediatörlerin inflamasyondaki rolleri hakkında çok fazla çalışmanın mevcut olmadığına işaret etmektedir (Moraes vd. 2022).

PM kavramı, farklı biyolojik yolları etkileyerek mikrobiyota üyelerinin faydalı etkilerine aracılık eden çeşitli biyo-aktif metabolitler (mediatörlerin) için kullanılmaktadır. Aynı zamanda hücre bağımsız süpernatant, metabiyotik ve biyojenik olarak da tanımlanan postbiyotik mediatörler; Tsilingiri ve Rescigno'ya (2013) göre mikroorganizma tarafından salınan veya mikroorganizmanın metabolik aktivitesi yoluyla üretilen, konak üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak yararlı bir etki sergileyen herhangi bir maddeyi veya sinerjistik etki sağlayabilen birden çok maddeyi içerebilmektedir. Bu maddelerin konakçıya faydalı etki sağlayan ve probiyotik tanımını karşılamayan tüm biyo-aktif bileşenleri içerebileceği varsayılmaktadır. PM'ler konakçı üzerinde anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-hipertansif, hipokolestrolemik, antioksidan ve

immünomodülatör etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (Teame vd. 2020). Bu özellikler mikrobiyota homeostazını ve konakçı metabolik ve sinyal yollarını olumlu bir şekilde etkilemektedir (Marzec ve Feleszko 2020).

Periodontal hastalıkların oluşumunda önemli bir role sahip olan diş plağı etkeni mikroorganizmalar; biyofilm üretimi neticesinde dental plak oluşumuna katkılarının yanı sıra inflamatuvar yanıtı aktive etme özelliklerinden dolayı önemli kabul edilmektedir (Liu vd. 2015). Konak cevabının bir neticesi olarak oluşan inflamasyon ise periodontal doku yıkımına yol açmaktadır. Periodontal doku yıkımında IL-6 ve TNF- α ile birlikte IL-1 β en dikkat çekici mesajcılar olarak belirtilmektedir (Ohlrich vd. 2009, Taylor 2010). PM'lerin ise inflamasyonu engellediği, $\alpha 2\beta 1$ integrin kollajen reseptörlerinin aktivasyonu ile epitelyumda *in vitro* ve *in vivo* anjiyogenezi geliştirebildiği rapor edilmektedir (Giorgetti vd. 2015, Kerry vd. 2018). HBE içerisinde bulunan kısa zincirli bir yağ asidi olan bütiratın T hücre farklılaşmasını indüklediği (Furusawa vd. 2013), *Bacillus coagulans* bakterisinden elde edilen HBE'nin anti-inflamatuvar özellikler sergilediği (Jensen vd. 2010), *B. breve* bakterisinden elde edilen HBE'nin ise enterik hücrelerin olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını indüklediği ve sonuç olarak IL-10 salgılanmasını arttırdığı, TNF- α sekresyonunu ise inhibe ettiği belirtilmiştir (Hoarau vd. 2008).

İnaktive hücreler, hücre lizati ve hücre yüzey proteinlerini içeren bir tanım olarak kullanılan paraprobiyotikler konak hücrelerle etkileşime giren efektör molekülleri içermektedir (Teame vd. 2020). *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus johnsonii* JCM 2012 ve *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 suşunun peptidoglikanının TLR2 yoluyla IL-12 üretimini baskıladığı bildirilmiştir (Shida vd. 2009). *L. salivarius* Ls33 suşundan saflaştırılmış peptidoglikanın ise IL-10 üretimini indükleyerek anti-inflamatuvar özellikler sergilediği belirlenmiştir (Fernandez vd. 2011). Çok sayıda çalışma, birçok *Lactobacillus* türünden elde edilen teikoik asitin immünomodülatör özelliğe sahip olduğunu bildirmektedir (Mohamadzadeh vd. 2011). *L. plantarum* LTA Pam2CSK tarafından indüklenen IL-8 ekspresyonunu zayıflatmış ve insan bağırsak epitel hücreleri üzerinde anti-inflamatuvar etkiler sergilemiştir (Noh vd. 2015).

Polisakkaritler, Lactobacilli dahil olmak üzere Gram pozitif yüzey bakterilerinde yaygın olarak bulunmaktadır. En çok çalışılan polisakkaritler ise ekzopolisakkaritlerdir (EPS). EPS, bakterilerin çevre ile etkileşimini kolaylaştırabilen, yapışma özelliklerine aracılık eden, patojenlere karşı koruma sağlayabilen ve ayrıca koruyucu bir tabaka görevi görebilen önemli bir bileşendir (Castro-Bravo vd. 2018, Kim vd. 2018). Literatür çalışmaları, çeşitli *Lactobacillus* türlerinden elde edilen EPS'nin sistemik ve mukozal bağışıklık yanıtlarını modüle etme kapasitesine sahip olduğunu ve doğrudan sağlığı geliştirici faydalar sağladığını ortaya koymaktadır. *L. rhamnosus* RW-9595M tarafından üretilen saflaştırılmış EPS, yüksek seviyelerde IL-10 ve düşük TNF alfa, IL-6 ve IL-12'yi indükleyerek makrofajlar üzerinde immüno-supresif etki sergilemiştir (Bleau vd. 2010). Ayrıca, EPS üreten *L. plantarum* BGCG11 suşu, anti-inflamatuvar etki göstererek EPS'nin immün baskılayıcı rolüne işaret etmektedir (Nikolic vd. 2012). *L. plantarum* 14 tarafından üretilen EPS'nin asidik fraksiyonu, enterotoksijenik *Escherichia coli*'ye yanıt olarak domuz bağırsak epitel hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-8 ve MCP-1) üretimini azaltmıştır (Murofushi vd. 2015). EPS, anti-inflamatuvar etkisinin yanı sıra bağışıklık tepkisini de uyarabilmektedir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 suşu ile fermente edilmiş yoğurttan elde edilen EPS, farelerde IFN- γ üretimini indüklemiş ve doğal öldürücü hücreleri aktive etmiştir (Makino vd. 2016).

Hücre yüzey proteinleri, *Lactobacillus* türleri ile diğer probiyotik bakterilerin hücre yüzeyinde bulunan hücresel yapılarının en önemli bileşenleri arasında yer almaktadır. Hücre yüzey proteinleri, hücre yüzeyine kovalent olarak veya kovalent olmayan şekilde bağlanan proteinler olarak sınıflandırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, LPXTG proteinleri, S-tabaka proteinleri, pili proteinleri, ay ışığı proteinleri dahil olmak üzere birçok yüzey proteini türünün, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus* ve *L. acidophilus* dahil olmak üzere farklı *Lactobacillus* türleri tarafından üretildiğini göstermiştir (Liu vd. 2020). Bu proteinler, konakçının biyolojik süreçlerinde önemli immunomodülatör roller üstlenmektedir (Teame vd. 2020).

PM'lerin periodontal hastalıklara karşı kullanımları oldukça yeni bir alan olmasına rağmen mevcut bilgiler PM'lerin periodontal doku inflamasyonunu kontrol etmek için potansiyel adaylar olabileceğine işaret etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında,

Lactiplantibacillus plantarum EIR/IF-1 bakterisinden elde edilen PM'lerin (HBE, EPS-b, EPS-r, hücre lizati, hücre yüzey proteini, inaktive hücre) *P. gingivalis* enfeksiyonunun iPDLF hücrelerinde oluşturduğu inflamatuvar sitokin üretimi üzerindeki etkileri araştırılmış olup hedef hücreler üzerinde toksik etki sergilemedikleri ve inflamasyon oluşumunun azaltılması yönünde faydalar sundukları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler; biyolojik olarak aktif ve işlevsel moleküller içeren PM'lerin, periodontal inflamasyonun önlenmesinde yeni, doğal ve güvenli bir strateji olarak tasarlanabileceğine işaret etmektedir. PM'lerin eşsiz içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin yanı sıra inflamasyonu engelleyerek periodontitis oluşumunu kontrol etmeye yardımcı olabile potansiyelleri dental ürünlere entegrasyonları için umut vaad etmektedir. Sonuç olarak, PM'ler periodontal hastalıkların yönetiminde önemli katkılar sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 105-114.
- AI, V. S., Ilyina, A. and EP, S. C. 2015. Etiology and microbiology of periodontal diseases: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 9(48), 2300-2306.
- Aljehani, Y. A. 2014. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *International Journal of Dentistry*, 182513.
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N. and Hamada, N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of periodontal research*, 39(2), 136-142.
- Aral, K., Milward, M. R., Kapila, Y., Berdeli, A. and Cooper, P. R. 2020. Inflammasomes and their regulation in periodontal disease: A review. *Journal of Periodontal Research*, 55(4), 473-487.
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E. and Kumar, S. S. 2016. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5276130.
- Baelum, V. and López, R. 2021. *Epidemiology of Periodontal Diseases*. Springer, 57-78, Switzerland.
- Balta, M. G., Papathanasiou, E., Blix, I. J. and Van Dyke, T. E. 2021. Host modulation and treatment of periodontal disease. *Journal of Dental Research*, 100(8), 798-809.
- Bergström, J. 2004. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92, 1-8.
- Bhuyan, R., Bhuyan, S. K., Mohanty, J. N., Das, S., Juliana, N. and Abu, I. F. 2022. Periodontitis and its inflammatory changes linked to various systemic diseases: A Review of its underlying mechanisms. *Biomedicines*, 10(10), 2659.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., et al. 2010. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 666-675.
- Bruce, L. P., Bryan, S. M. and Newell, W. J. 2005. Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(9499), 1809-1820.

- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A. And Ruas-Madiedo, P. 2018. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H. and Van Dyke, T. E. 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology*, 64(1), 57-80.
- Chandhni, P. R., Pradhan, D., Sowmya, K., Gupta, S., Kadyan, S., Choudhary, R. and Grover, S. 2021. Ameliorative effect of surface proteins of probiotic lactobacilli in colitis Mouse models. *Frontiers in Microbiology*, 12, 679773.
- Chen, X., Daliri, E.B.M., Kim, N., Kim, J.R., Yoo, D. and Oh, D.H. 2020. Microbial etiology and prevention of dental caries: Exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens*, 9(7), 569.
- Christen, A. G., Armstrong, W. R. and McDaniel, R. K. 1979. Intraoral leukoplakia, abrasion, periodontal breakdown, and tooth loss in a snuff dipper. *Journal of the American Dental Association*, 98(4), 584-586.
- Chung, I. C., OuYang, C. N., Yuan, S. N., Lin, H. C., Huang, K. Y., Wu, P. S. and Chen, L. C. 2019. Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates the NLRP3 inflammasome and attenuates colitis-associated colorectal cancer in mice. *Nutrients*, 11(3), 516.
- Coviello, S., Wimmenauer, V., Polack, F. P. and Irusta, P. M. 2014. Bacterial lysates improve the protective antibody response against respiratory viruses through Toll like receptor 4. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(10), 2896-2902.
- Cua, D. J. and Tato, C. M. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 479-489.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M. and Aguilar-Toalá, J. E. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.
- Czarnetzki, A., Jakob, T. and Pusch, C. M. 2003. Palaeopathological and variant conditions of the *Homo heidelbergensis* type specimen (Mauer, Germany). *Journal of Human Evolution*, 44(4), 479-495.
- Dahlen, G., Basic, A. and Bylund, J. 2019. Importance of virulence factors for the persistence of oral bacteria in the inflamed gingival crevice and in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1339.
- Dale, B. A. and Fredericks, L. P. 2005. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(2), 119-134.

- Darveau, R. P., Arbabi, S., Garcia, I., Bainbridge, B. and Maier, R. V. 2002. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infection and Immunity*, 70(4), 1867-1873.
- De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R. and Pietrella, D. 2018. Probiotic cell-free supernatants exhibited anti inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1756308.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153-177.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Dentino, A., Lee, S., Mailhot, J. and Hefti, A. F. 2013. Principles of periodontology. *Periodontology 2000*, 61(1), 16-53.
- Devine, D. A., Marsh, P. D. and Meade, J. 2015. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *Journal of Oral Microbiology*, 7(1), 26941.
- Di Stefano, M., Polizzi, A., Santonocito, S., Romano, A., Lombardi, T. and Isola, G. 2022. Impact of oral microbiome in periodontal health and periodontitis: a critical review on prevention and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5142.
- Dinić, M., Pecikoza, U., Djokić, J., Stepanović-Petrović, R., Milenković, M., Stevanović, M. and Lukić, J. 2018. Exopolysaccharide produced by probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 reduces inflammatory hyperalgesia in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1.
- Ditu, L. M., Chifiriuc, M. C., Bezirtzoglou, E., Marutescu, L., Bleotu, C., Pelinescu, D. and Lazar, V. 2014. Immunomodulatory effect of non-viable components of probiotic culture stimulated with heat-inactivated *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* on holoxenic mice. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 25(1), 23239.
- Dixon, D. R. and Darveau, R. P. 2005. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *Journal of Dental Research*, 84(7), 584-595.
- Doğan, B., Kipalev, A. Ş., Ökte, E., Sultan, N. and Asikainen, S. E. 2008. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. *Journal of Periodontology*, 79(2), 307-315.

- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dutzan, N., Kajikawa, T., Abusleme, L., Greenwell-Wild, T., Zuazo, C. E., Ikeuchi, T. and Moutsopoulos, N. M. 2018. A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Science Translational Medicine*, 10(463), 0797.
- Eberl, L. 1999. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(4), 493-506.
- Enersen, M., Nakano, K. and Amano, A. 2013. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of Oral Microbiology*, 5(1), 20265.
- Enwonwu, C. O., Falkler, W. A. and Idigbe, E. O. 2000. Oro-facial gangrene (noma/cancrum oris): pathogenetic mechanisms. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 11(2), 159-171.
- Ezendam, J. and Van Loveren, H. 2006. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews*, 64, 1-14.
- Ezhilarasan, D. and Varghese, S. S. 2022. *Porphyromonas gingivalis* and dental stem cells crosstalk amplify inflammation and bone loss in the periodontitis niche. *Journal of Cellular Physiology*, 237(10), 3768-3777.
- Favero, C., Giordano, L., Mihaila, S. M., Masereeuw, R., Ortiz, A. and Sanchez-Niño, M.D. 2022. Postbiotics and Kidney Disease. *Toxins*, 14(9), 623.
- Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, IG., et al. 2011. Anti-inflammatory capacity of selected Lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 60,1050-1059.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V. and Šušković, J. 2005. Importance of Slayer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 285-292.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K. and Kato, T. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446-450.
- Gao, K., Wang, C., Liu, L., Dou, X., Liu, J., Yuan, L. and Wang, H. 2017. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(5), 700-713.

- Giorgetti, G., Brandimarte, G., Fabiocchi, F., Ricci, S., Flamini, P., Sandri, G. and Tursi, A. 2015. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *Journal of Immunology Research*, 501361.
- Gotsman, I., Lotan, C., Soskolne, W. A., Rassoovsky, S., Pugatsch, T., Lapidus, L. and Stabholz, A. 2007. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*, 78(5), 849-858.
- Graves, D. T. and Cochran, D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391-401.
- Gu, Y. and Han, X. (2020). Toll-like receptor signaling and immune regulatory lymphocytes in periodontal disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3329.
- Hajishengallis, G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3-11.
- Hajishengallis, G. and Chavakis, T. 2021. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*, 21(7), 426-440.
- Hajishengallis, G., Tapping, R. I., Harokopakis, E., Nishiyama, S. I., Ratti, P., Schifferle, R. E. and Yoshimura, F. 2006. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2 centred pattern recognition apparatus. *Cellular Microbiology*, 8(10), 1557-1570.
- Hamad, G. M., Abdelmotilib, N. M., Darwish, A. M. and Zeitoun, A. M. 2020. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of *Clostridium perfringens* poultry meat infection in Egypt. *Anaerobe*, 62, 102181.
- Hamada, N., Watanabe, K., Arai, M., Hiramane, H. and Umemoto, T. 2002. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(3), 197-200.
- Hans, M. and Madaan Hans, V. 2014. Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity. *International Journal of Peptides*, 2014.
- Hart, T. C., Hart, P. S., Michalec, M. D., Zhang, Y., Firatli, E., Van Dyke, T. E. and Soskolne, W. A. 2000. Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *Journal of Medical Genetics*, 37(2), 88-94.
- Herath, T. D., Wang, Y., Seneviratne, C. J., Darveau, R. P., Wang, C. Y. and Jin, L. 2013. The expression and regulation of matrix metalloproteinase-3 is critically modulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with heterogeneous lipid A structures in human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-12.

- Homayouni, R.A., Aghebati, M.L., Samadi, K.H. and Abbasi, A. 2020. Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-8.
- Hooper, L. V. and Macpherson, A. J. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159-169.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. 2008. Supernatant from *Bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLOS ONE*, 3, e2753.
- Hornef, M. W., Wick, M. J., Rhen, M. and Normark, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 3(11), 1033-1040.
- How, K. Y., Song, K. P. and Chan, K. G. 2016. *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53.
- Hughes, F. J. 2015. Periodontium and periodontal disease. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering In Dental Sciences*, 433-444.
- Ivanov, I. I. and Honda, K. 2012. Intestinal commensal microbes as immune modulators. *Cell Host and Microbe*, 12(4), 496-508.
- Jang, H. J., Song, M. W., Lee, N. K. and Paik, H. D. 2018. Antioxidant effects of live and heat killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *Journal of food science and technology*, 55, 3174-3180.
- Jasberg, H. 2017. Probiotic bifidobacteria and lactobacilli in oral health-interactions with biofilms and the host. University of Turku.
- Jensen, G., Benson, K., Carter, S. and Endres, J. 2010. GanedenBC30 cell wall and metabolites: Anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunology*, 11, 15.
- Kaczynska, A., Klosinska, M., Janeczek, K., Zarobkiewicz, M. and Emeryk, A. 2022. Promising immunomodulatory effects of bacterial lysates in allergic diseases. *Frontiers in Immunology*, 3181.
- Karaca, B., Haliscelik, O., Gursoy, M., Kiran, F., Loimaranta, V., Söderling, E. and Gursoy, U. K. 2022. Analysis of chemical structure and antibiofilm properties of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* EIR/IF-1 Postbiotics. *Microorganisms*, 10(11), 2200.

- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S. and Das, G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A reviewç Journal of Food and Drug Analysis, 26(3), 927-939.
- Kesić, L., Milasin, J., Igic, M. and Obradovic, R. 2008. Microbial Etiology of Periodontal Disease- Mini Review. Medicine and Biology, 15(1), 1-6.
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L. and Zaura, E. 2016. The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. British Dental Journal, 221(10), 657-666.
- Kim, M. H., Choi, S. J., Choi, H., Choi, J. P., Park, H. K., Kim, E. K., et al. 2018. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles protect atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles. Allergy Asthma and Immunology Research, 10, 516-532.
- Kinane, D. F., Demuth, D. R., Gorr, S. U., Hajishengallis, G. N. and Martin, M. H. 2007. Human variability in innate immunity. Periodontology 2000, 45(1), 14-34.
- Kinane, D. F. and Lappin, D. F. 2002. Immune processes in periodontal disease: a review. Annals of Periodontology, 7(1), 62-71.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. and Papapanou, P. N. 2017. Periodontal diseases. Nature Reviews Disease Primers, 3(1), 17038.
- Kobayashi, R., Kobayashi, T., Sakai, F., Hosoya, T., Yamamoto, M. and Kurita-Ochiai, T. 2017. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective in preventing Porphyromonas gingivalis-accelerated periodontal disease. Scientific Reports, 7(1), 1-10.
- Kozak, M., Dabrowska-Zamojcin, E., Mazurek-Mochol, M. and Pawlik, A. 2020. Cytokines and their genetic polymorphisms related to periodontal disease. Journal of Clinical Medicine, 9(12), 40-45.
- LeResche, L. and Dworkin, S. F. 2002. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. Periodontology, 30(1), 91-103.
- Lee, J., Lee, J. E., Kim, S., Kang, D. and Yoo, H. M. 2020. Evaluating cell death using cell free supernatant of probiotics in three-dimensional spheroid cultures of colorectal cancer cells. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 160, e61285.
- Li, N. and Collyer, C. A. 2011. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*—complex domain structures confer diverse functions. European Journal of Microbiology and Immunology, 1(1), 41-58.
- Liaskou, E., Wilson, D. V. and Oo, Y. H. 2012. Innate immune cells in liver inflammation. Mediators of Inflammation, 949157.

- Linden, G. J., Herzberg, M. C. and working group 4 of joint EFP/AAP workshop 2013. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(14), 20-23.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X. 2010. In vitro and in vivo antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS 3. *Carbohydrate polymers*, 82(4), 1278-1283.
- Liu, J., Tang, X., Li, C., Pan, C., Li, Q., Geng, F. and Pan, Y. 2015. *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 60(8):1153-1161.
- Liu, Q., Yu, Z., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. and Zhai, Q. 2020. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microbial Cell Factories*, 19, 23.
- Loos, B. G. and Van Dyke, T. E. 2020. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontology*, 83(1), 26-39.
- Makino, S., Sato, A., Goto, A., Nakamura, M., Ogawa, M., Chiba, Y., et al. 2016. Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Journal of Dairy Science*, 99, 915-923.
- Markiewski, M. M. and Lambris, J. D. 2007. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *American Journal of Pathology*, 171(3), 715-727.
- Marzec, A. and Feleszko, W. 2020. Postbiotics- A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 14, 1-17.
- Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X. and Chen, L. 2020. *Porphyromonas gingivalis* and its systemic impact: Current status. *Pathogens*, 9(11), 944.
- Minocha, A. 2009. Probiotics for preventive health. *Nutrition in Clinical Practice*, 24, 227-241.
- Mogensen, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240-273
- Mohamadzadeh, M., Pfeiler, E. A., Brown, J. B., Zadeh, M., Gramarossa, M., Managlia, E., et al. 2011. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 108, 4623-4630.

- Mohammedsaeed, W., McBain, A. J., Cruickshank, S. M. and O'Neill, C. A. 2014. *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5773-5781.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Siméon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.
- Moraes, R. M., Schlagenhauf, U. and Anbinder, A. L. 2022. Outside the limits of bacterial viability: Postbiotics in the management of periodontitis. *Biochemical Pharmacology*, 115072.
- Murofushi, Y., Villena, J., Morie, K., Kanmani, P., Tohno, M., Shimazu, T, et al. 2015. The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14. *Molecular Immunology*, 64, 63-75.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T. and Duskova, J. 2014. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research*, 476068.
- Nasajpour, A., Ansari, S., Rinoldi, C., Rad, A. S., Aghaloo, T., Shin, S. R., Mishra, Y. K., Adelung, R., Swieszkowski, W., Annabi, N., Khademhosseini, A., Moshaverinia, A., Tamayol, A., Saha, S., Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J. and Ribeiro, A. A. 2019. Introduction to the Oral Cavity. How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota, 28(10194), 141-153.
- Nataraj, B.H., Ali, S.A., Bahare, P.V. and Yadav, H. 2020. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19, 168.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., et al. 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus plantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 155-162.
- Noh, S. Y., Kang, S. S., Yun, C. H. and Han, S. H. 2015. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* inhibits Pam2CSK4-induced IL-8 production in human intestinal epithelial cells. *Molecular Immunology*, 64,183-189.
- Ogawa, T., Asai, Y., Hashimoto, M. and Uchida, H. 2002. Bacterial fimbriae activate human peripheral blood monocytes utilizing TLR2, CD14 and CD11a/CD18 as cellular receptors. *European Journal of Immunology*, 32(9), 2543-2550
- Ohlrich, E.J., Cullinan, M.P. and Seymour, G.J. 2009. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54, 2-10.

- OmerOglou, E., Karaca, B., Kibar, H., Haliscelik, O. and Kiran, F. 2022. The role of microbiota-derived postbiotic mediators on biofilm formation and quorum sensing-mediated virulence of *Streptococcus mutans*: A perspective on preventing dental caries. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105390
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H. and Tonetti, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, 173-182.
- Peres, M.A., Macpherson, L.M.D., Weyant, R.J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M.R., Listl, S., Celeste, R.K. and Guarnizo-Herreno, C.C., Kearns, C., 2019. Oral diseases: A global public health challenge. *Lancet*, 394, 249-260.
- Petersen, P.E. 2003. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31 (1), 3-24.
- Ruby, J. and Barbeau, J. 2002. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 13(1), 34-41.
- Schmid-Schönbein, G. W. 2006. Analysis of inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 93-151.
- Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A. P., Koch, M. H., Rietschel, E. T. and Seydel, U. 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *European Journal of Biochemistry*, 267(7), 2008-2013.
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S. V. and Kapila, Y. L. 2021. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology*, 87(1), 107-131.
- Shende, S., Ansari, S., Gattani, D., Bhutada, G., Ansari, S. and Jirafe, S. 2018. Periodontal Regeneration—An Analytical Puzzle? *International Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6, 2.
- Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Kaji, R., Nagaoka, M. and Nanno M. 2009. Peptidoglycan from *Lactobacilli* inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*, 128, 858-869.
- Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. 1994. Evidence of bacterial etiology: A historical perspective. *Periodontology*, 2000, 5(1), 7-25.
- Song, B., Zhang, Y. L., Chen, L. J., Zhou, T., Huang, W. K., Zhou, X. and Shao, L. Q. 2017. The role of Toll-like receptors in periodontitis. *Oral Diseases*, 23(2), 168-180.

- Sorsa, T., Tjäderhane, L., Konttinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M. and Mäntylä, P. 2006. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*, 38(5), 306-321.
- Soskolne, W. A. and Klinger, A. 2001. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodontology*, 6(1), 91-98.
- Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in microbial physiology*, 8, 143-213.
- Şenel, S. 2021. An overview of physical, microbiological and immune barriers of oral mucosa. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7821.
- Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712.
- Taverniti, V. and Guglielmetti, S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6(3), 261-274.
- Taylor, G. W. 2001. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Annals of Periodontology*, 6(1), 99-112.
- Taylor, J.J. 2010. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology*, 54(1), 160-194.
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q. and Zhou, Z. 2020. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic *Lactobacilli*, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 570344.
- Tervonen, T. and Oliver, R. C. 1993. Long-term control of Diabetes mellitus and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(6), 431-435.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 167-177.
- Tomina, D. C., Petruţiu, Ş. A., Dinu, C. M., Crişan, B., Cighi, V. S. and Raţiu, I. A. 2022. Comparative Testing of Two Ligature-Induced Periodontitis Models in Rats: A Clinical, Histological and Biochemical Study. *Biology*, 11, 634.
- Tonetti, M. S., Greenwell, H. and Kornman, K. S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, 159-172.

- Trowbridge, H. O., Emling, R. C. and Fornatora, M. 1997. Inflammation. A review of the process. *Implant dentistry*, 6(3), 238.
- Tsilingiri, K. and Rescigno, M. 2013. Postbiotics: What else? *Beneficial Microbes*, 4, 101-107.
- Vargas, S. A., Ilyina, A., Segura, C. E., Silva, B. Y. and Mndez, G. L. 2015. Etiology and microbiology of periodontal diseases: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 9(48), 2300-2306.
- Wang, K., Niu, M., Song, D., Song, X., Zhao, J., Wu, Y. and Niu, G. 2020. Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 206-214.
- Warnakulasuriya, S., Sutherland, G. and Scully, C. 2005. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncology*, 41(3), 244-260.
- Wu, C. Z., Yuan, Y. H., Liu, H. H., Li, S. S., Zhang, B. W., Chen, W. and Li, L. J. 2020. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 Diabetes mellitus. *BMC Oral Health*, 20(1), 1-15.
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H. and Liang, S. 2020. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120, 45-84.
- Yeşilyurt, N., Yılmaz, B., Ağagündüz, D. and Capasso, R. 2021. Involvement of probiotics and postbiotics in the immune system modulation. *Biologics*, 1(2), 89-110.
- Zhang, Y., He, J., He, B., Huang, R. and Li, M. 2019. Effect of tobacco on periodontal disease and oral cancer. *Tobacco Induced Diseases*, 17.
- Zhang, Y., Ding, Y. and Guo, Q. 2022. Probiotic Species in the Management of Periodontal Diseases: An Overview. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 806463.