



TC

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**PROBİYOTİK KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN
İNSAN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLAST HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hazal KİBAR

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROBİYOTİK KAYNAKLI POSTBİYOTİK
MEDİATÖRLERİN İNSAN PERİODONTAL LİGAMENT
FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Hazal KİBAR

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliğı Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğı Tarih: **07/01/2020**

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

İkinci Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Fadime KIRAN

ÇANAKKALE

Hazal KİBAR tarafından Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde ve Doç. Dr. Fadime KIRAN ikinci danışmanlığında hazırlanan ve **07/01/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Probiyotik Kaynaklı Postbiyotik Mediatörlerin İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Başkan

Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Üye

Doç. Dr. Çiğdem UYSAL PALA

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Hazal KiBAR

TEŞEKKÜR

Hayallerimi gerçeğe dönüştürmek için attığım ilk adım olan bu yolda ilerleyeceğim basamaklar zor olsa da direnmekten ve istemekten asla vazgeçmemem gerektiğini bana her zaman hatırlatan, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, saygı değer danışman hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN ve Doç. Dr. Fadime KIRAN'a,

Tezin değerlendirmesi ve düzenlenmesi aşamalarında katkılarından dolayı Prof. Dr. Emel EMREGÜL ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem UYSAL PALA'ya

Tezin deneysel aşamalarında ve ilerlemesinde engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Araş. Gör. Dr. Başar KARACA, Araş. Gör. Dr. Ahmet CEYLAN ve Araş. Gör. Dr. Sedat SEVİN'e

Tez çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olan, desteklerini asla esirgemeyen Rejeneratif Biyomalzeme Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı ekip üyelerine,

İlerlemek istediğim bu yolda karşılaşacağım zorlukları benimle birlikte görerek varlığını her zaman yanımda hissettiğim, bana gönülden destek olan, yüreği güzel insan Arda DEMİRHAN'a,

Bu süreçte elinden geleni düşünmeden önüme koyan, çabasını ve sevgisini her daim bana hissettiren, doğru olmayı, dik durmayı kendisinden öğrendiğim, benim cesur yanımla annem Bengi TUNCER'e, elimi uzatsam her an orada olacaklarını bildiğim ablam Yağmur KİBAR ve kardeşim Yiğit Ali KİBAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hazal KİBAR
Çanakkale, Ocak 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	American Type Culture Collection Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
bç	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
BYP	Brezilya yeşil propolisi
C	Sitozin
CO ₂	Karbondioksit
COX	Cyclooxygenase Siklooksijenaz
dH ₂ O	Distile su
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Ettiği Minimum Esansiyel Besi yeri
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
F	Forward (İleri)
FAO	Food and Agriculture Organization Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	Fötal sıgır serumu
G	Guanin
g	Gram
GKS	Gingival krematik sıvı
GRAS	Generally Recognized as Safe Genel olarak güvenli kabul edilir
HBS	Hücre bağımsız süpernatant
HePS	Heteropolisakkarit
HIV	Human Immunodeficiency Virus İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HoPS	Homopolisakkarit
IC	İnhibitör konsantrasyonu
IL	İnterlökin
iPDLF	İnsan periodontal ligament fibroblast

LAB	Laktik asit bakterileri
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMP	Matriks metalloproteinaz
MRS	De Man, Ragosa and Sharpe Besi yeri
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
N	Normalite
NCBI	National Center for Biotechnology Information Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
PBS	Sodyum klorür içeren fosfat tamponu
PDL	Periodontal ligament
PDLF	Periodontal ligament fibroblast
pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Reverse (Geri)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PZR	Gerçek zamanlı (Real time) polimeraz zincir reaksiyonu
S	Svedberg birimi
SHI	Shikonin
T	Timin
TCA	Trikloro asetik asit
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfopenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
WHO	World Health Organization Dünya Sağlık Örgütü
YDR	Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu
α	Alfa
β	Beta

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
%	Yüzdelik oran
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat (Celcius) derece
μl	Mikrolitre



ÖZET

PROBİYOTİK KAYNAKLI POSTBİYOTİK MEDIATÖRLERİN İNSAN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hazal KİBAR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

İkinci Danışman: Doç. Dr. Fadime KIRAN

07/01/2020, 66

Periodonsiyumun yok olmasına neden olan periodontal hastalıklar, etkin bir şekilde tedavi edilemedikleri sürece progresif periodontal kemik kaybına ve sonrasında erken diş kayıplarına yol açabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, probiyotik kaynaklı postbiyotik mediatörlerin (PM) insan periodontal ligament fibroblast (iPDLF) hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkilerini belirlemektir. Bu amaçla, arı polen örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen izolatlar moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır. *Weissella cibaria* olarak tanımlanan izolatların ekzopolisakkaritleri (EPS) ile hücre bağımsız süpernatantları (HBS) elde edilmiş ve bu PM'lerin antioksidan etkileri belirlenmiştir. Her iki izolata ait HBS'lerin DPPH radikalini giderici etkileri %52-61 arasında tespit edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için sağlıklı dişlerden iPDLF izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen hücreler, EPS ve HBS'lerin değişen dozları ile 24 saat inkübe edilmiş ve birlikte inkübasyonu takiben iPDLF hücre canlılığı MTT testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde; her iki izolata ait PM'lerin iPDLF hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, *Weissella cibaria* izolatları tarafından üretilen PM'lerin antioksidan özellikleri ve iPDLF hücreleri üzerindeki proliferatif etkileri ile periodontal hastalıklar için yeni bir biyo-malzeme olarak kullanım potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Periodontal Hastalıklar, Postbiyotik Mediatörler, DPPH, İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri, Rejeneratif Tıp

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PROBIOTIC-DERIVED POSTBIOTIC MEDIATORS IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLAST CELLS

Hazal KİBAR

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering

Advisor: Asst. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

Co-Advisor: Assoc. Prof. Fadime KIRAN

07/01/2020, 66

Periodontal diseases which give rise to the disappearance of the periodontium can lead to progressive periodontal bone losses and subsequent early tooth losses when not effectively treated. The aim of this study was to determine the effects of probiotic-derived postbiotic mediators (PM) on the viability of human periodontal ligament fibroblast cells (hPDLF). For this purpose, bacteria were isolated from bee pollen samples and isolates were identified by molecular methods. Exopolysaccharides (EPS) and cell-free supernatants (CFS) of the isolates identified as *Weissella cibaria*, were obtained and their antioxidant effects were determined. The DPPH radical scavenging effects of CFS for both isolates were found between the range of 52-61%. hPDLF cells were isolated from healthy teeth for cell culture studies, then co-incubated for 24 hours with varying doses of EPS and HBS. Following the co-incubation, hPDLF cell viability was analyzed by MTT assay. As a result of the obtained data; PM's of both isolates were found to increase hPDLF cell viability, statistically. In conclusion, PM's produced by *Weissella cibaria* isolates, with their antioxidant properties and proliferative effects on hPDLF cells may have the potential for use as a new biomaterial for periodontal diseases

Keywords: Periodontal Diseases, Postbiotic Mediators, DPPH, Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells, Regenerative Medicine

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Ağız Homeostazı ve Önemi	2
1.2. Ağız Sağlığı ve Yaygın Hastalıklar.....	4
1.2.1. Diş Çürüğü	5
1.2.2. Periodontal Hastalıklar.....	8
Gingivitis (Diş Eti İltihabı)	9
Periodontitis	10
1.3. Periodontal Hastalıkların Tedavi Yaklaşımları	11
1.4. Probiyotikler.....	15
1.5. Postbiyotik Mediatörler.....	17
1.6. Ekzopolisakkaritler	19
1.7. Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri.....	22
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	25
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	29
3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması.....	31
3.2.3. Postbiyotik Mediatörlerin Hazırlanması	31
3.2.4. Antioksidan Etkinin Belirlenmesi	33

3.2.5. İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi	33
3.2.6. Postbiyotik Mediatörlerin İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	34
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması	37
4.2. Postbiyotik Mediatörlerin Eldesi.....	44
4.3. Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi	46
4.4. Postbiyotik Mediatörlerin İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri.....	49
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	56
EKLERİ	I
EK 1. Etik Kurul Onayı.....	II
ÖZGEÇMİŞ	III

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Ağız boşluğunun önden görünümü, Ansiklopedi Britannica, Inc., 9 Aralık 2019 tarihinde https://www.britannica.com alınmıştır.	3
Şekil 1.2. Ağız boşluğunun farklı bölgelerinde mikrobiyota kolonizasyonunun biyocoğrafyası (Lamont, Koo ve Hajishengallis, 2018).....	4
Şekil 1.3. Molar diş çatlağında meydana gelen çürük (Gorseta, 2015)	6
Şekil 1.4. Çürük gelişiminde rol oynayan faktörlerin şematik gösterimi (Selwitz, Ismail, ve Pitts, 2007).....	7
Şekil 1.5. Periodonsiyumun Yapısı (Cafiero ve Matarasso, 2013).....	9
Şekil 1.6. a. Sağlıklı periodontal doku, b. Orta kesici dişler arasındaki diş etinde erken diş eti iltihabı, c. Kronik periodontitisin klinik görünümü, doku kaybı ve hastalığın ayırt edici özelliği olan derin “ <i>periodontal cepler</i> ” (Kinane ve diğerleri, 2017)	10
Şekil 1.7. Periodontal cep içine ilaç dağıtımı için mevcut uygulama yöntemleri (Rajeshwari ve diğerleri, 2019)	12
Şekil 1.8. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ve membran kullanımı (Chen ve diğerleri, 2010)	13
Şekil 1.9. Kemik greftlerinin kullanımı (Chen ve diğerleri, 2010).....	14
Şekil 1.10. Bazı postbiyotiklerin konakçıdaki lokal ve sistemik olarak potansiyel etkileri (Aguilar-Toalá ve diğerleri, 2018)	19
Şekil 1.11. Hücresel, vasküler ve hücre dışı matriks elemanları dahil periodontal dokunun zengin ve kompleks yapısının şematik görünümü (Marchesan ve diğerleri, 2011) ...	23
Şekil 3.1. A) Polen örneklerinin ön-zenginleştirme aşaması B) MRS katı besi yerinde gelişen farklı koloniler C) Tek koloni çekimi	30
Şekil 3.2. A) Sağlıklı dişin laboratuvara transferi B) PBS ile yıkama C) Besi yeri ile yıkanma aşaması ve periodontal dokunun bistüri ile diş yüzeyinden kazınması D) Steril petri içerisine kazınmış olan periodontal doku	35
Şekil 4.1. Bakterilerin ışık mikroskopundaki Gram boyama görüntüleri, A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1; B. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2.....	38
Şekil 4.2. Bakterilerin katalaz reaksiyonu, A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1; B. pozitif kontrol	39
Şekil 4.3. Bakterilerin hemolitik aktivite sonuçlarının petri görüntüleri, A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1:γ hemolitik; B. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2:γ hemolitik	39
Şekil 4.4. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 izolatına ait A. MALDI-TOF analiz sonucu; B. hücre yüzey protein profili	40
Şekil 4.5. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2 izolatına ait A. MALDI-TOF analiz sonucu; B. hücre yüzey protein profili	41
Şekil 4.6. A. İzolata ait 16S rRNA PZR ürününün (1492 bp) agaroz jel elektroforez görüntüsü, B. 100 bp DNA markörüne ait bant profilleri ve moleküler ağırlıkları	42
Şekil 4.7. 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına ait raporlar, A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1, B. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2	42
Şekil 4.8. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ve <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2 izolatlarına ait liyofilize HBS görüntüsü	44
Şekil 4.9. Ekzopolisakkarit miktarını belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz standart eğrisi	45
Şekil 4.10. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ve <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2 izolatlarının EPS-R üretim miktarları (µg/ml).....	45
Şekil 4.11. A. GA standart eğrisi, B ve C. GA standartında ve <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ile <i>Weissella cibaria</i> EIR/P2 HBS’lerinde reaksiyona bağlı meydana gelen renk	

değişimleri	47
Şekil 4.12. A. GA standart eğrisi, B. Kör, <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ile <i>Weissella cibaria</i> EIR/P2 HBS'lerinde (1mg/ml) reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimleri ...	48
Şekil 4.13. 5.(a), 7.(b) ve 12.(c) günlerde iPDFL hücrelerinin invert faz-kontrast mikroskobu görüntüleri	50
Şekil 4.14. MTT testi neticesinde oluşturulan canlı hücre sayısı standart (kalibrasyon) eğrisi	51
Şekil 4.15. A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ve B. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2 izolatına ait EPS-R'nin iPDFL hücre canlılığı üzerine etkisi	52
Şekil 4.16. A. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1 ve B. <i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2 izolatına ait HBS'nin iPDFL hücre canlılığı üzerine etkisi	53



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen heteropolisakkaritlerin ve homopolisakkaritlerin özellikleri (Lynch ve diğerleri, 2018)	20
Tablo 4.1. Seçilen izolatların DNA saflık ve miktar tayini sonuçları.....	42



BÖLÜM 1

GİRİŞ

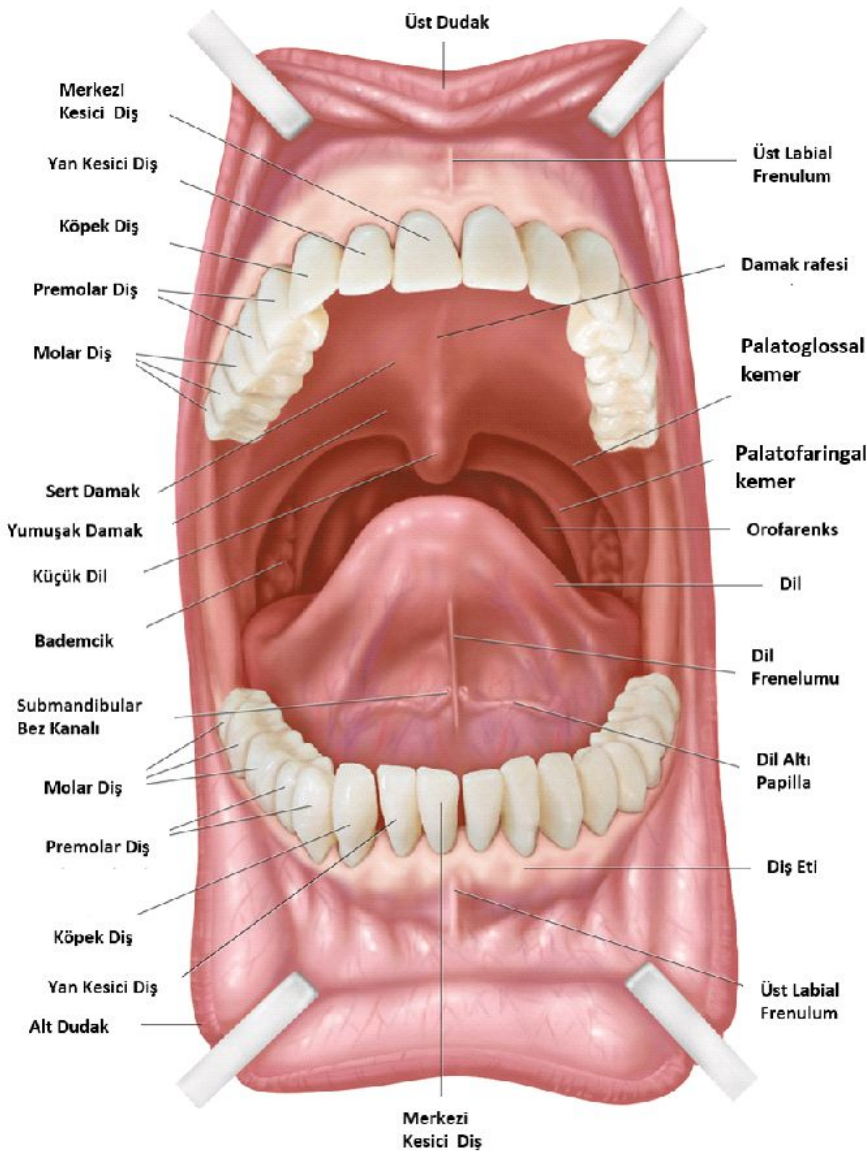
Değişik nedenlere bağlı olarak oluşan, sadece diş dokusu ile kalmayıp vücudun birçok sistemine de yansıyan ve insan hayatını olumsuz yönde etkileyen periodontal hastalıklar, tüm dünya genelinde en yaygın ve önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda periodontal cerrahiyi takiben periodontal dokuların rejenerasyonuna (yenilenmesine) yönelik gerçekleştirilen çalışmalar hızla artmaktadır. Periodontal dokuların yenilenmesinde temel amaç; periodontal desteğin yeniden elde edilerek yaralanan dokunun, mineralize ve yumuşak doku bileşenlerinin yapılanmasını sağlayabilmektir. İyileşme süreci, birçok hücre tipinin yeni oluşan yapılanmaya katkıda bulunmasını gerekli kılan uzun bir süreçtir. Periodontal rejenerasyon aşamasında; yara iyileşmesi olan bölgede bulunan hücrelerin yeni kemik ve periodontal ligament (PDL) oluşturma kapasitesinde olması beklenmektedir. Farklı progenitör hücre popülasyonuna sahip olduğu bilinen PDL hücreleri osteoblast benzeri özelliklerinden dolayı bu süreçte yönlendirilmiş doku rejenerasyonuna katkıda bulunan önemli hücre grupları arasında yer almaktadır. Gerçekleştirilen son çalışmalarda, çeşitli biyolojik faktörlerin yönlendirilmiş doku rejenerasyonuna olan etkinliklerinin daha iyi anlaşılması, söz konusu PDL hücrelerinin proliferasyonuna olan etkilerini gündeme getirmiş olup, rejenerasyondan sorumlu hücrelerin biyolojik moleküller aracılığı ile uyarılabileceği hipotezini ortaya çıkarmaktadır. Bu amaçla çeşitli büyüme ve farklılaştırma faktörlerinin proliferasyonu teşvik edici etkilerine yönelinmektedir. Ancak; ağız mikrobiyotasında da sıklıkla bulunan ve başta konak inflamatuvar-immün yanıtı gibi birçok metabolik yolağı tetikleyebildikleri kanıtlanmış olan laktik asit bakteri (LAB) suşlarının salgıladığı mediatörlerin kök hücreler ile etkileşimleri altında yatan karmaşıklığa henüz dikkat çekilmemiştir.

Periodontal tedavide nihai amaç; periodontal doku inflamasyonunu kontrol etmek ve diş çevresini saran ve destekleyen dokuların bulunduğu periodonsiyum bölgesinin öngörülebilir rejenerasyonunu sağlayabilmektir. PDL; dişlerin stabilizasyonunu ve işlevini sürdürmekte önemli bir rol oynayan, diş kökünü çevreleyerek dişi alveolar kemiğin iç yüzüne bağlayan oldukça fibröz ve vasküler bağ dokusundan oluşan önemli bir yapıdır. Bu yapının oluşumunu sağlayan periodontal ligament fibroblast (PDLF) hücreleri ise periodonsiyumda önde gelen önemli bir hücre tipi olup, periodontal doku homeostazında ve yeniden şekillenmesinde kritik roller üstlenmektedir. Bu hücreleri kullanarak kaybedilmiş periodontal yapının yeniden oluşturulabilmesi için farklı tedavi yaklaşımları

geliştirilmektedir. Büyüme faktörü gibi biyolojik ajanların PDLF hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkileri kanıtlanmış olmasına rağmen, LAB suşları tarafından üretilen postbiyotik mediatörler (PM) için yönlendirilmiş doku rejenarasyonunu hedefleyen herhangi bir çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada, polen örneklerinden LAB izole edilmiş, moleküler yöntemler ile tanımlanmış, PM'leri elde edilmiş ve bu PM'lerin (hücre bağımsız süpernatant ve ekzopolisakkarit) antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve insan PDLF hücrelerinin hücre canlılığı üzerine olan etkileri XTT testi ile analiz edilmiştir. Periodonsiyumun iyileşmesi ve rejenerasyonu amacıyla doğal bir ürün olarak PM'lerin kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemli olan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar PM'lerin periodontal hastalıkların tedavisi için alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılabileceğine dikkat çekmektedir.

1.1. Ağız Homeostazı ve Önemi

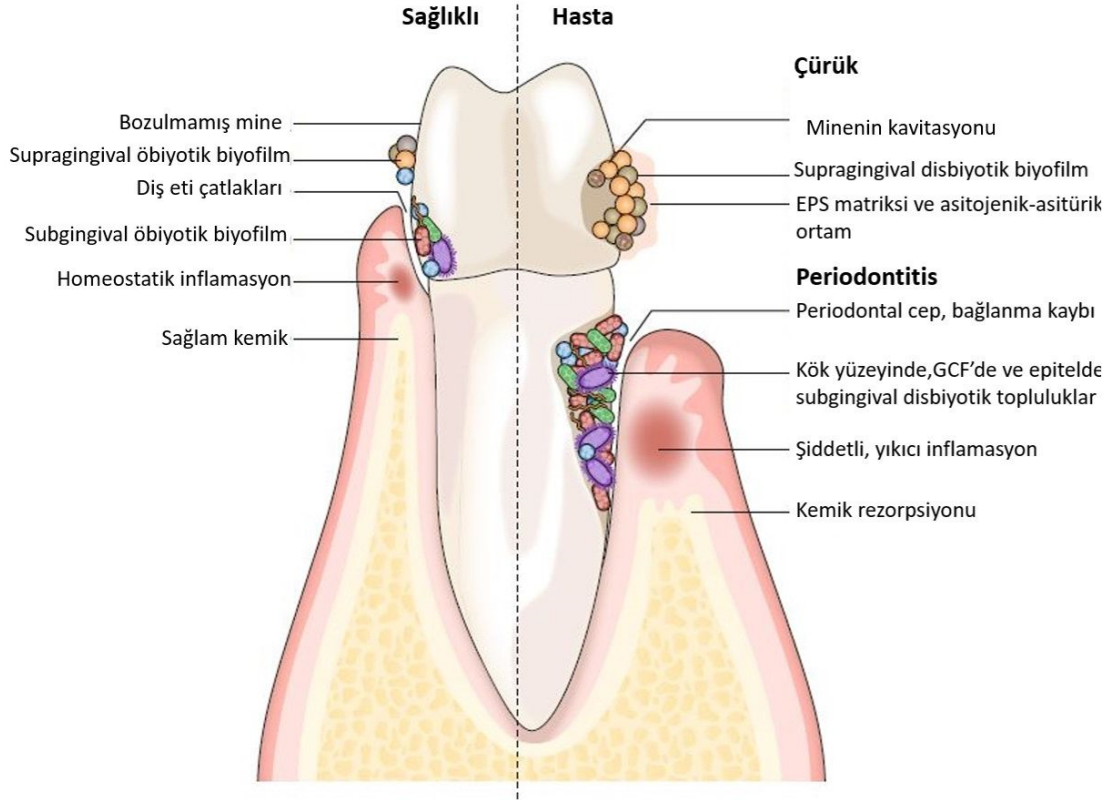
Bireyin doğumundan hemen sonra ağız boşluğu içerisinde mikroorganizmaların kolonileşmeye başladığı ve yaşam boyu bu sürecin devam ettiği bilinmektedir. Ağız boşluğu; diş, bukkal mukoza, yumuşak veya sert damak ve dil gibi farklı birçok mikrobiyal nişleri kapsayan karmaşık ekolojilere sahip bir ortamdır (Şekil 1.1.). İnsan ağız boşluğu, yaklaşık 35-36°C arasında sabit bir sıcaklığa sahiptir. Ağız içerisinde bulunan tükürük salgısı ise ağız mikrobiyal bir yaşam alanı olarak etkileyen ağız içerisindeki yüzeyleri çeşitli şekillerde yıkamakta, yüzeyleri nemli tutmakta ve pH'yı birçok mikroorganizma için optimal olan 6,75 ile 7,25 arasında sabit tutmaktadır. Tükürük ayrıca ağız içerisindeki patojen mikroorganizmalarla kolonizasyonuna karşı oral savunmasında kilit bir rol oynamaktadır (Haukioja, 2009). Ağız boşluğu çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından sürekli olarak istila edilen bir niş olup, mikrobiyal inflamasyonlara karşı oldukça hassas bir bölgedir. Streptococcus mutans, diş çürümelerine en çok neden olan öncül bir patojen olarak tanımlanmaktadır. Periodontal hastalıklar ise Porphyromona gingivalis, Treponema denticola ve Tannerella forsythia gibi mikroorganizmaların kolonizasyonu sonucu meydana gelmektedir (Saha, 2014).



Şekil 1.1. Ağız boşluğunun önden görünümü, Ansiklopedi Britannica, Inc., 9 Aralık 2019 tarihinde <https://www.britannica.com> alınmıştır.

Ağız boşluğu, gastrointestinal sistemin mukozal yüzeylerinde solunum yolunun sürekliliğini sağlayan mikrobiyotanın karşılayıcısı olarak kritik bir rol oynamaktadır. Ağız, mikrobiyotası ağız boşluğunun farklı bölgelerine lokalize olan yaklaşık 700 bakteri türünden oluşmaktadır (Şekil 1.2.). Ağız mikrobiyotasının homeostazının bozulması (disbiyozis) neticesinde bir çok hastalık meydana gelmekte ve bu hastalıklar ağız boşluğunda ötesinde tüm vücudu etkilemektedir. Ağız mikrobiyotasının homeostazının denge değişimi, kardiyovasküler hastalıklardan, felç, anormal gebelik, diyabet, aspirasyon zatürre, kanser ve Alzheimer hastalığına kadar birçok sistemik ve kronik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Orta yaşlı bireylerde yapılan çalışmalarda oral enfeksiyonun ölüm riski ile ilişkili olduğuda

belirtilmektedir. Bu nedenle ağız mikrobiyota homeostazını sağlıklı yönde dengede tutmak sürdürülebilir sağlık koşulları için oldukça elzemdir (Arnold ve Ribeiro, 2019).



Şekil 1.2. Ağız boşluğunun farklı bölgelerinde mikrobiyota kolonizasyonunun biyocoğrafyası (Lamont, Koo ve Hajishengallis, 2018)

1.2. Ağız Sağlığı ve Yaygın Hastalıklar

Ağız, vücudun farklı bölgelerinde meydana gelen ve genel sağlık bozukluklarının sinyallerini veren bir “pencere” işlevi görmesi açısından oldukça önemli kabul edilmektedir. Bu nedenle ağız sağlığının kontrolü ve tedavisi oldukça önem arz etmektedir. Ağız hastalıkları çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. Patojen bakterilerin gelişimi, diş yüzeylerinde biyofilm oluşumu ve iltihaplanma gibi önemli faktörler hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Saha, 2014). Bununla birlikte, yüksek karbohidrat alımı, bazı stres durumları gibi faktörlerden dolayı mikrobiyotadaki bozulmalar disbiyozisi meydana getirmekte ve ağız hastalıklarının gelişmesine yol açabilmektedir (Arnold ve Ribeiro, 2019). Ağız hastalıkları büyük ölçüde önlenebilir olmasına rağmen, sosyal, ekonomik ve ticari değişikliklerle bağlantılı olarak birçok düşük ve orta gelirli ülkelerde artan prevalansları nedeniyle endişe yaratan küresel bir halk sağlığı sorunu olmaktadır. Bununla birlikte, küresel halk sağlığı önem sırasında diş çürüğü, periodontal hastalıklar ve oral kanserler ilk sıralarda

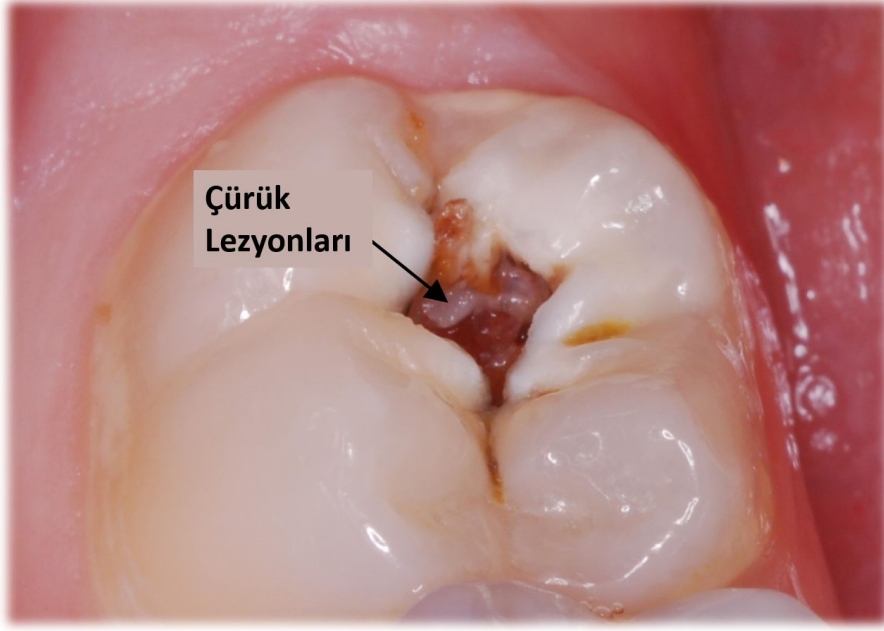
bulunmaktadır (Peres ve diğeri, 2019). Özellikle diş çürüğü ve periodontal hastalıklar, dünya nüfusunun büyük bir bölümünü etkilemektedir. Periodontal hastalık, küresel kronik hastalık yüküne katkıda bulunan en önemli iki ağız hastalıklarından biridir. Dünya çapında oldukça yaygın olup ülkeler için önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Periodontal hastalıkların prevalansı yetişkinlerde %15-20 arasında iken, diş çürüğü için prevalans değeri neredeyse %100 oranında seyredilmektedir. 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 da bilinmektedir (Nasajpour ve diğeri, 2018).

Son Global Hastalık Yüğü Çalışma raporunda ağır periodontitisin dünya genelinde en yaygın 6. hastalık olduğu, yaklaşık 743 milyon insanın bu hastalıktan etkilendiği ve küresel periodontal hastalık yükünün 1990'dan 2010'a kadar %57,3 oranında arttığı belirtilmektedir (Tonetti, Jepsen, Jin ve Corgel, 2017). Dünya Sağlık Örgütü, periodontal hastalıkların, çoğu sanayileşmiş olan ülkelerde, tedavi masrafları açısından dördüncü en pahalı hastalık olduğunu tahmin etmektedir. 27 Avrupa Birliği üyesi ülkelerdeki ağız sağlığı hizmetlerine yönelik yapılan yıllık harcamaların 79 milyar Euro olduğu belirtilmektedir (2008–2012 yıllık ortalaması). Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nin tek başına 110 milyar dolardan fazla para harcadığı rapor edilmektedir (Listl, Galloway, Mossey ve Marcenes, 2015). Avrupa'nın, 2016 yılında %27,8'lik bir pay ile küresel diş zarı ve kemik grefti pazarına hükmettiği bilinmektedir. Tahmini olarak, %9,3'lük güçlü artış payı oluşması durumunda, diş zarı ve kemik grefti pazarının 2015 yılındaki 419 milyon dolardan, 2024 yılında 922,6 milyon dolara yükselmesi beklenmektedir. Teknolojideki hızlı inovasyonun ve artan hasta sayısının bu pazarı hareketlendireceği belirtilmektedir (Araştırma ve Market Analizleri Raporu, 2018).

1.2.1. Diş Çürüğü

Diş çürüğü, diş plağındaki mikroorganizmaların metabolik olayları sonucunda meydana gelen asit temelli metabolitlerin, dişin mine ve dentin bölgesinin demineralizasyonuna ve organik dokularının tahrip olmasına yol açan bulaşıcı bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.3.). Diş çürüğünün dünyadaki en yaygın kronik hastalıklardan biri olduğu bilinmektedir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde diş çürüğünün prevalansı ve dağılımı değişmekle birlikte, gelişmiş ülkelerde son kırk yılda diş çürüğü vakalarında bir düşüş gözlemlendiği bilinmektedir. Bu azalma; florürlerin kullanımı,

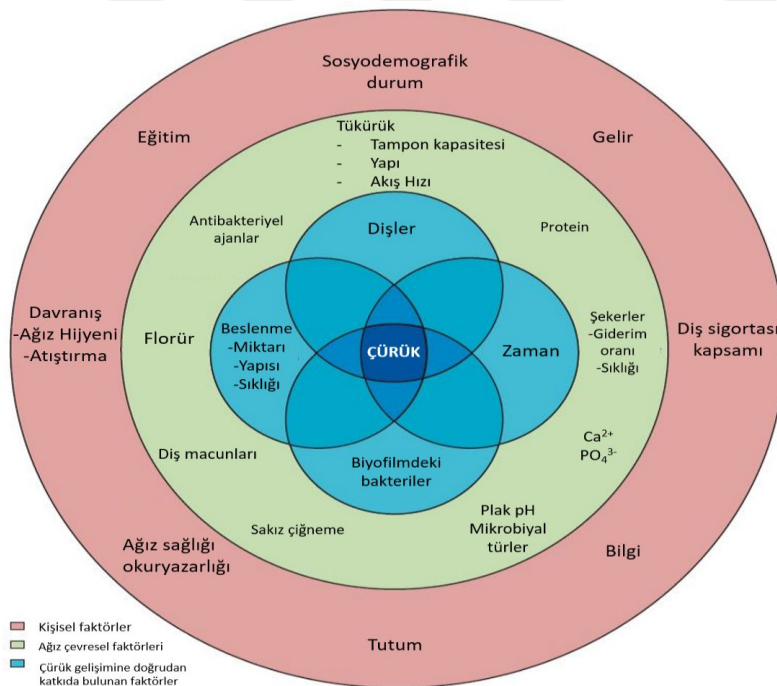
yaşam tarzlarındaki değişiklikler, gelişmiş ağız hijyeni uygulamaları, koruyucu diş hekimliği hizmetleri ve tanı kriterlerindeki değişikliklerle ilişkilendirilmektedir (Alm, 2008).



Şekil 1.3. Molar diş çatlağında meydana gelen çürük (Gorseta, 2015)

Ağız boşluğunda, dişlerin mineral yüzeyi ile tükürük bileşenleri arasında kalsiyum, fosfat gibi iyonların ve çeşitli metabolitlerin değişimi sürekli olarak gerçekleşmektedir. Normal koşullarda, demineralizasyon ve remineralizasyon işlemleri dengede olmaktadır. Diş plağının bir parçası olan mikroorganizmaların, besinler aracılığı ile alınan karbohidratı metabolize etmesi sonucunda asit meydana gelmektedir. Bu durum tükürük tamponlama kapasitesinin düşmesine ve düşük pH'lı bir ortama sebebiyet vermektedir. Meydana gelen asit ile ağız içerisindeki pH kritik bir değerin altına düştüğünde ise mineral kaybı yeniden yapılanmaya göre daha yüksek olmaktadır. Bunun sonucunda mine, dentin veya sementumun demineralizasyonu meydana gelmektedir. Tükürük kalitesi ve miktarından etkilenecek gerçekleşen demineralizasyon, diş minesinin kronik ve aşamalı olarak tahrip olmasına neden olmaktadır. Bu aşama, diş çürüğü için mikroyapısal bir başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir. Bakteri profili, zaman, hassas diş yüzeyi ve fermentatif karbohidratlar gibi önemli dört ana faktörün diş çürüğü etiyolojisi ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu faktörlerin yanı sıra ağız hijyeni, yaş, uygun olmayan diş fırçalama alışkanlıkları, davranışsal ve sosyodemografik faktörler çürük riskini arttırmaktadır (Ashi,

Streptococcus mutans diş çürümelerine neden olan en önemli bakteri türüdür. *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Veillonella spp.* ve *Atopobium spp.* gibi mikroorganizmalar ise bu hastalığın etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Diş plağı, diş yüzeyine yapışan yapışkan bir madde olup, diş çürüğünün ana nedeni de olan karmaşık bir biyofilm olarak kabul edilmektedir. *Streptococcus mutans* tarafından sükröz fermentasyonu sonucu üretilen dekstran, diş plaklarının yapışkanlığından sorumludur. *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. constellatus*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. intermedius* ve *S. oralis* diş plağı ile ilişkili asite toleranslı başlıca bakterilerden bazılarıdır (Tahir ve Nazir, 2018). Birçok çalışma, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un diş çürüğü için öncül faktörler olduğunu düşünmektedir. Ayrıca sükröz, biyofilm oluşumunu ve yapısını belirleyen iki bileşen olan hücre dışı ve hücre içi polisakkaritlerin üretimi için önemli bir substrattır. Bu nedenle günlük beslenmede fermente edilebilir şekerlerin sürekli alınması, laktik asit üretimi ile sonuçlanan, düşük pH periyodunun devam etmesine sebep olmaktadır (Arnold ve Ribeiro, 2019).

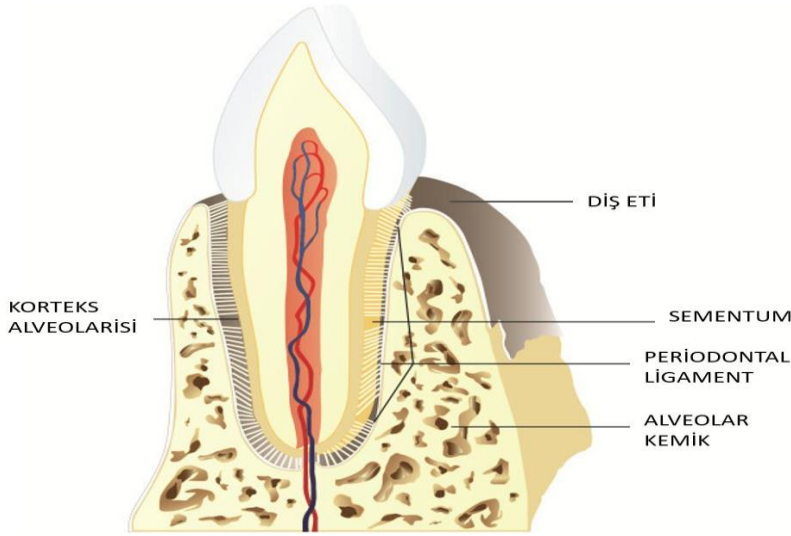


7

Diş çürüğünün meydana getirmiş olduğu komplikasyonlar diş yüzeyinin haricinde dişin kök kısmına kadar uzanabilmektedir. Gelişiminde bir çok faktörün rol oynadığı çürük olgusu yaşam kalitesi, beslenme ve birçok hastalık üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır (Şekil 1.4). Bu nedenle hastalığın önlenmesi oldukça önemlidir. Diş plağında bulunan bakterilerin antibakteriyel ajanlar kullanılarak ağız boşluğundan elimine edilmesi çürüklerden korunmak amacıyla kullanılan başlıca stratejilerden biridir. Erken diş çürüğü belirtilerinin tespitinde, çürükten etkilenen diş yüzeylerindeki plağın sık sık bir diş fırçası, florürlü diş macunu ve diş ipi ile çıkarılması birincil koruyucu yöntem olarak uygulanmaktadır. Şekerli atıştırmalık ve içeceklerin tüketimini kısıtlayan tavsiyeler, genel beslenme danışmanlığının bir parçası olarak tüm hastalara verilmelidir. Dünya genelinde sıklıkla florür tedavisi kullanılmaktadır. Ancak florürün, plak mikrobiyotası üzerindeki etkisinin profesyonel diş temizliği ve beslenme danışmanlığı ile birlikte kullanıldığında bile yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. Önlenemeyen diş çürüğünün meydana getirdiği tümüyle oyulmuş olan lezyonların tespiti ve tedavisi için uygun bir diş hekimi profesyoneline yönlendirilmesi, ikincil bir koruyucu yöntem olarak uygulanmaktadır (Ashi, 2017; Selwitz ve diğerleri, 2007).

1.2.2. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalıklar, dişleri destekleyen diş eti veya dişleri çevreleyen yumuşak doku, kemik ve bağ dokusu gibi çeşitli bölgelerin kronik inflamatuvar oluşumunu kapsamaktadırlar. Periodonsiyumu oluşturan bu dokular kök yüzeyinin sementumunu, çenenin alveoler kemiğini, periodontal ligamenti ve diş etini içermektedir (Şekil 1.5.). Gingivitis, pre-implant mukozit, kronik periodontitis, pre-implantitis, nekrotizan ülseratif dişeti iltihabı ve periodontitis, agresif periodontitis ve sendromik kronik periodontitis periodontal hastalıkların alt basamaklarını oluşturmaktadırlar. Periodontal hastalıklar tahribatsız ve tahrip edici olmak üzere iki forma ayrılmaktadır. Dişeti iltihabı olarak bilinen gingivitis tahrip edici olmayan bulaşıcı bir periodontal hastalık olup yumuşak dokuların iltihaplanması ile karakterize edilmektedir. Periodonsiyumun tahrip olmasına neden olan periodontitis ise bazı sistemik hastalıklar için potansiyel bir risk faktörü oluşturmaktadır. Periodontal hastalıkların başlangıçlarında ve ilerlemelerinde bakteriler önemli bir rol oynamaktadır. Gingivitis ve periodontitis, periodonsiyumu etkileyen mikrobiyal etiyolojili en sık görülen hastalıklardır (Gao ve diğerleri, 2018; Haukioja, 2009; Kinane, Stathopoulou ve Papapanou, 2017; Loesche ve Grossman, 2001; Toiviainen, 2015).



Şekil 1.5. Periodonsiyumun Yapısı (Cafiero ve Matarasso, 2013)

Gingivitis (Diş Eti İltihabı)

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. Periodontal hastalıklar diş yüzeyi ve dişeti üzerinde oluşan mikrobiyal bir biyofilm olan diş plağındaki bakterilerin meydana getirdiği lokalize iltihaplı gingivitis ile başlamaktadır. Gingivitis dünyadaki yetişkinlerin %30-50'sini etkileyen hafif periodontal bir hastalık olarak bilinmektedir. Gingivitise diş etinde bölgesel olarak biriken bakteriyel bir biyofilm olan diş plağı neden olmaktadır. Hafif bir periodontitis şekli olsa da akut veya kronik bir durumda dişleri destekleyen sert dokuların kaybı olmadığından geri dönüşümlü bir olgu olarak kabul edilmektedir. Ancak gerekli ağız bakım uygulamaları yapılmadığı takdirde diş eti iltihabı sonrasında kanama ilerlemekte ve devam eden dönemlerde periodontitise yol açmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda gingivitis, periodontitise dönüşmeden uzun süre boyunca kalıcı olabilmektedir. Kronik periodontitise geçiş, konakçı savunmasının bozulması, diş eti bölgesine yeni gelen bir patojenin enfeksiyonu ve çoğalması ya da konakçı dokusuna zarar veren immün yanıtların aktivasyonu nedeniyle plak türlerinin seçici olarak büyümesi sonucu gerçekleşmektedir (Gao ve diğerleri, 2018; Haukioja, 2009; Kinane ve diğerleri, 2017; Loesche ve Grossman, 2001; Singh, 2013; Toiviainen, 2015).

Diş yüzeyindeki plak birikimi ve patojen mikroorganizmaların yanı sıra sigara, obezite, stres, diyabet, osteoporoz, D vitamini ve kalsiyum eksikliği gibi birçok faktörde gingivitise sebep olmaktadır. Özellikle hamilelik, ergenlik, menopoza ve aylık menstrüasyon

sırasında meydana gelen hormonal değişiklik süreçleri diş etlerini daha hassas hale getirmekte bu da dişeti iltihabının gelişmesini kolaylaştırmaktadır. Bağışıklık sistemine müdahale eden kanser ve HIV gibi hastalıklar da diş eti olgusunun derecesini etkilemektedir. Bununla birlikte diş etleri üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olan tükürük akışını azaltan bazı ilaçlarda ağız sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Diş plağının ve sonrasında oluşan diş eti iltihabının önlenmesi için dişlerin düzenli fırçalanması ve diş ipi, gargara gibi ağız bakım ürünlerinin kullanılması gerekmektedir. Düzenli olarak diş hekimini ziyaret etmekte ağız sağlığının korunmasında anahtar bir öneme sahiptir. Bu uygulamaların düzenli olarak takip edilmesi hem çürük hem de diş eti hastalıklarının önlenmesine yardımcı olmaktadır (Safiaghdam, Oveissi, Bahramsoltani, Farzei ve Rahimi, 2018).

Periodontitis

Periodontitis 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 1.6.). Periodontitis temelinde bakterilerin önemli rol oynadığı çok faktörlü bir etiyolojiye sahiptir. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi bakteriler periodontitise sebep olan önemli bakteriler olarak kabul edilmektedir. Ayrıca periodontitisli bireylerin %50'sinin hastalık gelişimi için genetik faktörlere sahip olduğu tahmin edilmektedir (Gao ve diğerleri, 2018; Haukioja, 2009; Holmlund, Lumpa ve Lind, 2017; Kinane ve diğerleri, 2017; Loesche ve Grossman, 2001; Toiviainen, 2015).



Şekil 1.6. a. Sağlıklı periodontal doku, b. Orta kesici dişler arasındaki diş etinde erken diş eti iltihabı, c. Kronik periodontitisin klinik görünümü, doku kaybı ve hastalığın ayırt edici özelliği olan derin “periodontal cepler” (Kinane ve diğerleri, 2017)

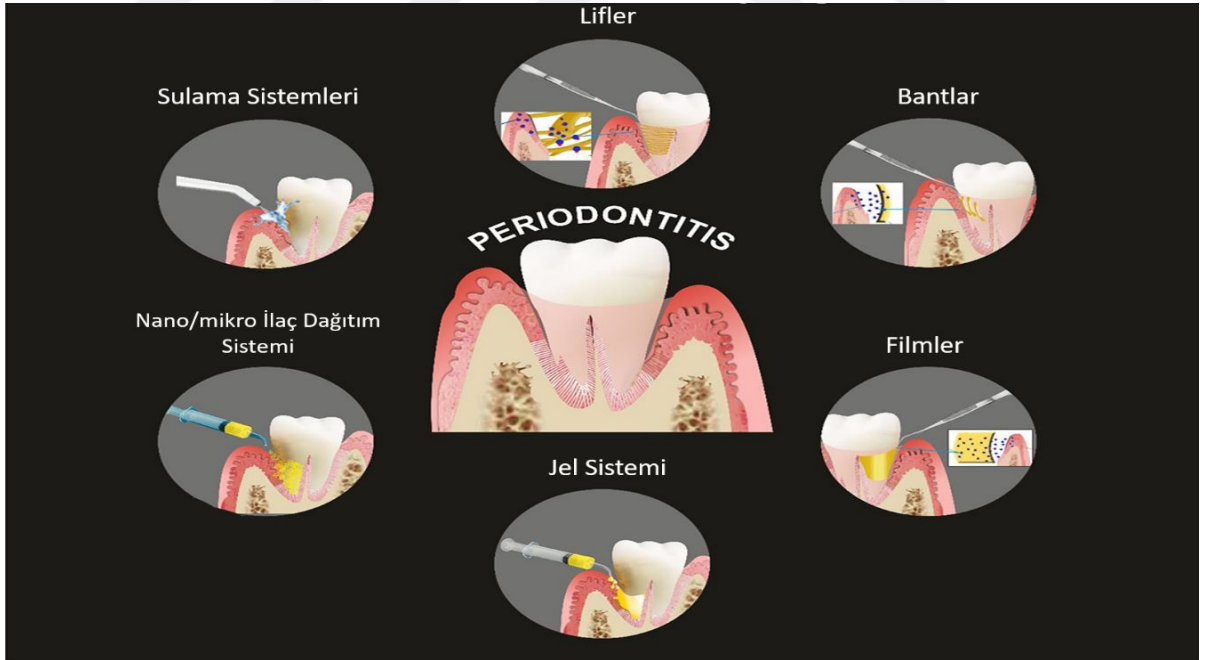
Konakçının hassas olması, patojenik türlerin varlığı veya faydalı bakterilerin azlığı gibi faktörler hastalığın etiolojisinde oldukça önemlidir. Sağlıklı dişeti sulkusu, Gram pozitif kokların, özellikle *Streptococcus spp.* ve *Actinomyces sp.* türlerinin eşit oranda baskın olduğu bir mikrobiyotaya sahiptir (Kesic, Milasin, Igic ve Obradovic, 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).

1.3. Periodontal Hastalıkların Tedavi Yaklaşımları

Periodontal tedavinin ilk hedefi enfeksiyon ve inflamasyonu kontrol altına almak ve sonrasında tüm destekleyici yapı ve dokuların (diş eti, PDL, sementum ve alveolar kemik) fonksiyonel ve estetik açıdan iyileşmesini sağlamaktır. Periodonsiyumun onarımı ve periodontal dokuların yenilenmesi periodontal hastalığın tedavisinde temel bir amaç olmaya devam etmektedir. Ancak periodontal hastalığın ardından periodontal dokuların tamamen yenilenmesi karşılanmayan bir sorun olarak öne çıkmaktadır. Periodonsiyumda bir sorun olduğunda periodontal onarımın tamamen gerçekleşebilmesi için sementogenez, osteogenez aşamalarının tamamlanması ve PDL liflerin oluşması gerekmektedir. Periodontal onarım için kullanılan mevcut stratejiler arasında diş taşı temizliği ve kök düzeltilmesi, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (kemik grefti olan veya olmayan) veya büyüme faktörlerinin kullanımı gibi önlemler yer almasına rağmen bu yaklaşımların hiçbiri periodonsiyumun yapısını tamamen geri getirememektedir (Zeichner-David, 2006). Periodontal rejenerasyon, birbirinden oldukça farklı ve benzersiz üç dokunun (sementum, PDL ve kemik) öngörülebilir bir şekilde yenilenmesini ve karmaşık yapılarının restorasyonunu gerektirmektedir. Dolayısıyla farklı dokular arasında üç fazlı bir ara yüzün oluşturulmasını gerektirdiğinden oldukça zor gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, tekli veya kombinasyon halinde kullanılan mevcut stratejiler özellikle ileri periodontal defektlerde rejenerasyon gibi iddialı bir amaca ulaşmak için sınırlı başarıya sahip olabilmektedir (Chen, Sun, Lu ve Yu, 2012).

Geleneksel olarak periodontal hastalık tedavisi cerrahi olmayan periodontal tedavi, cerrahi prosedürler, restoratif tedavi ve destekleyici bakım dahil olmak üzere dört aşamalı bir yaklaşımdır. Periodontal tedavide en önemli amaç diş plağının patojenik potansiyelinin

ortadan kaldırılması veya azaltılmasıdır. Meydana gelen patojenik komplikasyonların tedavisinde ise antibiyotik olarak adlandırılan ve genelde patojen mikroorganizmanın türüne özgü olmayan antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır (Stamatova, 2010). Periodontitis tedavisinde antibiyotiklerin oral uygulaması birçok sistemik yan etkiyi beraberinde sunmaktadır. Ağız yolu ile alınan ilaçların hastalık sonucu oluşan periodontal cebe ulaştığı konsantrasyonu yetersiz olmakta ve konsantrasyon hızlı bir şekilde subterapötik seviyeye düşmektedir. Alınan ilaçların direkt olarak periodontal cebe lokal olarak verilmesi kullanılan en etkili yöntemlerden biridir. Kontrollü lokal ilaç dağıtım yaklaşımı, sistemik yaklaşıma kıyasla daha uygun olmaktadır. Periodontal cep içerisine hedefe özgü geliştirilen ilaçların farklı dağıtım stratejileri bulunmaktadır (Şekil 1.7.). Hedefe özgü direkt uygulamalar neticesinde daha düşük dozlarda ilaç kullanılarak gastrointestinal sistem gibi farklı bölgelerde olumsuz etki yaratmadan başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bununla birlikte periodontal cep doğal bir rezervuar görevi gördüğünden dolayı tıbbi bir cihazın takılması da hedefe özgü ilaç erişimini kolaylaştırabilmektedir. Cepte ilaç salınımı ve dağıtımı, süzme ortamı olarak görev yapan gingival krematik sıvı (GKS) ile sağlanmaktadır. Ayrıca, GKS’de uzun süre boyunca önemli ilaç seviyeleri korunmaktadır (Barça, Çıfcıbaşı, ve Çintan, 2015).

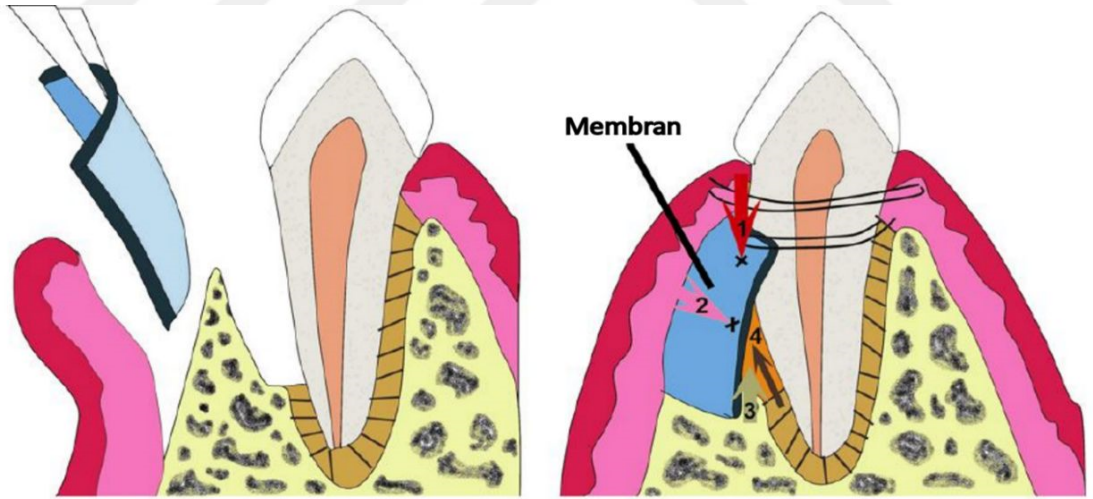


Şekil 1.7. Periodontal cep içine ilaç dağıtımı için mevcut uygulama yöntemleri (Rajeshwari ve diğerleri, 2019)

Tüm bu faktörler cep içerisine ilaç dağıtımını ideal bir seçenek haline getirmektedir. Hastalığın etiyolojisi ve patogenezi hakkında bilgi birikimi ile birlikte birçok dozaj formu

geliştirilebilmektedir. Kontrollü lokal ilaç dağıtımı genel olarak hastanın uyumunu artıran güvenli ve etkili bir tedavi şekli sunmaktadır. Mikroorganizmaların bölgelerden tamamen yok edilmesi, çeşitli cerrahi ve mekanik tedaviler kullanılarak gerçekleştirilememektedir. Bu nedenle, çeşitli doğal ve sentetik malzemelerden yapılan lifler, filmler, çipler, şeritler, mikropartiküller, nanopartiküller ve nano lifler gibi polimer bazlı çeşitli ilaç uygulama sistemleri sunmak için test edilmektedir. Bu sistemler biyo-uyumlu ve biyo-bozunur, cepleri tamamen doldurabilen ve kusursuz muko/adezyon özellikleri nedeniyle hedef bölgede etkili olmaktadır (Joshi, Garg, Goyal ve Rath, 2016).

Diğer bir yaklaşım olan yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) tedavisi, kaybedilen periodontal dokuları yeniden oluşturmaya çalışan prosedürleri içermektedir (Şekil 1.8.). Diş eti temizlenmiş kök yüzeylerine tekrar temas etmemektedir, çünkü epitel hücreler hastalıklı iç cep duvarlarının çıkarılmasından hemen sonra yara alanını çok hızlı kaplamaktadırlar. Periodontal yapıları oluşturan hücreler yara alanına daha yavaş göç ettiği için bu dönemde düzelememektedir. Hem PDL hücrelerinin hem de kemik yapılarının çoğalmasını ve oluşturulmasını sağlamak için defekt ile kök yüzeyi arasındaki boşluğun korunmasını sağlayan çeşitli özelliğe sahip membranlar o bölgeye konmaktadır (Şekil 1.8.).

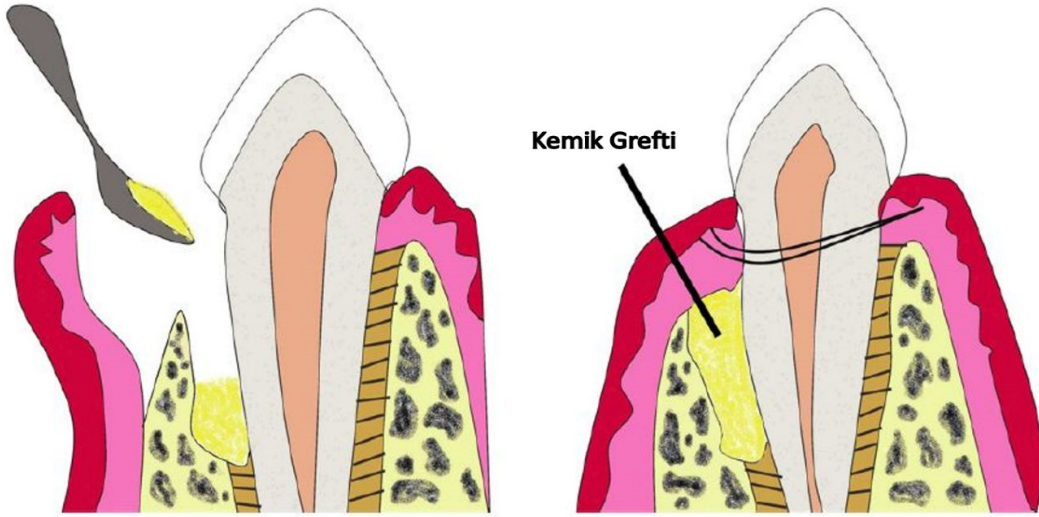


Şekil 1.8. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ve membran kullanımı (Chen ve diğerleri, 2010)

YDR’de bariyer olarak kullanılacak malzemelerin; doku entegrasyonu, hücre tıkanıklığı, klinik yönetilebilirlik, PDL ve kemik hücrelerinin defekt içerisinde yeterince çoğalması için uzun süre korunabilirlik ve biyo-uyumluluk gibi beş ana kriteri sağlaması gerekmektedir. YDR prosedürlerinde güvenlik ve etkinlikleri açısından kolajen, kargil, poliaktik, poliglikolik, poliglaktin kopolimer asit, okside selüloz ağ, otojen periosteal,

laminer kemik allogreft gibi membranların başarıyla test edildiği bilinmektedir (Siaili, Chatzapoulou ve Gillam, 2018).

Kemik replasman greftleri kemik oluşumunu ve periodontal rejenerasyonu desteklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.9.). Eksik kemiği hastanın kendi vücudundan (otojen kemik) veya yapay, sentetik veya doğal bir bileşen ile değiştiren cerrahi bir prosedürdür. Kemik greftleme materyalleri ayrıca periodontal defektlere yerleştirildiğinde koordine kemik, sementum ve PDL oluşumunu teşvik etmek için değişken bir kapasite göstermektedir. Kemik aşılama materyalleri, biyo-uyumluluk ve osteo-iletkenlik özelliklerine sahip olmalıdır. Kemik replasman greftlerinin osteogenezi destekleyen başka özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir. Süngerimsi kemik/kemik iliği gibi osteojenik aşılama materyalleri, farklılaşma ve kemik oluşumu yapabilen canlı hücreler içermektedir. Demineralize kemik matrisi gibi osteoindüktif aşılama materyalleri, mezenkimal kök hücrelerin ve diğer osteoprogenitör hücrelerin osteoblast kökenine doğru ilerlemesini sağlayan biyolojik bir uyarıcı (proteinler ve büyüme faktörleri) sağlamaktadır.



Şekil 1.9. Kemik greftlerinin kullanımı (Chen ve diğerleri, 2010)

Otogreftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik greftler (sentetik/yarı sentetik materyaller) dahil olmak üzere, geniş bir yelpazeye sahip olan kemik greftleme materyalleri klinik olarak uygulanıp değerlendirilmektedir. Tüm kemik greftleme materyalleri yeni bir periodontal bağlantı aparatının oluşumunu desteklemese de insanlarda kemik replasman greftleriyle periodontal rejenerasyonun mümkün olduğuna dair kesin kanıtlar sunmaktadır (Reynolds, Aichelmann-Reidy ve Branch-Mays, 2010).

Periodontal tedavinin amacı cep derinliğini azaltmak, doku kaybı sonrası hücrelerin bağlanma seviyesini kazanmak ve kanamayı azaltmaktır. Periodontal tedavinin etkilerini güçlendirmek amacıyla sistemik antibiyotikler gibi protokoller başarıyla kullanılmaktadır. Ancak giderek artan antibiyotik direnç sorunu, antibiyotiklerin sadece patojenler üzerinde değil faydalı mikrobiyota üyeleri üzerinde de inhibitör etki göstermesi ve tüketicilerin daha doğal tedavi yaklaşımlarına yönelmesi gibi faktörler yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yönelik çalışmaların hız kazanmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan hiyalüronik asit, kitosan, aljinat ve pektin gibi doğal malzemeler jeller, filmler, boncuklar, süngerler ve iskeleler gibi çeşitli formlarda hazırlanabilmekte ve biyo-uyumluluk ve biyo-bozunur özellikleri ile birlikte immünomodülasyon, antimikrobiyal ve osteojenik aktiviteler sergilemektedirler. Bu malzemelere alternatif düşük maliyetli ve multifonksiyonel malzeme arayışı hala araştırmaların odak noktasıdır. Bu çalışmada potansiyel probiyotik özelliklere sahip LAB tarafından üretilen doğal metabolitler olan PM'lerin bu alandaki kullanım potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır (Chantarawaratit, Sangvanich, Banlunara, Soontornvipart, ve Thunyakitpisal, 2014).

1.4. Probiyotikler

Probiyotikler, yeterli miktarda tüketildikleri takdirde konak sağlığı üzerinde olumlu etkiler sağlayabilecek canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin bu tanımı 2001 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır (FAO/WHO 2002). Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait birçok cinsin üyelerinin de dahil olduğu probiyotik bakteriler arasında, en temel üyeler *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait bakterilerdir. LAB türlerinin en önemli avantajı yüzyıllardır tükettiğimiz gıdalar içerisinde doğal olarak bulunmaları ve tüketimlerinin güvenilir kabul edilmesidir (GRAS). Bir bakteri kültürünün probiyotik olarak kabul edilebilmesi için başlıca aranan güvenilirlik kriteri arasında; hemolize neden olmaması, antibiyotik dirençliliğine sahip olmaması ve sitotoksik etki sergilememesi gibi önemli özellikler yer almaktadır (Markowiak ve Sliawska, 2017; Presti ve diğerleri, 2015; Vinicius ve diğerleri, 2018).

Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları arasında; hedef hücrelere tutunabilme ve kolonizasyon, antimikrobiyal maddeler üretme, patojenik tutunmayı engelleme ya da azaltma gibi etkinlikler yer almaktadır. Bu etkinlikleri ile özellikle bağırsaklara gıda veya çevre kaynaklı yollarla ulaşan *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*

enteritidis, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Yersinia* türleri gibi patojenik bakterilerin gelişimini etkili bir şekilde inhibe edebilmektedirler. Patojenlere karşı savaşın yanı sıra probiyotiklerin mevcut mikrobiyotayı dengeleme gibi önemli özellikleri de bulunmaktadır. Özellikle antimikrobiyal tedavi sonrasında, probiyotik takviyeler önerilmektedir. Takviyelerin yanı sıra, fermente ürünlerin üretiminde de kullanılabilen probiyotikler günlük olarak sağlıklı beslenme amacıyla da tüketilebilmektedir (Markowiak ve Slizewska, 2017).

Son yıllarda probiyotiklerin bağırsak hastalıklarının önlenmesi, bağışıklık sisteminin iyileştirilmesi, laktoz intoleransı ve bağırsak mikrobiyal dengesinin korunması, anti-hiperkolesterolemik ve anti-hipertansif etkileri, postmenopozal rahatsızlıkların hafifletilmesi, çeşitli kalp damar hastalıkları, alerji gibi bağışıklık sistemi temelli hastalıklar, obezite ve diş eti hastalıklarına karşı potansiyel kullanımları gibi birçok önemli etkinlikleri rapor edilmiştir (Shi, Balakrishnan, Thiagarajah, Mohd Ismail, ve Yin, 2016).

Ağız boşluğu hem yumuşak hem de sert dokulara sahip anatomisi ve fonksiyonel bütünlüğü ile kompleks bir ekosistemdir. Probiyotik mikroorganizmaların ağız ve diş sağlığı alanında kullanımı oldukça yeni bir kavramdır. Son yıllarda hız kazanan çalışmalar, probiyotiklerin ağız ve diş sağlığı üzerindeki potansiyel etkinliklerine dikkat çekmektedir (Stamatova, 2010). Probiyotik uygulamalar; ağız boşluğundaki önemli patojenlerin gelişimini engellemekte ve diş çürümelerini, periodontal hastalıkları ve ağız kokusunu kontrol altına alabilmektedir. Etki mekanizmalarının başında, probiyotiklerin patojenler ile ağız boşluğunda bulunan tutunma yüzeyleri ve besinler için yarışması, antimikrobiyal bileşenler üreterek patojen gelişiminin engellenmesi ve konak bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gelmektedir (Morales, Bravo-Bown, Bedoya, ve Gamonal, 2017). Montero ve diğerleri (2017), dişeti iltihabının tedavisinde probiyotik bir kombinasyonun etkinliğini ve subgingival mikrobiyota üzerindeki etkisini değerlendirmek için gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus fermentum*'un ağız boşluğundaki prevalansının kronik periodontitisli hastalara kıyasla sağlıklı katılımcılarda daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Bu bakterilerin önemli diş eti patojenleri karşı da inhibitör etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Son zamanlarda oral probiyotikleri içeren pastil, tablet, sakız, kapsül, gargara ve diş macunu ürünlerinin marketlerde yerini alması, ağız ve diş sağlığını hedef alan probiyotik pazarını hareketlendirmiştir. Bakteriyosin üreticisi *Streptococcus salivarius* K12 suşu, ağız kokusunu engellemek amacıyla gargara ilave edilmiş ticari bir probiyotik olarak tanımlanmaktadır. Üç farklı probiyotik suşu içeren ve ProBiora3® olarak adlandırılan

gargaranın diş çürükleri ve periodontitis ile ilişkili bakterilerin sayısında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Zahradnik ve diğerleri, 2009). EvoraPlus ise Amerika Birleşik Devletleri'nde ağız ve diş sağlığı için spesifik olarak üretilen ilk probiyotik içerikli tablet ürünüdür. Tablet düzenli günlük kullanımının diş eti ve diş sağlığını olumlu yönde etkilediği, diş beyazlamasına katkıda bulunduğu ve doğal ferah bir nefes sağladığı belirtilmektedir. GUM® Periobalance® ise plak oluşumunu engellemek için nane pastili olarak piyasaya sunulan bir diğer probiyotik üründür. Kanada'da marketlerde bulunan ve BLIS K12 olarak adlandırılan sakız ise ağız ve diş sağlığı için tasarlanmış bir başka probiyotik üründür. PerioBiotic™ ise *Lactobacillus paracasei* suşu ile birlikte ksilitol ve kalsiyum gliserofosfatı içeren bir diş macunudur. Ağız ve diş sağlığını geliştirmek amacıyla üretilen bu ürünün düzenli kullanıldığı takdirde *Streptococcus mutans* sayısında azalmalara neden olduğu belirtilmektedir (Jose, Padmanabhan ve Chitharanjan, 2013; Vivekananda, Vandana ve Bhat, 2010), *Lactobacillus reuteri* içeren pastillerin plak inhibisyonunu, anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal etkilerini tespit etmişler probiyotik sedtekli bu pastilin periodontal tedavinin sürdürülebilirliği açısından önerilebileceği sonucuna varmışlardır.

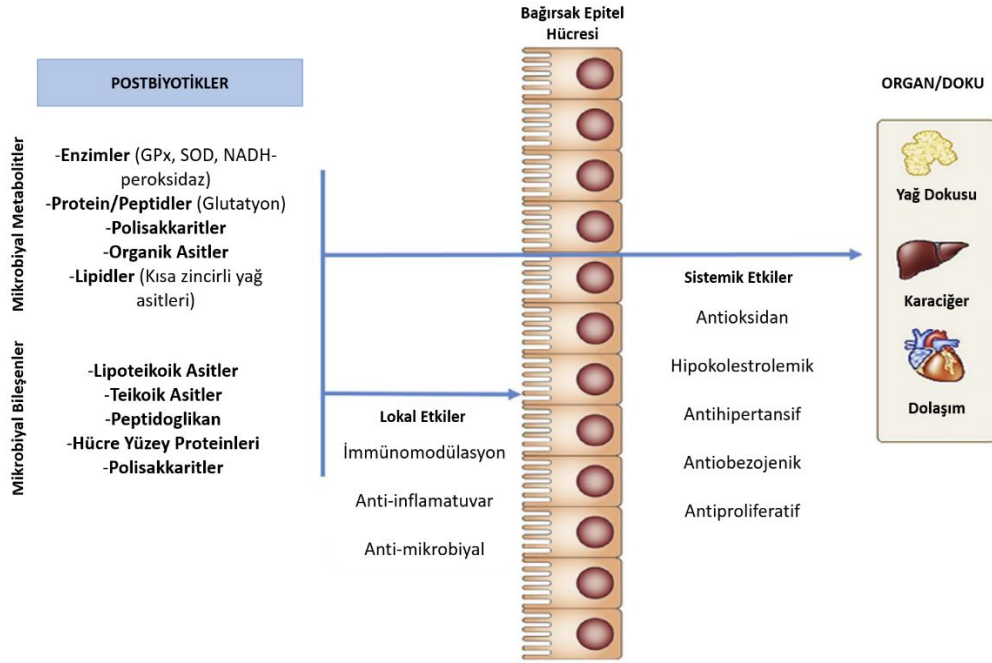
Gerçekleştirilen çalışmalar ve kullanılan ürünlerin etkinlikleri değerlendirildiğinde, probiyotiklerin periodontal hastalıkların tedavisinde alternatif bir yol olarak kullanım potansiyellerinin olduğu dikkat çekmektedir. Günümüzde özellikle ağız bakım uygulamalarında probiyotik kullanımı ivme kazanmıştır. Hedef ağız boşluğunda mikrobiyal dengenin yeniden sağlanması için probiyotikler önerilmektedir (Toiviainen, 2015). Probiyotikler her ne kadar ağız bakım ürünlerine ilave edilerek genel sağlık koşullarını desteklemek için özellikle de dental plak ve ağız kokusunu gidermek amacıyla potansiyel olarak ön plana çıksa da; periodontal hastalıklara karşı etkinlik sergileyebilmeleri için bazı endişeler söz konusudur. Probiyotik etkinliğin hedef bölgede etkili olabilmesi için hedef dokuya direk yayılımın sağlanması oldukça önemli bir kriterdir. Ancak canlı hücrelerin hedef lokasyonda kullanımları sırasında yeterli miktarda hücre canlılıklarını koruyamayacak olmaları ve çok düşük te olsa sepsis riskleri gibi sorunlar periodontal hastalıklar için kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu çalışmada, karşılaşılabilecek muhtemel sorunları en baştan giderebilmek amacıyla; probiyotik kaynaklı PM'lerin bu alandaki kullanım potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.5. Postbiyotik Mediatörler

PM'ler gelişim esnasında canlı bakteriler tarafından üretilen veya bakteriyel lizis sonrasında elde edilen çeşitli enzimler, peptidler, teikoik asitler, peptidoglikan türevli

muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzeyi proteinleri ve organik asitler ile çözünebilen faktörleri (ürünler veya metabolik yan ürünler) içermektedir. PM'lerin farklı formları hem hücre içine hem de hücre dışına üretilmektedir. Hücre duvarı bileşenleri arasında ekzopolisakkarit ve peptidoglikanlar bulunmaktadır. Temel ana metabolitler, laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler, butirik asit, asetat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri, asidofilin, bifidin, reuterin gibi peptit temelli bakteriyosinlerdir. PM'ler aynı zamanda metabiyotikler, biyojenikler veya basitçe metabolitler/HBS (hücre bağımsız süpernatant) olarak da bilinmektedirler. PM'ler açık kimyasal yapıları, güvenli doz parametreleri, uzun raf ömrü ve anti-inflamatuvar, immünomodülatör, anti-obezojenik, anti-hipertansif, hipokolesterolemik, anti-proliferatif ve antioksidan aktiviteye sahip olabilecek çeşitli sinyal moleküllerinin içeriği nedeniyle dikkat çekmektedirler (Şekil 1.10.). Bu özellikler konak mikrobiyotasının homeostazını, metabolik ve sinyal yollarını olumlu yönde etkileyebilmekte ve böylece fizyolojik ve immünolojik reaksiyonları düzenleyebilmektedirler (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018; Malashee, Angadi, Yadav ve Prabha, 2019).

PM'lerin kesin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamasına rağmen özel fizyolojik etkiler sağlayarak konakçı sağlığının iyileştirilmesine katkıda bulunabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir. Yeni PM'lerin keşfedilmesi ve karakterizasyonu bu etki mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunabilecektir. İnsan mikrobiyotasındaki bakterileri ve metabolik ürünlerini anlamak, genel sağlık koşullarını dengelemeyi ve korumayı hedefleyen yeni nesil gıda, takviye ve tıbbi ürünler oluşturmak için gerekmektedir (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018; Chaluvadi, Hotchkiss ve Yam, 2015). Yapılan çalışmaların sonucunda probiyotiklerin anti-mikrobiyaller üretebildiği, hücre adezyon bölgeleri için rekabet ettiği, bağışıklık sistemini modüle ettiği ve toksinleri bozabileceği anlaşılmaktadır.



Şekil 1.10. Bazı postbiyotiklerin konakçıdaki lokal ve sistemik olarak potansiyel etkileri (Aguilar-Toalá ve diğerleri, 2018)

Probiyotiklerin mineral Emilimi, kemik mineral birikimi ve kemik yapısının parametreleri üzerine olan olumlu etkileri (Scholz-Ahrens ve diğerleri, 2007), *Porphyromonas gingivalis* gibi önemli patojenlerin gelişimini inhibe etmeleri, alveolar kemik kaybını azaltmaları, anti-inflamatuvar etkinlikler sergilemeleri (Kobayashi ve diğerleri, 2017), çürük insidansını azaltmaları, periodontitis prognozunu iyileştirmeleri, ağız kokusu azaltmaları probiyotik kaynaklı PM'lerin de bu amaca yönelik kullanım potansiyellerine sahip olabileceğini göstermektedir. (Fierro-monti, Aguayo-Saldias, Lillo-Climent ve Riveros-Figueroa, 2017).

1.6. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler (EPS) çeşitli mikrobiyal gruplar tarafından üretilen modern ve endüstriyel açıdan önemli biyomateriyallerdir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen polisakkaritler biyolojik fonksiyonları dikkate alındığında; hücre içinde depolanan polisakkaritler, hücre yüzeyine sıkıca bağlanan kapsüler polisakkaritler, biyofilm oluşumu ve patojenite için önemli olan hücre dışına salgılanan polisakkaritler olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar. EPS'nin bileşimi, yapısı ve biyolojik fonksiyonları, mikroorganizmanın türüne ve çevresel koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Ates, 2015; Schmid, Sieber, ve Rehm, 2015). 20

EPS'ler ana zincirin bileşimine ve sentez mekanizmalarına bağlı olarak heteropolisakkaritlere (HePS'ler) ve homopolisakkaritlere (HoPS'ler) olmak üzere iki farklı tipte bulunmaktadır. Genel olarak HePS'ler birden fazla monosakarit çeşidine sahip olup hücre içinde sentezlenirken HoPS sadece tek bir tip monosakarit içermekte ve bakteri tarafından salgılanan bir enzim aracılığı ile hücre dışında üretilmektedir. HePS'ler, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* cinsi LAB üyeleri tarafından üretilmektedir. Çeşitli LAB suşları tarafından üretilen HoPS'lerin ve HePS'lerin özellikleri Tablo 1.1.'de ana hatlarıyla verilmektedir (Lynch, Zannini, Coffey ve Arendt, 2018).

HePS'ler şeker polimer zincirinde tipik olarak D-glukoz, D-galaktoz ve L-ramnozun olduğu birden fazla tipte monosakarit ve karbohidrat olmayan grupları içermektedir. Genel olarak HePS'deki farklı monosakkaritlerin sayısı 2-8 arasında değişmektedir. LAB suşları tarafından üretilen HePS'ler; içerdikleri monosakkarit bileşenleri, monosakaritlerin sayısı, monomerler arasındaki bağlantı türlerinin çeşitliliği ve lineer veya dallanmış haldeki zincir yapısı açısından değişkenlik göstermektedir.

Tablo 1.1. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen heteropolisakkaritlerin ve homopolisakkaritlerin özellikleri (Lynch ve diğerleri, 2018)

HOMOPOLİSAKKARİTLER	HETEROPOLİSAKKARİTLER
Tek tip monosakkarit içermektedir.	Birden fazla tipte monosakkarit içermektedir
Temel monosakkaritler: glukoz ya da fruktoz	Temel monosakkaritler: glukoz, galaktoz ve ramnoz
α ya da β bağı içermektedir.	α ve β bağı içermektedir.
Lineer ya da dallanmış şekilde bulunmaktadır.	Dallanmış şekilde bulunmaktadır.
Moleküler ağırlık: > 106 Da	Moleküler ağırlık: 104-106 Da
Temelde <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> ve <i>Weissella</i> tarafından üretilmektedir.	Temel olarak <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Streptococcus</i> tarafından üretilmektedir.
Hücre dışı sükröz veya nişastadan üretilmektedir.	Hücre içi ara maddelerden üretilmektedir.
Yüksek miktarda üretilmektedir.	Düşük miktarda üretilmektedir.
Karbohidrat olmayan grup içermemektedir.	Karbohidrat olmayan grup içermektedir.
Genelde yüklü grup bulundurmamaktadır.	Yüklü gruplar içerebilmektedir.
Öncelikle prebiyotik kapasitesi ile ilişkilendirilmektedir.	Öncelikle immün modülasyonu ile ilişkilendirilmektedir.

HoPS'ler tek bir monosakkarit, glukoz veya fruktoz polimerleri olup ve sırasıyla glukoz veya fruktan olarak adlandırılmaktadırlar. Glukansükraz olarak bilinen tek bir enzimin hareketi ile hücre dışı sükrözden sentezlenmektedir. HoPS'ler *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Weissella* dahil olmak üzere birçok LAB üyesinden elde edilmektedir. HoPS'ler ayrıca polimer omurgasında oluşan baskın glukozidik veya fruktozidik bağlantıya göre de sınıflandırılabilirler. Hem dekstran hem de reuteran α -glukoz HoPS'lerdir. Bununla birlikte dekstran, glukozil birimleri arasında ağırlıklı olarak α -(1 $\rightarrow$ 6) bağları ihtiva ederken reuteran ağırlıklı olarak α -(1 $\rightarrow$ 4) bağları içermektedir. Benzer şekilde inulin ve levan fruktan HoPS'lerdir. Ancak sırasıyla β -(2 $\rightarrow$ 1) ve β -(2 $\rightarrow$ 6) bağlantılarından oluşmaktadırlar. HoPS sentezi HePS'lerle karşılaştırıldığında şeker nükleotid öncüllerini içermediği ve tek bir gen tarafından kodlanan glukansükraz enzimi aracılığı ile sentezlendiği için nispeten daha kısa olmaktadır (Lynch ve diğerleri, 2018).

Benzersiz ve karmaşık kimyasal yapıları ve özgün işlevselliğe sahip birçok fizikokimyasal ve reolojik özellikleri nedeniyle mikrobiyal EPS'ler gıda, yem, paketlenme, kimya, tekstil, kozmetik ve ilaç endüstrinin çeşitli alanlarında ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadır (Ciszek-Lenda, 2011).

Ticari açıdan oldukça önemli bir EPS olan Ksantan, *Xanthomonas campestris* bakterisi tarafından üretilmektedir. Reolojik özellikleri nedeniyle Ksantan gıda, kozmetik ve petrol sondaj endüstrilerinde kalınlaştırıcı veya dengeleyici bir ajan olarak geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ksantan ayrıca hayvan yemi takviyesi, dana süt ikame edicileri, tarımsal herbisitler, pestisitler ve gübreler gibi gıda dışı uygulamalarda ve aynı zamanda diş macunu preparatlarında kullanılmaktadır (Ates, 2015).

Pullulan gibi EPS'ler makarnalarda veya unlu mamullerde nişasta yerine kısmi ikame olarak tercih edilmektedirler. Pullulan çözeltileri nispeten düşük viskoziteli olup içeceklerde ve soslarda dolgu maddesi olarak, diş macunlarında protez yapıştırıcı, bağlayıcı ve dengeleyici olarak da kullanılmaktadır (Andhare, Chauhan, Dave, ve Pathak, 2014). Bununla birlikte pullulan ve türevleri gibi bazı EPS'ler bir çok patojen bakterinin biyofilm oluşumunu engellemekte ve hatta yerleşik biyofilmini bozmaktadır. Bu özellikleri ile yara iyileşmesi gibi biyofilm ile ilişkili enfeksiyon süreçlerinde terapötik ürünler içerisinde potansiyel kullanıma sahiptirler (Andhare, Chauhan, Dave, ve Pathak, 2014).

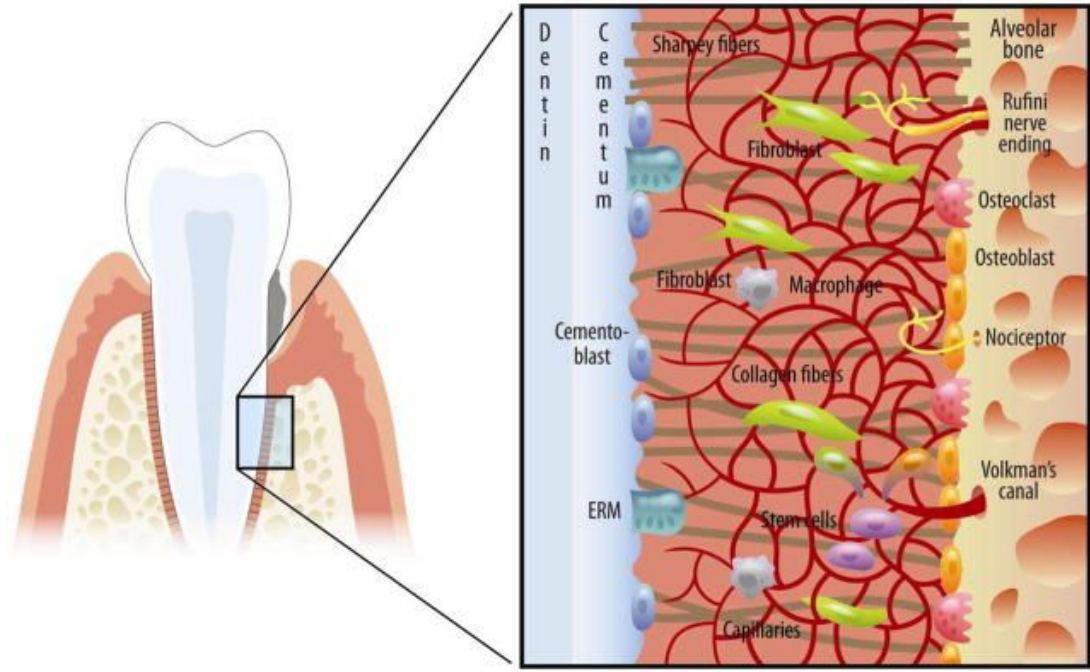
Kitosan farklı derecelerde deasetilasyon ve moleküler ağırlık derecelerine sahip bir doğal polisakkarit olup kitinin deasetillenmiş türevleri olan bir dizi polimerden oluşmaktadır. Yüksek derecede rafine edilmiş kitosan farmasötik uygulamalarda oral

preparasyonlarda salınım kontrol edici bir madde olarak kullanılmaktadır. Kitosan biyo-uyumluluk, biyo-bozunurluk, düşük toksisite ve doğal kaynaklarda düşük üretim maliyeti ile fazla miktarda elde edilebilme özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı madde olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Andhare ve diğerleri, 2014)

EPS'ler yeni ilaçların geliştirilmesinde yalnızca polimerik matris oluşturma özelliklerinden dolayı değil, aynı zamanda biyolojik etkinliklerinden dolayı da tercih edilmektedirler. EPS'ler özellikle anti-viral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, anti-kanser ve bağışıklığı destekleyici ajanlar olarak potansiyel öneme sahiptirler. EPS'ler askorbik aside benzer güçlü antioksidan özellikler göstermektedirler. Yapılan bazı çalışmalarda hücre canlılığı testleri EPS'nin spesifik olarak kanser hücre hatlarını inhibe ettiğini ve normal hücre hatları için toksik olmadığını ve bu nedenle sağlık yararı uygulamaları için bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Vasanthakumari, Surya, ve Girija, 2015). Günümüzde LAB sürdürülebilir ve güvenli bir kültür ortamında geliştirilebilir, fermentasyon koşulları yüksek bir verim elde etmek için optimize edilebilir ve düşük maliyet ile ürettikleri EPS'ler saflaştırılabilirse endüstriyel uygulamalara dahil edilmeleri mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler ışığında periodontal hastalıkların tedavisinde periodonsiyumun rejenerasyonu için önemli olan PDLF hücreleri üzerinde mikroorganizma kaynaklı EPS'lerin kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi önemli bir araştırma alanı olmaktadır (Freitas, Alves, ve Reis, 2011).

1.7. Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri

Periodonsiyum, dişlerin çenelere sabitlenmesini kolaylaştıran yapısal ve işlevsel kompleks bir dokudur. Periodonsiyum kök hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşmaktadır. PDL dokusu periodonsiyumun yenilenme sürecine önemli bir katkıda bulunmaktadır. PDL dokusu 0,15-0,38 mm genişliğinde olan PDL dokusu oldukça karmaşık olup birkaç farklı hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Osteoblastlar ve osteoklastlar, PDL dokusunun alveoler kemik kısmında, endotel hücreleri ise zengin bir vasküler ağ oluşturarak PDL dokusu boyunca fibroblastlar, makrofajlar, farklılaşmamış erişkin/mezenkimal kök hücreler ve sinir elemanları ile birlikte bulunmaktadır (Şekil 1.11.). Doku karmaşıklığı dikkate alındığında, periodontal bölgenin yenilenmesi, daha az hücre popülasyonuna sahip dokularla karşılaştırıldığında ve oral ortamdaki sürekli bakteriyel değişim göz önüne alındığında daha zor olabilmektedir (Chukkapalli ve Lele, 2018; Marchesan ve diğerleri, 2011)



Şekil 1.11. Hüresel, vasküler ve hücre dışı matris elemanları dahil periodontal dokunun zengin ve kompleks yapısının şematik görünümü (Marchesan ve diğerleri, 2011)

Periodonsiyumun, periodontal doku ortamında sürekli bir inflamatuvar kaskadı başlatan çeşitli ağız mikrobiyota üyelerinde ev sahipliği yaptığı bilinmektedir. Periodontal dokuların iltihabı, yumuşak dokuların ve alveoler kemiğin ileri tahribatına yol açan spesifik patojen mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu periodontal hastalıklar, dişlerin ve alveoler kemik kaybının ana nedeni sayılmaktadır. Periodontal dokulardaki en önemli hücre grubu sayılan PDLF hücrelerinin proliferasyonu, göç ve sekresyon özellikleri doku onarımını, yara iyileşmesini ve implantın etkinliğini etkilemektedir (Chukkapalli ve Lele, 2018; Zhan, Guo, ve Zheng, 2018).

Periodontal dokuların yenilenmesi periodontal hastalıkların tedavisi için önemli bir aşama olmaktadır. İyileşme ile ilgili farklı hücrelerin ve faktörlerin etkinliğinin belirlenmesi ile birlikte periodontal defektler için sayısız rejeneratif materyaller geliştirilmektedir. Ancak bu noktada, rejenerasyon için ideal ortamı sağlamaya yönelik daha bireyselleştirilmiş tedaviler, öngörülebilir ve eksiksiz bir sonuç için önemli kabul edilmektedir. Bu nedenle, PDL hücrelerinin heterojen hücresel davranışını etkileyen ayırt edici faktörlerin daha iyi anlaşılması ve sürekli araştırılmasına hala ihtiyaç duyulmaktadır (Marchesan ve diğerleri, 2011).

Periodontal hastalıklar nedeniyle kaybedilen periodontal dokuların yenilenmesi amacıyla çeşitli prosedürler önerilmektedir. Bunlar arasında kemik greftleri, kök kondisyonu ve YDR gibi çeşitli yaklaşımlar önerilmektedir. Bu nedenle PDLF'lerin periodontal

rejenerasyonda önemi oldukça büyüktür. Çeşitli çalışmalar PDLF'lerin mezenkimal kök hücre markörlerini eksprese ettiğini ve osteoblast, adiposit ve kondrosit olarak farklılaşabileceğini göstermektedir (Mailhot ve diğerleri, 1995). Bu çalışma; periodonsiyumun iyileşmesi ve rejenerasyonu amacıyla doğal bir ürün olarak PM'lerin kullanıldığı ilk çalışma olması açısından önemlidir. Elde edilen sonuçlar, yeni bir biyomalzeme olarak PM'lerin periodontal hastalıklar için alternatif tedavi yaklaşımları geliştirmek üzere kullanılabileceğine dikkat çekmektedir.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Avulize bir dişin iyileşme sürecini etkileyen en kritik faktör ekstraoral kuruma süresi ve replantasyondan önce kullanılan saklama çözeltisidir. Replantasyon sonrası başarısızlığı en aza indirmek amacıyla avültenmiş dişin PDL hücrelerinin canlılığını korumak esastır. Gerçekleştirilen çalışmalarda bu amaca yönelik ideal saklama ortamları araştırılmıştır. Gjertsen, Stothz, Neiva, ve Pileggi (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; propolisin saklama ortamı olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Avulize dişler için saklama ortamı olabilmesi açısından PDL hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkinliği analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında; standart saklama ortamı olan Hanks dengeli tuz çözeltisine alternatif olarak %100, %50 ve %25 propolisin çözeltisi kullanılmıştır. PDLF hücrelerin proliferasyonu XTT testi ile değerlendirildiğinde propolis içeren saklama ortamının standart saklama çözeltisine kıyasla hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir.

Plak oluşumunun diş çürüğü ve periodontitis için temel bir etiyolojik faktör olduğu bilinmektedir. Oda ve diğerleri (2016), anti-bakteriyel ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip Brezilya yeşil propolisinin (BYP) ağız patojenlerinin üzerindeki inhibitör etkisini ve PDLF'lerin proliferatif etkinliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kapsamında 96 kuyucuklu mikropalakalara kültüre edilen PDLF'ler farklı konsantrasyonlarda BYP (50-2000 mg/ml) ile 24 saat boyunca stimüle edilmiştir. Hücresel canlılık XTT testi ile belirlenmiş ve BYP'nin 2000 mg/ml'ye kadar değişen konsantrasyonlarda düşük sitotoksositeye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, BYP'nin, diş dokularında belirgin sitotoksosite riski olmadan diş çürüğü ve kronik periodontitis için klinik bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirileceğine işaret etmektedir.

Fan, Zhang, ve Upton (2018), *Radix arnebiae*'den elde edilen aktif bir bileşen olan Shikoninin (SHI), lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş PDL hücreleri üzerindeki anti-inflamatuvar etkilerini araştırmışlardır. SHI'nın farklı konsantrasyonlarının (0,125, 0,25, 0,5, 1 ve 2 µg/ml) 1, 3 ve 7 gün boyunca PDL hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde SHI'nın 0,125, 0,25 ve 0,5 µg/ml doz uygulamalarının kontrole kıyasla PDL hücrelerinin proliferasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Ancak SHI'nın 1 ve 2 µg/ml dozları kontrol ile karşılaştırıldığında 1., 3. ve 7. günlerde PDL hücre proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca SHI'nın PDL hücreleri üzerindeki anti-enflamatuvar etkisini

belirlemek amacıyla, IL-1, IL-6, TNF- α , MMP-2, MMP-9 ve COX-2 için genlerin ekspresyonu RT-PZR kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, SHI'nın *in vitro* koşullarda LPS ile uyarılmış PDL hücrelerde anti-enflamatuvar etki sergilediği belirlenmiş ve SHI'nın periodontitisi hedef alan güncel tedavi yaklaşımlarına destek olarak kullanım potansiyellerinin olabileceği belirtilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde PDLF hücrelerinin üzerinde farklı ekstraktların etkisinin analiz edildiği çalışmalar bulunmasına rağmen probiyotik özellikler gösteren LAB suşlarından eden elde edilen ekzopolisakkariter ve hücre bağımsız süpernatantların PDLF hücrelerinin hücre davranışı üzerine etkinliğine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu bölüm kapsamında PM'lerin kanser hücre hatları gibi diğer bazı hücreler üzerindeki etkinliklerine dair bazı çalışmalar sunulmuştur.

Mikrobiyal EPS'ler çok çeşitli homo veya hetero-karbohidratlardan oluşan heterojen polimerlerdir. Mikroorganizmalar olumsuz çevre koşullarına karşı canlılıklarını devam ettirebilmek için çözünebilir kapsül veya hücre dışına salgılanan EPS üretmektedirler. Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser hastalığı için kullanım potansiyelleri değerlendirilmekte ve yeni ilaç etken maddesi olabilme kriterleri analiz edilmektedir. Abdelnasser ve diğerleri (2017) Mısır ülkesinde bulunan deniz sedimanlarından *Basillus megaterium* bakterisini izole etmişler ve bu bakteri tarafından üretilen EPS'leri saflaştırmışlardır. Bu EPS'lerin hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerine karşı etkinlikleri analiz edildiğinde en yüksek sitotoksik etki IC50 değerinde tespit edilmiştir. HepG2 hücrelerine karşı oluşan bu sitotoksitenin EPS yapısındaki sülfür ve üronik asitlerin mevcudiyeti nedeniyle olduğunu belirtmişlerdir.

Periodontal doku homeostazında önemli bir rol oynayan PDL kök hücrelerinin hücre bazlı periodontal rejeneratif tedavide uygulanabilir olduğu bilinmektedir. Periodontal patojen bakteriler tarafından salgılanan çeşitli metabolitler lokal periodontal doku yıkımına katkıda bulunan sitokinlerin üretimini indüklemektedir. Ramenzoni, Russo, Moccia, Attin, ve Schmidlin (2019) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada subgingival plakta bulunan patojenik bakteriyel türlerin endotoksinlerine maruz bırakılan PDL kök hücrelerinin biyolojik davranışları, proliferasyon ve göçü, inflamatuvar sitokin ekspresyonu analiz edilmiştir. PDL kök hücreleri ortodontik veya terapötik nedenlerle diş çekimi yapılan 3 yetişkin donörün hastalıktan etkilenmemiş üçüncü molar dişlerinden elde edilmiştir. Çalışmada; *Streptococcus mutans* UAB159 (OMZ 918), *Streptococcus anginosus* ATCC 9895T (OMZ 871), *Prevotella intermedia* ATCC 25611T (OMZ 278), *Fusobacterium nucleatum* KP-F8 (OMZ 598), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277T (OMZ 308) ve

Treponema denticola ATCC 35405T (OMZ 661) olmak üzere altı bakteri türü kullanılmıştır. Bakteri kültürlerini 10.000xrpm'de, 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüjleyerek süpernatantları hücrelerden ayırmak için filtre ile sterilize etmişlerdir. PDL kök hücrelerinin 96 kuyulu plakalara ekimi sonrası hücreler 1: 1000, 1: 500, 1: 300 ve 1:50 miktarındaki *P. gingivalis* ve *T. denticola* dilüsyonlarına maruz bırakılmış sonraki 24., 48. ve 72. saatlerde, her bir kuyucuğa 500 ml MTT ilave edilmiş ve PDL kök hücrelerinin canlılığını MTT deneyi ile belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda farklı periodontal bakteri süpernatantlarının kök hücre immünomodülatör yanıtını gösterdiği ve kök hücre transkripsiyon kapasitesi, göç, proliferasyon ve osteogenezin bu patojenlerin varlığında farklı olabileceğini bulmuşlardır.

Chen, Hsieh, Huang, ve Tsai (2017) probiyotik özellik sergileyen *Lactobacillus* cinsine ait 7 farklı izolatın insan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29'un canlılığı üzerine olan etkisini araştırmışlardır. İzolatlara ait süpernatantlar ile stimüle edilen HT-29 hücrelerinin canlılığı 24 saat sonrasında MTT testi ile analiz edilmiştir. pH 3,73 ile 4,25 arasında değişen bu izolatlar laktat dehidrojenaz aktivitesinde belirgin bir artışa bağlı olarak HT-29 hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. Kolonik karsinom hücreleri üzerindeki etkinliği değerlendirildiğinde BCRC17010 suşunun en etkili suş olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında arı polen örneklerinden izole edilen bakterilere ait ekzopolisakkarit ve hücre bağımsız süpernatantların periodontal hastalık sonucunda kaybedilen periodonsiyum bölgesinin rejenerasyonunda önemli bir rolü olan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Bu çalışmada, farklı bölgelerden toplanan arı polen örneklerinden bakterileri izolasyonu ve izolatların geliştirilmesi için MRS (kat. no. 1.10661.0500, Merck, ABD) besi yeri kullanılmıştır. Mikrobiyolojik çalışmalar kapsamında gerekli olan sterilizasyon işlemleri 121 °C’de 15 dakikalık bir protokol kullanılarak otoklav cihazında (NC 40M, Nüve, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Bakteriler, 37 °C sıcaklığa ayarlanan inkübatörde (EN 120, Nüve, Türkiye) kültüre edilmiştir. Oluşabilecek herhangi bir kontaminasyonu engellemek amacıyla tüm çalışmalar Class II mikrobiyolojik güvenlik kabini (MN 120, Nüve, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Bakterilere ait hücrelerin ve PM’lerin eldesi amacıyla gerçekleştirilen çöktürme işlemleri farklı devir ve dakikaları kapsayacak şekilde santrifüj cihazında (NF 1200 R, Nüve, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Hücreler %50’lik gliserol (lot:200-289-5, Sigma, Almanya) çözeltisinde -20 °C’de saklanmıştır. Moleküler tanımlama için izolatlara ait DNA, DNA izolasyon kiti (NEB Taq, lot: M0273, İngiltere) kullanılarak elde edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan EPS’lerin eldesi aşamalarında proteinlerin çöktürülmesi amacıyla Trikloroasetik asit (TCA) (kat. no. 100807.1000, Merck, ABD) ve %95’lik etil alkol (kat. no. 16368, Sigma, Almanya) kullanılmıştır. PM’lerin sterilizasyonu 0,45 µm çapa sahip membran filtre (kat. no. SLLGR04NL, Milipore, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, liyofilizasyon (dondurma-kurutma) işlemleri (Telstar LyoQuest, İspanya) ardından ultra saf su (Milli-Q su) ile çözümlenerek çalışmalara dahil edilmiştir.

EPS’lerin toplam glukoz miktar tayini %5 fenol (Merck, 1.00206.0250, Almanya) ve konsantre sülfürik asit (Merck, 1.00713.2500, Almanya) kullanılarak Dubois yöntemi ile belirlenmiştir. Protein miktarı ise Bradford reaktifi (Sigma Aldrich, B6916, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Tüm spektrofotometrik ölçümler mikropilaka okuyucu (BioTek, µQuant, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmaları kapsamında; toplam fenolik madde miktarını belirlemek için 0,2 N Folin-Ciocalteu (Sigma, Lot no: BCBH0883V, Almanya) ve Folin-Ciocalteu reaktifi ile tepkimeye girerek oksidasyonu sağlayan sodyum karbonat (Merck, 106398, Almanya) kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için ise gallik asit (Sigma, 27645, Almanya) standartı kullanılmıştır. PM’lerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)

radikalini giderici etkilerini belirlemek için etanolde çözülen toz DPPH (Sigma, lot no:1898-66-4, Almanya) kullanılmıştır. Örnekler gallik asit kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Çalışma sonucundaki ölçümler spektrofotometre (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) ile belirlenmiştir.

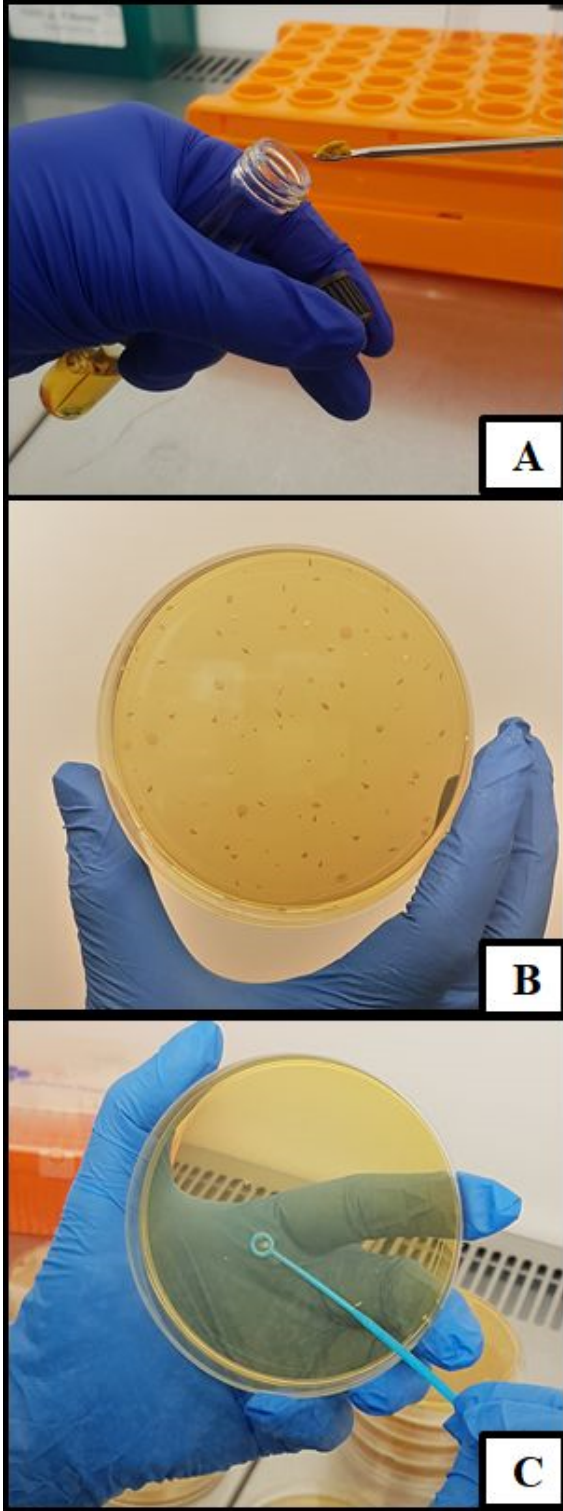
Hücre kültürü çalışmaları Class II A-2 laminar akışlı kabin içerisinde (Telstar Bio II Advance, İspanya), hücrelerin gelişimi ise %5 CO₂, %95 bağıl nem ve 37 °C sıcaklık şartlarını sağlayan inkübatörde (Panasonic MCO-18AC-PE, Japonya) gerçekleştirilmiştir. iPDLF hücreleri steril hücre kültürü plastikleri (Corning, NY, ABD) içinde %10 fetal sıgır serumu (FBS, Biological Industries, Lot no: 04-007-1A, ABD), %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries, Lot no: 1802094, ABD), %1 temel olmayan amino asit stok çözeltisi (Biological Industries, Lot no: 1607124, ABD) ve %1 200 mM L-glutamin (Biological Industries, Lot no: 1604048, ABD) ile desteklenmiş yüksek konsantrasyonlu glukoz içeren DMEM (Biological Industries, Lot no: 1609159, ABD) ile kültüre edilmiştir. Her iki günde bir kültür ortamı değiştirilerek hücreler çoğaltılmış ve %80-90 doluluk oranına ulaşan hücreler Tripsin/EDTA (Merck T5266, E6511, ABD) çözeltisi kullanılarak bir üst pasaja alınmıştır. Hücrelerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını gözlemlemek için ZeissPrimovert (Almanya) invert faz-kontrast mikroskobu kullanılmıştır.

PM'lerin, iPDLF hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkinliği MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) hücre çoğalma kiti (Merck, katno: SGD1, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümler ise mikropłaka okuyucu (BioTek, µQuant, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla, Çorum ve Tokat illerinden toplanan arı polenleri aseptik koşullarda ve soğuk zincir eşliğinde laboratuvara getirilmiştir. Toz formdaki polenler 0,5 g tartılarak 4,5 ml MRS vesiyerine aktarılmış (Şekil 3.1a) ve ön zenginleştirme amacıyla 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonu takiben tüm ana stoklar fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) kullanılarak 10⁻⁷'ye kadar seyreltme işlemine tabi tutulmuş ve MRS agar besi yerine dökme ekim yöntemiyle ekimler gerçekleştirilmiştir. 37 °C'de 48 saat inkübasyonu takiben gelişen farklı koloniler tek çekilerek (Şekil 3.1b) MRS besi yerine aktarılmıştır (Şekil 3.1c).



Şekil 3.1. A) Polen örneklerinin ön-zenginleştirme aşaması B) MRS katı besi yerinde gelişen farklı koloniler C) Tek koloni çekimi

Kültür saflığı, MRS katı besi yerine yapılan çizgi ekimler neticesinde kontrol edilmiştir. Gram-pozitif, katalaz negatif ve hemolitik olmayan izolatlar bir sonraki aşamada kullanılmak üzere seçilmiştir (Beasley ve Saris, 2004)

3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Seçilen bakterilerin ön tanımlamaları hücre yüzey proteinlerinin analizini hedef alan MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) tekniği kullanılarak hizmet alımı neticesinde gerçekleştirilmiştir (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı). Moleküler tanımlamaları ise 16S rRNA dizi analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak izolatların genomik DNA'ları DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen DNA'larının saflık ve miktar (ng/μl) tayinleri NANODROP (Thermo) spektrofotometrede gerçekleştirilen okumalar neticesinde belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması için PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. 27F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' ve 1492R 5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3' primerlerinin kullanıldığı (0,5 μL 10 μm) toplam hacmi 25 μL olan reaksiyona sırasıyla 2,5 μL 10×tampon, 1,5 μL MgCl₂ (25 mM), 0,5 μL 10 mM deoksiniükleotidtrifosfat karışımı, 0,125 μL 50 ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve 100 ng kalıp DNA eklenmiştir. PZR işlemi, "Applied Biosystems/Veriti™ 96-Well Thermal Cycler" cihazında başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 30 saniye, 95 °C'de 20 saniye denatürasyon, 56 °C'de 20 saniye primer bağlanması ve 68 °C'de 1 dakika 15 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 30 döngüde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünü Tris-Asetat-EDTA tamponunda hazırlanan %1,5 agaroz jelde yürütülmüş ve sonuçlar jel görüntüleme cihazında (Kodak) görüntülenmiştir. 16S rRNA geni PZR ürününün dizi analizi BM LAB (Türkiye) tarafından ileri ve geri primerlerinin kullanılması neticesinde gerçekleştirilen ikinci bir PZR işlemi ardından elde edilen 1462 bp'lik bölge üzerinden gerçekleştirilmiştir. ABI formatında temin edilen dizi bilgileri FinchTV yazılımı aracılığıyla analiz edilmiş ve diziler NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak bilinen dizilerin yer aldığı veritabanlarıyla karşılaştırılmış (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve tarama sonucunda dizinin en çok hangi mikroorganizmaya dizi benzerliği gösterdiği belirlenerek moleküler tanımlama işlemi tamamlanmıştır (Edwards, Rogall, Blöcker, Emde, ve Böttger, 1989).

3.2.3. Postbiyotik Mediatörlerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında PM kaynağı olarak kullanılacak olan HBS ve hücre dışına salgılanan EPS'ler (EPS-R/release eps) aşağıda detayları sunulan aşamalar kullanılarak elde edilmiştir. HBS eldesi amacıyla; seçilen izolatlar MRS sıvı besi yerine %1 oranında inoküle edilmiş ve gelişim koşulları olan 37° C'de 24 saat inkübasyonları gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonu takiben, gelişen kültürler santrifüj (6,000 rpm, 20 dakika, 4 °C) edilmiş ve hücrelerinden ayrılmış olan süpernatant 0,45 µm çapa sahip membran filtreden geçirilmiştir. Filtrasyonu gerçekleştirilen süpernatant 24 saat süreyle liyofilize edilmiş ve elde edilen toz form HBS olarak ilerleyen çalışmalara dahil edilmiştir.

Hücre dışına salgılanan EPS'lerin eldesi amacıyla; seçilen izolatlar MRS sıvı besi yerine %1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben, gelişen kültürler santrifüj (8,000 rpm, 30 dakika, 4 °C) edilmiş ve santrifüj sonrası elde edilen süpernatant hücre dışına salgılanan EPS kaynağı olarak kullanılmıştır. 0,45 µm çapa sahip membran filtreden geçirilen süpernatanta son konsantrasyon %20 olacak şekilde TCA eklenmiş ve 4 °C'de 2 saat çalkalamaya bırakılmıştır. Çalkalamanın ardından santrifüj (8,900 rpm, 30 dakika, 4 °C) işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen üst faza iki katı hacimde %95'lik soğuk etil alkol ilave edilmiştir. 4 °C'de bir gece çalkalamalı koşullarda inkübasyonu takiben santrifüj (6,000 rpm, 30 dakika, 4 °C) işlemi tekrar edilmiş ve elde edilen pellet EPS 2 ml dH₂O'da çözülerek 24 saat boyunca liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Liyofilize edilen örnekler çalışmanın diğer aşamalarında kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Tallon, Bressollier, ve Urdaci, 2003).

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ham EPS'lerin kantitatif tayini, fenol sülfirik asit yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers, ve Smith, 1956). Öncelikli olarak glukoz standart eğrisi oluşturulmuştur. Bu amaçla; 0,01 g glukoz hassas terazide tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmüş ve stok çözeltisi hazırlanmıştır. Glukoz standart eğrisi için hazırlanan bu stok çözeltisinden farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmış ve glukoz miktar tayini yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren bu çözeltilere ve EPS örneklerine sırasıyla %5 1 ml fenol, 5 ml konsantre sülfirik asit ilave edilmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 30 °C'de 20 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 96 kuyucuklu mikro plaka kuyularına 200 µl olacak şekilde aktarılmış ve spektrofotometrede 490nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçülmüştür. EPS miktarının kantitatif tayini, glukoz standart eğrisi kullanılarak µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Ekzopolisakkarit içeren ekstraktta, protein kalıntıları olup olmadığını belirlemek için ise Bradford yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikro plaka kuyularına 10 µl EPS eklenmiş ve üzerine 200 µl Bradford reaktifi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen işlemin ardından örneklerin optik yoğunlukları spektrofotometrede 595nm

dalga boyunda ölçülmüş ve protein konsantrasyonu BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Antioksidan Etkinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında PM kaynağı olarak kullanılan HBS ve EPS-R'lerin antioksidan etkileri fenolik madde miktarı ve DPPH radikalini giderici etkileri açısından değerlendirilmiştir.

PM'lerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Fenolik madde miktar tayini için 100 µL etken madde içeren tüplere 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş, vortekslenmiş ve tüpler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonrasında tüplere 2 ml %2'lik sodyum karbonat eklenmiş ve tekrar karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kör olarak EPS-R için 100 µL dH₂O, HBS için 100 µL MRS sıvı besi yeri ve 100 µL Folin-Ciocalteu içeren tüpler kullanılmıştır. Fenolik madde standartı 0,05-0,4 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit kullanılarak oluşturulmuştur. Reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimi 750_{nm}'de köre karşı gerçekleştirilen absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisinden göre analiz edilmiş ve gram kuru ekstrakt ağırlığı başına gallik asit eşdeğeri (GAE) ile ifade edilmiştir (Singleton, Rossi, ve Jr, 1965)

PM'lerin serbest radikal temizleme özelliğini değerlendirmek amacıyla 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır. 200 µL etken madde içeren tüplere 500 µL etanolde hazırlanmış 120 µM DPPH çözeltisi ile 500 µL saf etanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon sonucunda, tüm örneklerde oluşan mor rengin şiddeti 517_{nm}'de köre (EPS-R için dH₂O, HBS için MRS sıvı besi yeri) karşı gerçekleştirilen absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar ise 0,05-0,3 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asit standart kalibrasyon grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PM'lerin DPPH radikalini giderici etkileri % olarak aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Blois, 1958)

$$\% \text{ DPPH} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.5. İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin (iPDLF) İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

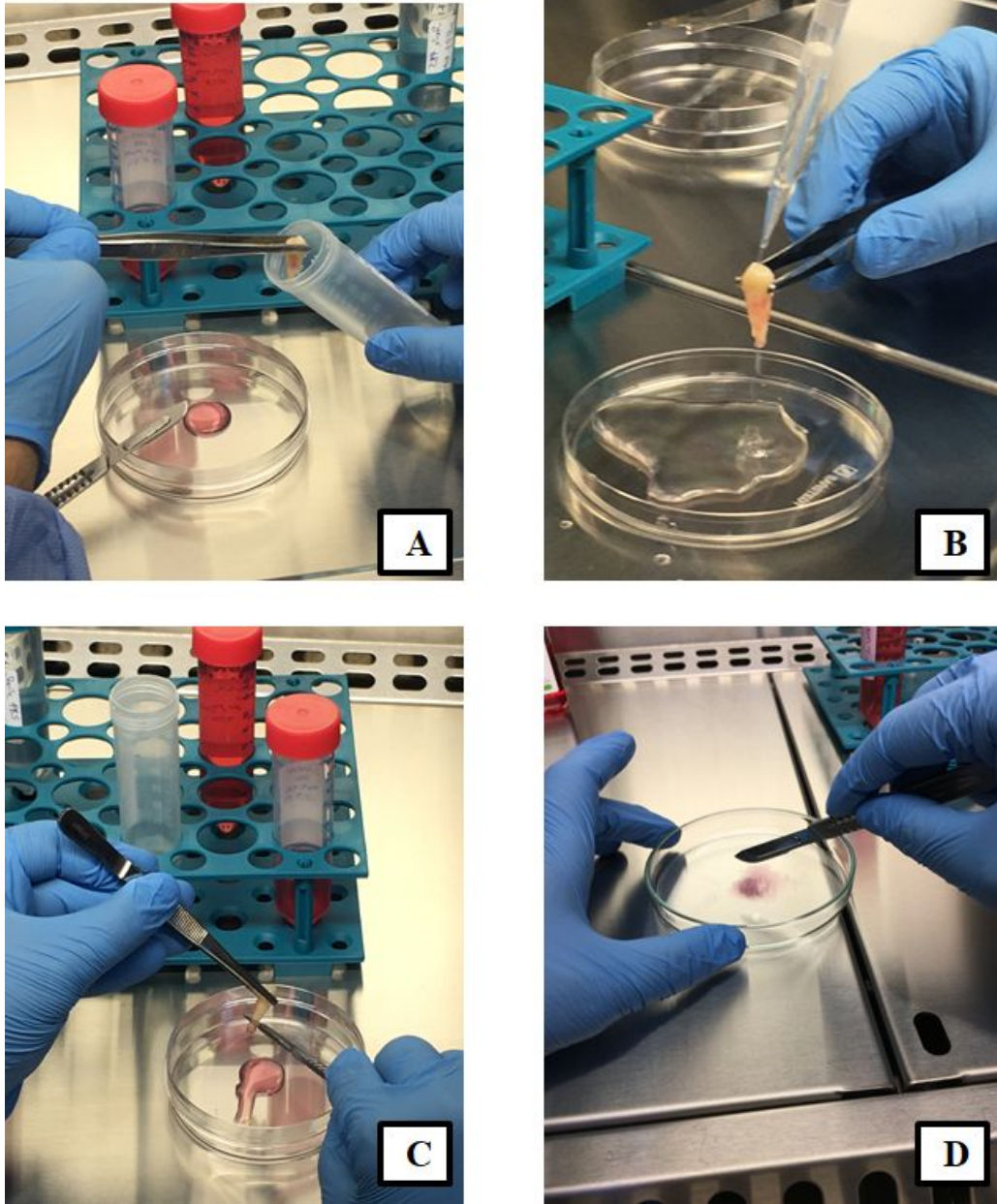
iPDLF hücrelerinin izolasyonu için gerekli olan etik kurul izni (No:2019-14), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmış

(Toplantı tarihi: 24.07.2019) olup, kurul kararı EK1’de sunulmuştur. Hücre izolasyonu yapılacak dişler (molar/pre-molar) 18-25 yaş aralığındaki sağlıklı bireylerden onam formu imzalatılarak temin edilmiştir.

Uzman diş hekimi tarafından çekilen diş, %5 penisilin/streptomisin ve %95 yüksek glukozlu DMEM içeren transfer besi yerini içerisine aktararak hızlı ve güvenilir koşullar altında hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Transfer besi yeri içerisinde laboratuvara getirilen diş, steril ortam sağlanması için laminar kabinde bir petri kabı içerisinde 2-3 kere 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında periodontal doku bistüri yardımı ile diş üzerinden dikkatlice kazınmış ve %20 FBS ihtiva eden 3 ml %0,25’lik kollajenaz çözeltisi içeren 15 ml’lik falkon tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.2). Bir saat boyunca 37 °C’de dinamik şekilde inkübasyonu takiben enzimatik sindirimi sonlandırmak için tüp içerisine 10 ml tam besi yeri eklenmiştir. Besi yerinin aktarımı sonrası tüp 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz uzaklaştırılmış ve tüp içerisindeki pellet üzerine 1 ml tam besi yeri ilave edilerek yavaş bir şekilde pipetaj yapılmıştır. Bu işlem ardından hücreler, içerisinde 6 ml tam besi yeri bulunan T25 hücre kültürü plastiği içerisine dikkatlice alınmıştır. T25 hücre kültürü plastiği 37 °C sıcaklık, %5 CO₂, %95 bağıl nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan hücreler, belirli zaman aralıklarında invert faz-kontrast mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6. Postbiyotik Mediatörlerin İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

İzole edilen ve pasaj sayısı P4-6 olan iPDLF hücreleri 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu mikro plaka kuyularına aktarılmıştır. %95 yüksek glukozlu DMEM içeren besi yerinde 37 °C sıcaklık, %5 CO₂, %95 bağıl nem koşullarında 24 saat inkübasyonu takiben besi yeri uzaklaştırılmış ve 0-1000 µg/ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PM’ler kuyulara eklenmiştir. Aynı koşullarda 24 saat inkübasyonu takiben PM’lerin iPDLF hücre canlılığı üzerindeki etkileri kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.2. A) Sağlıklı dişin laboratuvara transferi B) PBS ile yıkama C) Besi yeri ile yıkanma aşaması ve periodontal dokunun bistüri ile diş yüzeyinden kazınması D) Steril petri içerisine kazınmış olan periodontal doku

MTT yönteminin temeli, canlılığa bağlı olarak hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi sonucunda sarı renkli tetrazolyum tuzunu kullanmaları ve bunun neticesinde mor renkli formazan kristallerinin oluşumuna bağlı olarak meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak 570nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. MTT testi için kuyulardaki besi yeri uzaklaştırılmış ve 10 µl (0.5 mg/ml) MTT eklenmiştir. Dört saat inkübasyonu takiben, MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristalleri 150 µl dimetilsülfoksit (DMSO, Merck) çözeltisi kullanılarak çözülmüştür. Gözlemlenen mor rengin optik yoğunluğu 570nm dalga boyunda

gerçekleştirilen okumalar neticesinde belirlenmiştir (Multiscan Ascent, Labsystems). Sonuçların hücre sayısı olarak da değerlendirilebilmesi için, belirli dozlarda hazırlanan hücreleri içeren ve PM uygulaması yapılmadan sadece besi yeri eklenen kuyularda MTT testi gerçekleştirilmiş ve oluşturulan standart eğriye göre hücre sayıları belirlenmiştir.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında sunulan tüm deneysel aşamalar, en az 3 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Veriler ve verilerin standart sapmaları Microsoft Office 365 Pro Plus Excel programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık; Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) kullanılarak Tukey testi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde $0,0001 < p < 0,001$ değerleri son derece anlamlı (***), $0,001 < p < 0,01$ çok anlamlı (**), $0,01 < p < 0,05$ anlamlı (*) ve $p > 0,05$ anlamlı değil olarak kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

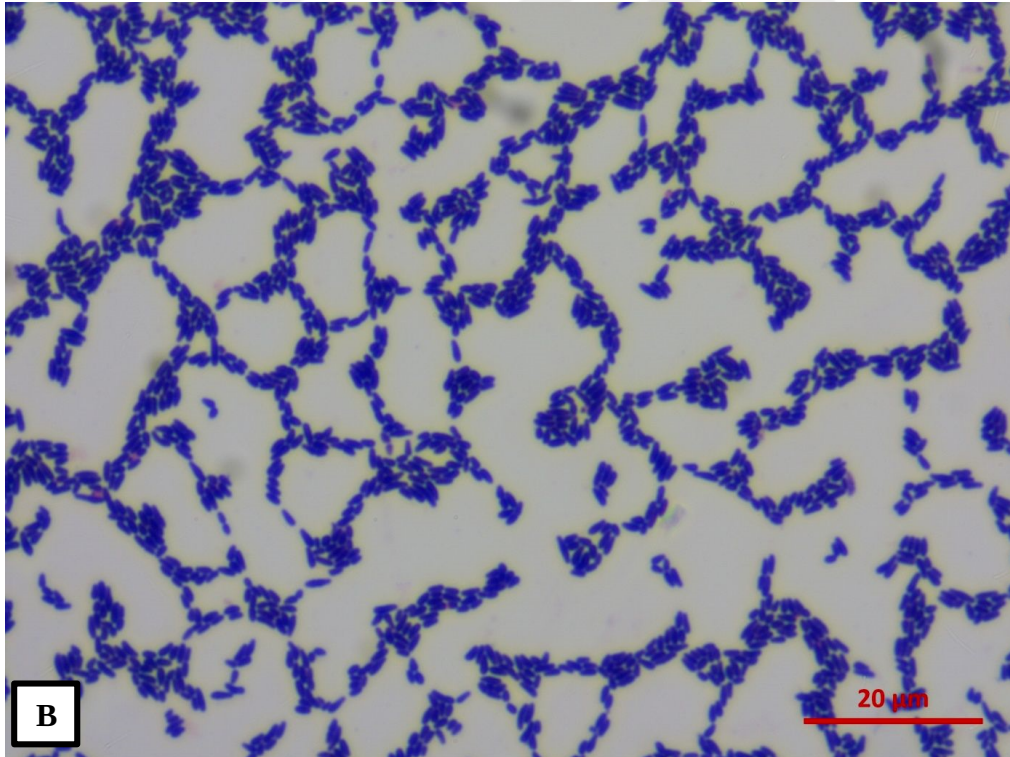
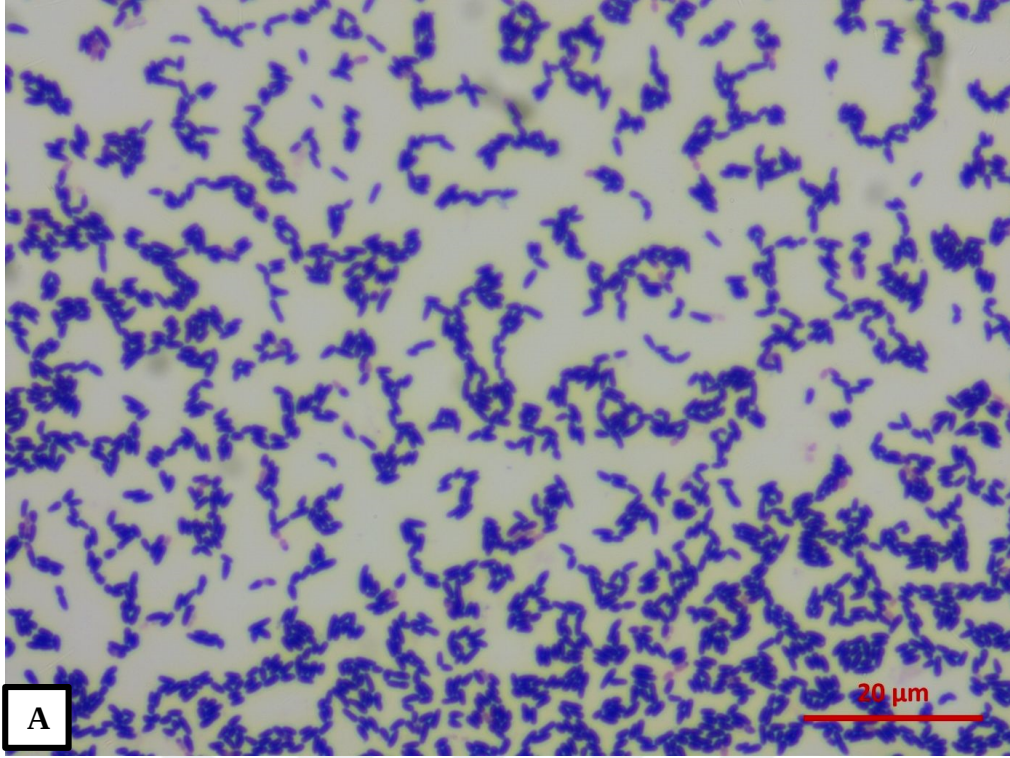
4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Çalışma kapsamında PM eldesi amacıyla kaynak teşkil edecek bakteriler, arı polen örneklerinden MRS besi yerinin kullanımı neticesinde izole edilmiştir. Çorum ve Tokat illerinden toplanan arı polenlerinin her birinden 5'er bakteri izole edilmiştir. Elde edilen bakterilerin MRS katı besi yerine çizgi ekimleri neticesinde koloni morfolojileri ve saflıkları; Gram-boyama neticesinde Gram reaksiyonları, katalaz testi neticesinde katalaz aktiviteleri ve kanlı agara yapılan çizgi ekimleri neticesinde hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Toplam 10 izolat arasından iki tanesi; Gram-pozitif (Şekil 4.1), katalaz negatif (Şekil 4.2) ve hemolize neden olmayan (Şekil 4.3) özellikleri nedeniyle seçilerek ilerleyen aşamalara dahil edilmiştir. Diğer 8 izolat ise hemolitik aktivitelerinden dolayı elenmiştir.

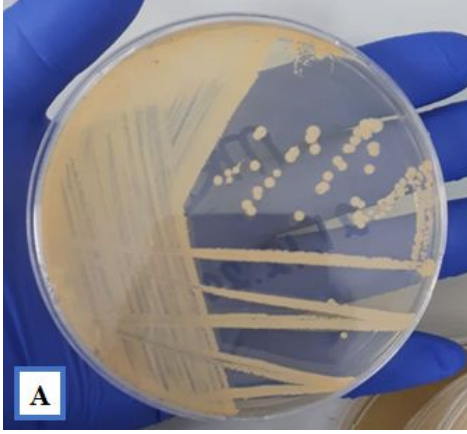
Seçilen iki izolatın agar yüzeyinde gelişen kolonilerinin krem renkli ve düz hatlı-yuvarlak koloni morfolojisine sahip oldukları, mikroskop altında ise kısa ve düzensiz basil hücre morfolojisi (Şekil 4.1) sergiledikleri belirlenmiştir.

İzotların MALDI-TOF analizi ile belirlenen hücre yüzey protein profillerinin veri bankaları ile karşılaştırılması neticesinde her ikisinin de *Weissella confusa* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4-4.5). Doğrulama işlemi 16s rRNA dizi analizini içeren moleküler tanımlama testleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; izolatların genomik DNA'ları izole edilmiş ve izole edilen DNA'ların saflık ve miktar tayinleri belirlenmiştir (Tablo 4.1). PZR işlemi neticesinde elde edilen 1462 bp'lik bölgenin (Şekil 4.6) dizi analizi neticesinde elde edilen sonuçlar MALDI-TOF sonuçlarından tür bazında farklılık sergilemiştir. Sonuç olarak; her iki izolatın da veri bankalarında bulunan bilinen dizilerle karşılaştırılması sonucunda sırasıyla %99 ve %97 benzerlik oranıyla *Weissella cibaria* oldukları netlik kazanmıştır (Şekil 4.7).

Aynı türe ait olmalarına rağmen farklı kaynaklardan izole edilmiş olmaları nedeniyle, her iki izolatın da çalışmaya dahil edilmesine karar verilmiştir. Çorum ilinden temin edilen arı poleninden izole edilen bakteri *Weissella cibaria* EIR/P-1; Tokat ilinden temin edilen arı poleninden izole edilen bakteri ise *Weissella cibaria* EIR/P-2 olarak isimlendirilmiştir.



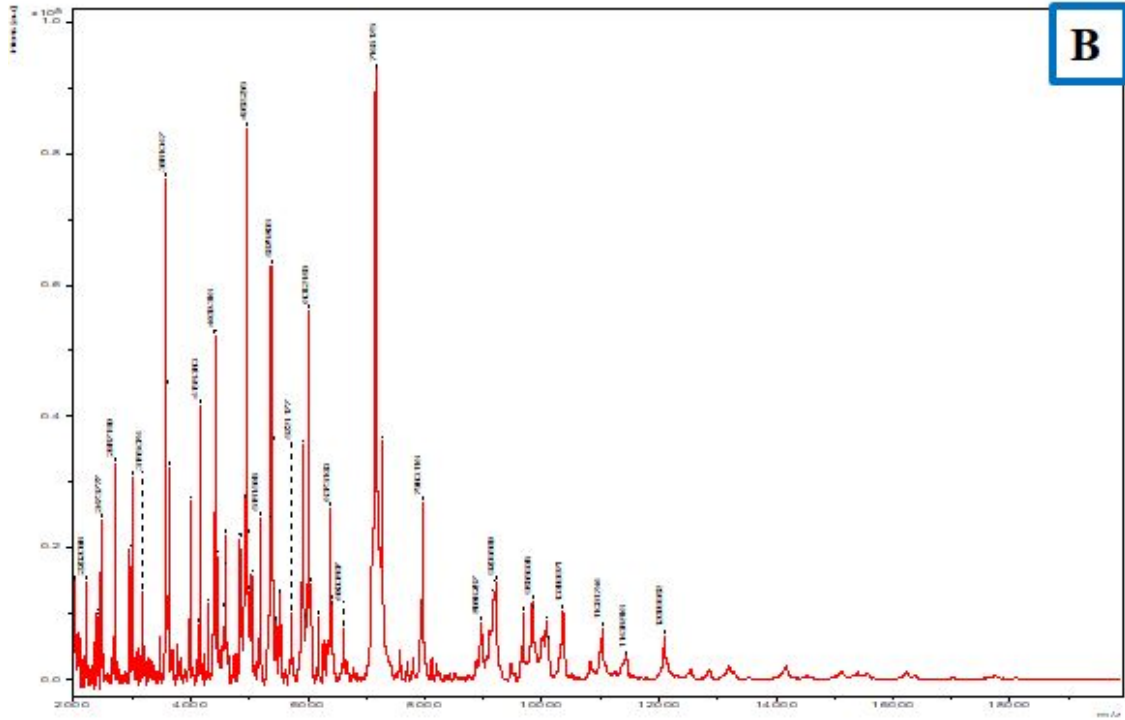
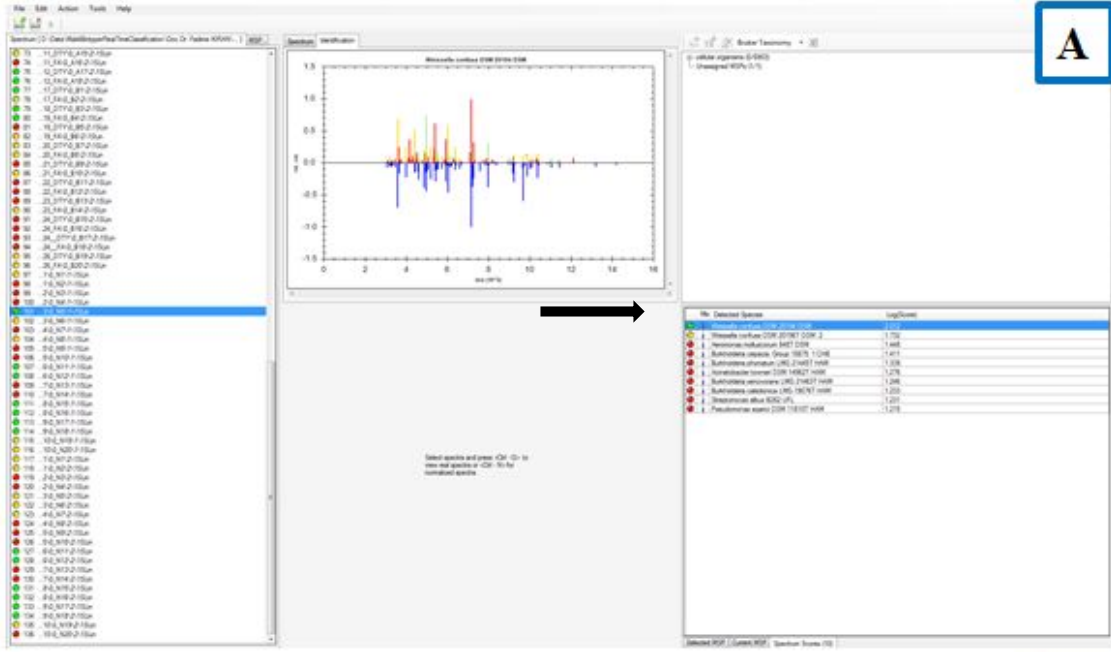
Şekil 4.1. Bakterilerin ışık mikroskopundaki Gram boyama görüntüleri, A. *Weissella cibaria* EIR/P-1; B. *Weissella cibaria* EIR/P-2



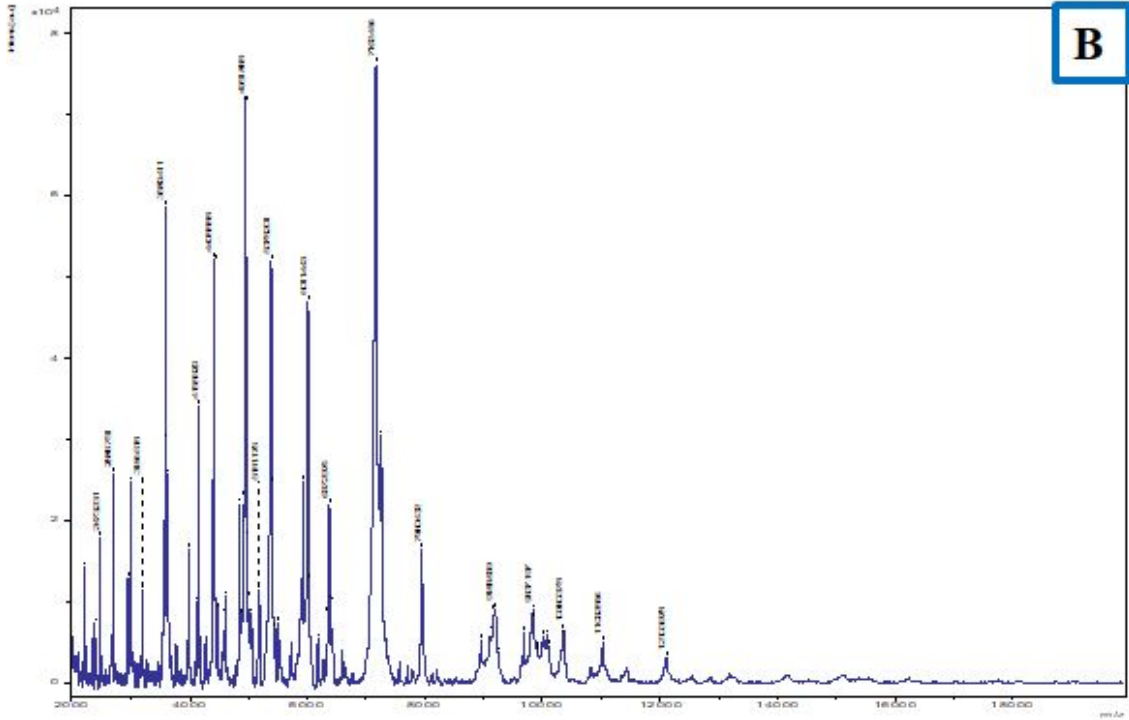
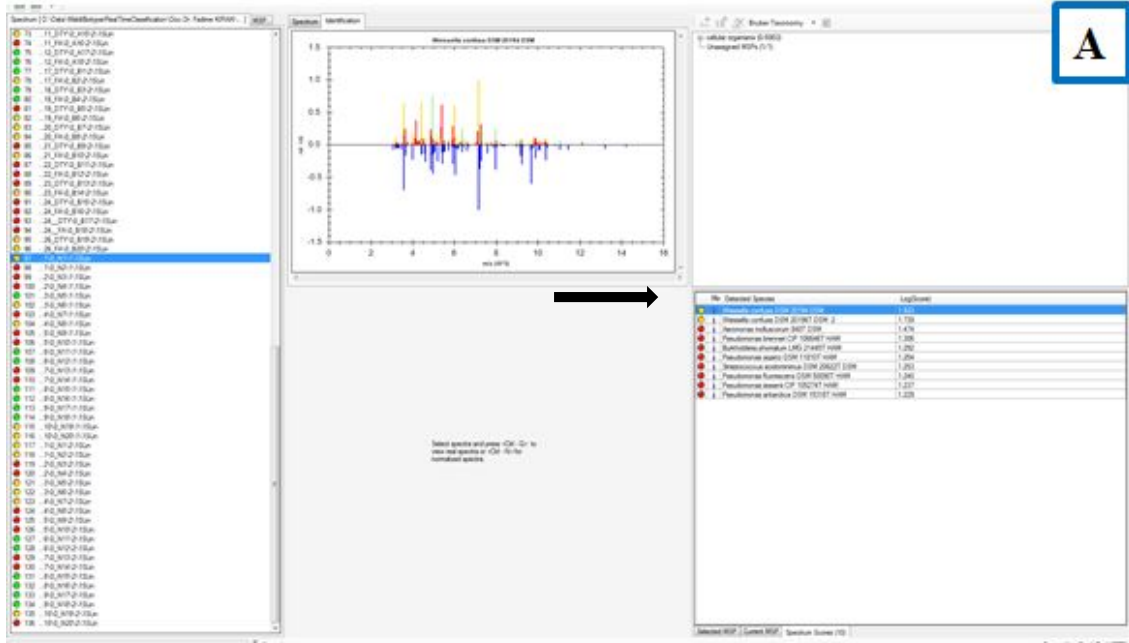
Şekil 4.2. Bakterilerin katalaz reaksiyonu, A. *Weissella cibaria* EIR/P-1; B. pozitif kontrol



Şekil 4.3. Bakterilerin hemolitik aktivite sonuçlarının petri görüntüleri, A. *Weissella cibaria* EIR/P-1:γ hemolitik; B. *Weissella cibaria* EIR/P-2:γ hemolitik



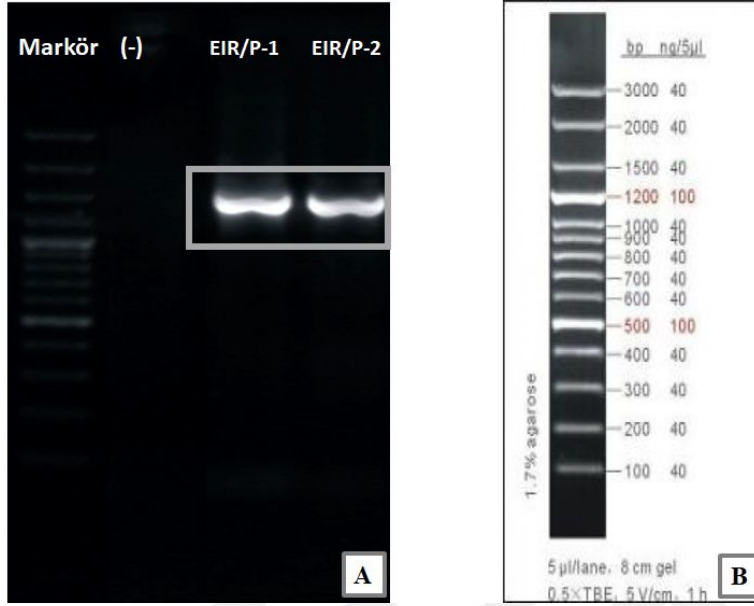
Şekil 4.4. *Weissella cibaria* EIR/P-1 izolatına ait A. MALDI-TOF analiz sonucu; B. hücre yüzey protein profili



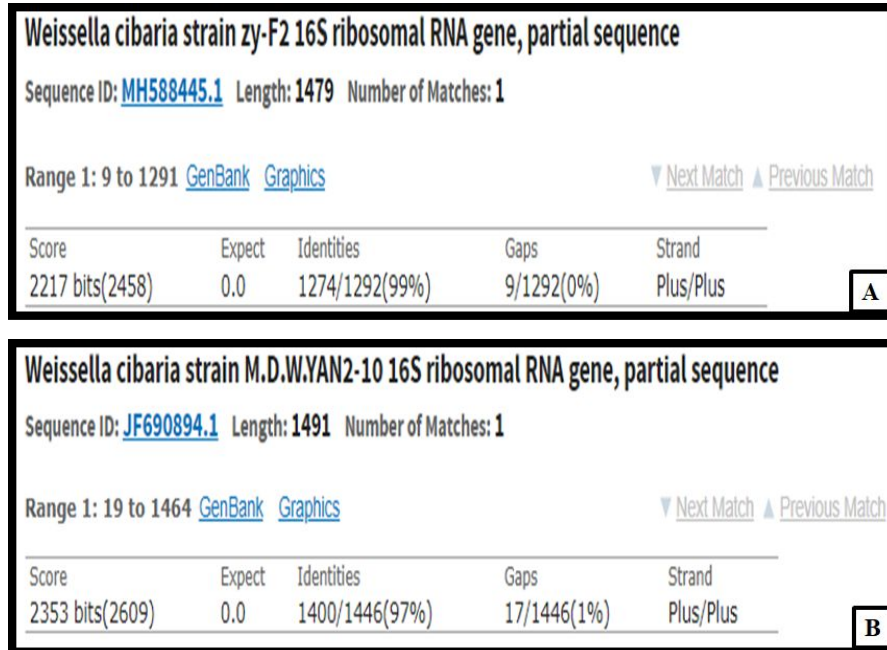
Şekil 4.5. *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatına ait A. MALDI-TOF analiz sonucu; B. hücre yüzey protein profili

Tablo 4.1. Seçilen izolatların DNA saflık ve miktar tayini sonuçları

BAKTERİ KODU	Konsantrasyon(ng/μl)	OD260/280	OD260/230
<i>Weissella cibaria</i> EIR/P-1	676,21	1.96	2.00
<i>Weissella cibaria</i> EIR/P-2	832,64	2.01	2.02



Şekil 4.6. A. İzolata ait 16S rRNA PZR ürününün (1492 bç) agaroz jel elektroforez görüntüsü, B. 100 bç DNA markörüne ait bant profilleri ve moleküler ağırlıkları



Şekil 4.7. 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına ait raporlar, A. *Weissella cibaria* EIR/P-1, B. *Weissella cibaria* EIR/P-2

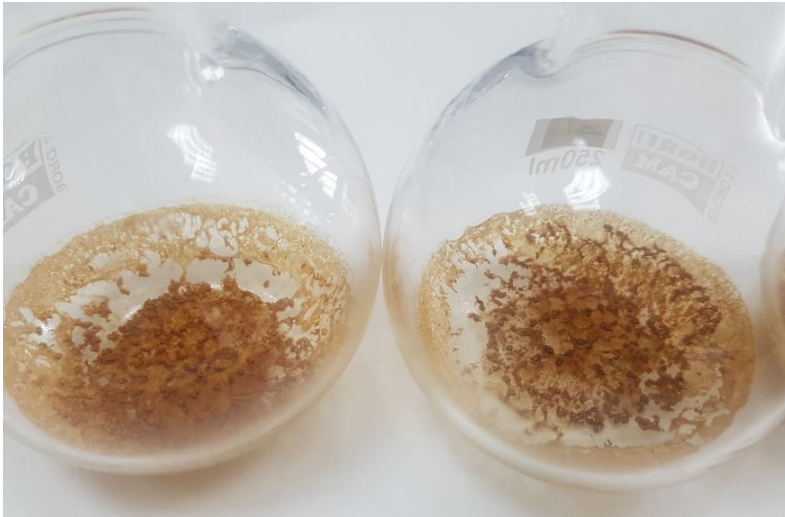
Gram-pozitif, spor oluşturmayan, hareketsiz, katalaz negatif, heterofermentatif ve kısa çubuk şeklinde karakterize edilen *Weissella* cinsi üyeleri; önceki yıllarda *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinsine dahil olmalarına rağmen, Collins, Samelis, Metaxopoulos, ve Wallbanks (1993) tarafından yeni bir cins olarak tanımlanmış ve bu gruplardan ayrılmıştır. *Weissella* cinsi *Weissella hellenica*, *W. paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. confusa*, *W. cibaria*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. halotolerans* ve *W. viridescens* gibi türleri içermektedir (Nisiotou, Dourou, Filippousi, Banilas, ve Tassou, 2014). *Weissella* suşları toprak, taze sebzeler, et, balık, fermente silaj, bal ve fermente yiyecek ve içecekler gibi çok çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. Bunun yanı sıra; panda, *Drosophila*, orangutan ve insan mikrobiyotası da dahil olmak üzere bir çok kaynaktan izolasyonuna yönelik güncel çalışmalar da mevcuttur (Du, Dai, Yao, Tan, ve Pan, 2018; Kang, Yeu, ve Hong, 2019; Ricks, Carroll, Walters, Newell, ve Chaston, 2017; Safika, Wardinal, Ismail, Nisa, ve Sari, 2019).

Çiçekli bitkilerin erkek gametofitleri olan polenler, bal arıları ve diğer böcekler tarafından yüksek enerjili bir malzeme olarak toplanmakta ve önemli bir gıda rezervi olarak saklanmaktadır. İnsan diyetinde de oldukça önemli bir besin kaynağı olan polen, geleneksel olarak tamamlayıcı bir gıda olarak kullanımının yanı sıra alternatif tedaviler amacıyla da kullanılmaktadır (Linskens ve Jorde, 1997). Yakın zamanda arı poleni mikrobiyotası ile ilgili çalışmalar hız kazanmasına rağmen, içerdikleri laktik asit bakteri türleri ve bunların fonksiyonel rolleri hakkında sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bundan dolayı arı poleni, yeni suşların izolasyonunda önemli bir kaynak olarak gösterilmektedir. Literatürde, çalışmamızda kullandığımız ana kaynağa benzer şekilde arı poleninden *W. cibaria* izolasyonunu içeren çalışmalar mevcuttur. Belhadj ve diğerleri (2014) ham arı poleni tanelerinden 567 adet bakteri izole etmişler ve fenotipik karakterizasyon neticesinde *Lactobacillus fermentum* olarak tanımladıkları suşun 16S rRNA dizi analizi neticesinde %99 dizi benzerliği ile *W. cibaria* II-I-59 (036924.1) olduğunu belirlemişlerdir. Gerçekleştirilen ileri dizi analiz çalışmaları neticesinde ise, panda ve *Drosophila* mikrobiyotasından izole edilen 2 farklı *W. cibaria* suşunun tüm genom analizi tamamlanmış ve 2.56 Mb büyüklüğündeki kromozomun 2420 gen taşıdığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler; *W. cibaria* suşunun başta gıda koruma aşamaları ile fermentasyon işlemlerinde kullanılma potansiyeli olmak üzere probiyotik etkinlik açısından da önemli özelliklere sahip olduğuna işaret etmektedir (Du ve diğerleri, 2018; Ricks ve diğerleri, 2017).

4.2. Postbiyotik Mediatörlerin Eldesi

Antioksidan etki ve hücre kültürü çalışmalarına dahil edilecek olan PM'ler bir önceki aşamada seçilen *Weissella cibaria* EIR/P-1 ve *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatlarından ekstrakte edilmiştir.

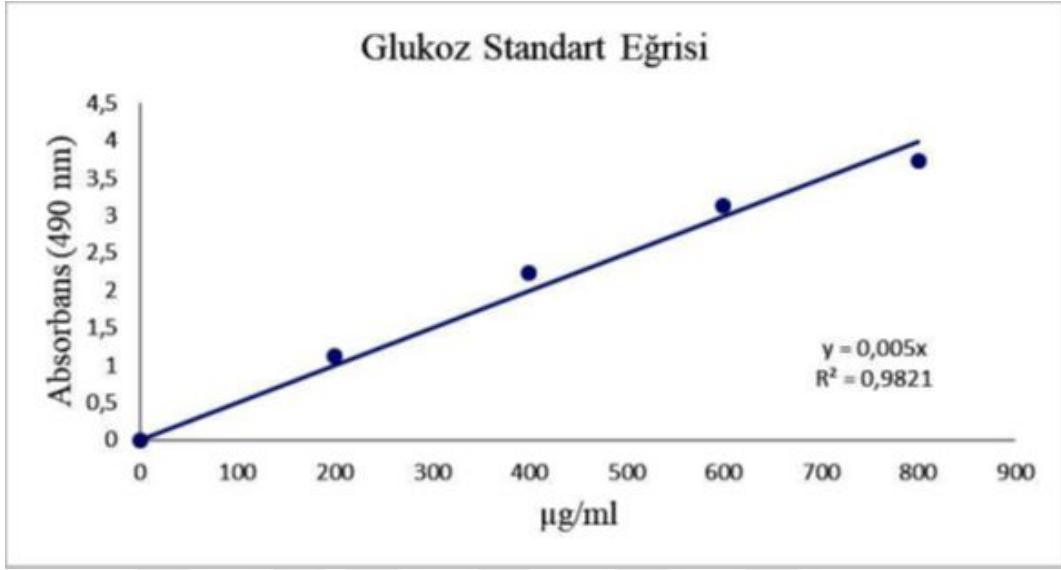
Weissella cibaria türlerine ait HBS'ler farklı amaçlara yönelik olmak üzere birçok çalışmada kullanılmıştır. Diş eti patojenlerine karşı anti-mikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada *W. cibaria* suşuna ait HBS'lerin H₂O₂, farklı organik asitler (okzalik asit, sitrik asit, suksinik asit, laktik asit, asetik asit), yağ asitleri ve l-laktat dehidrojenaz da dahil olmak üzere probiyotik ekinlik açısından önemli olabilecek 19 farklı protein içerdiği rapor edilmiştir (Lim, Yeu, Hong, ve Kang, 2018). Farklı bir çalışmada ise *W. cibaria* suşuna ait HBS'ler, koyun süt peynirinin olgunlaşmasını sağlamak amacıyla enzim kaynağı olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Calasso, Mancini, Di Cagno, Cardinali, ve Gobbetti, 2015). Tayvan yerel fermente gıdalarından izole edilen *W. cibaria* suşuna ait HBS kullanılarak saflaştırılan Weissellicin 110 bakteriyosini ise gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılmıştır (Wu, Sriornual, Yanagida, ve Chen, 2015). Bu çalışma kapsamında elde edilen HBS'ler (Şekil 4.8), liyofilizasyonu takiben direk olarak uygulamalara dahil edilmiştir.



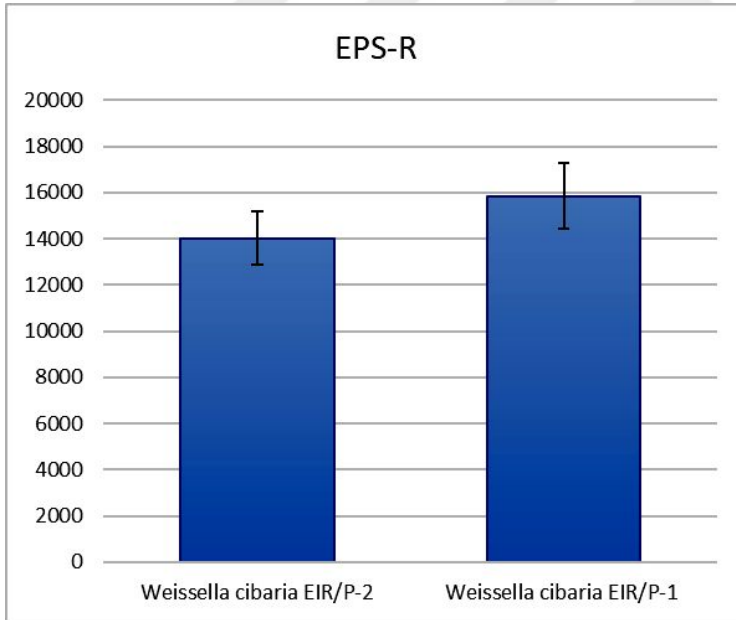
Şekil 4.8. *Weissella cibaria* EIR/P-1 ve *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatlarına ait liyofilize HBS görüntüsü

Çalışma kapsamında *W. cibaria* EIR/P-1 ve *W. cibaria* EIR/P-2 izolatlarından ekstrakte edilen EPS-R liyofilize edilmiş ve glukoz içeriği esas alınarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir. EPS-R miktarı glukoz standart eğrisinin temel alındığı (Şekil 4.9) fenol-sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, *W. cibaria* EIR/P-1 ve

W. cibaria EIR/P-2 izolatlarının sırasıyla $14,014 \pm 2,1$ mg/ml ile $15,845 \pm 1,8$ mg/ml (Şekil 4.10) EPS-R ürettikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Ekzopolisakkarit miktarını belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz standart eğrisi



Şekil 4.10. *Weissella cibaria* EIR/P-1 ve *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatlarının EPS-R üretim miktarları (µg/ml)

Elde edilen veriler, farklı kaynaklardan izole edilen çeşitli *W. cibaria* suşlarına ait EPS miktarları ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur. Probiyotik özellikler sergileyen *W. cibaria* suşuna ait EPS üretimi 6.35 g/L (Vasanthakumari, Harikumar, Beena, Pandey, ve Nampoothiri, 2015), tipik bir Çin turşusu olan Sichuan paocai'den izole edilen *W. cibaria*

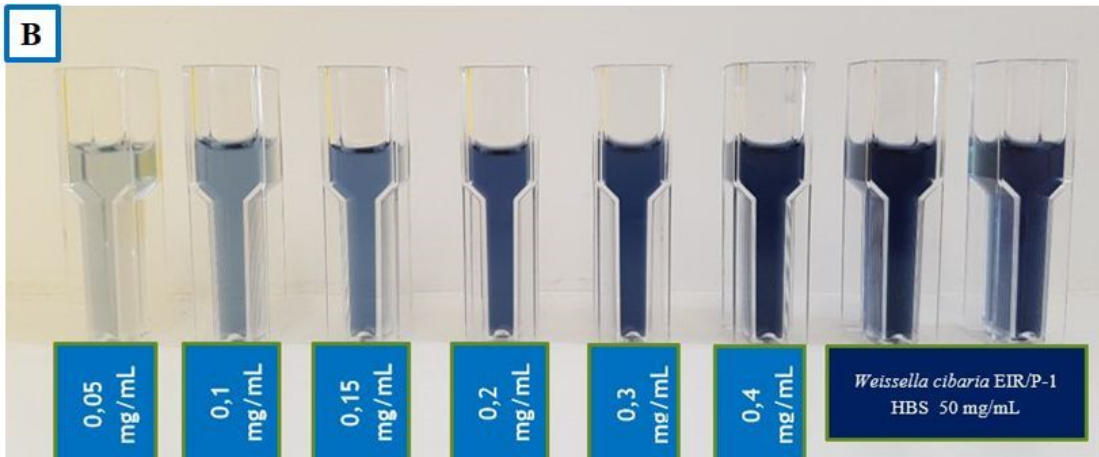
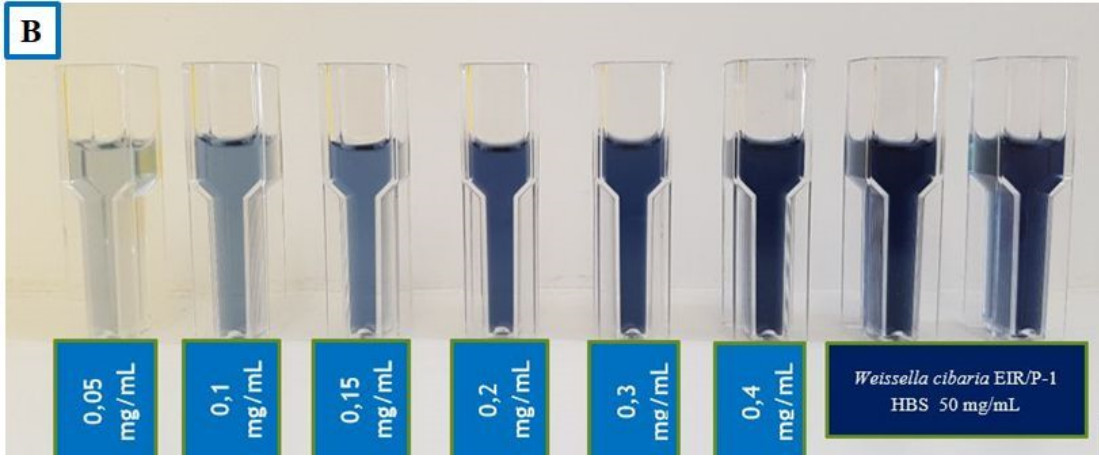
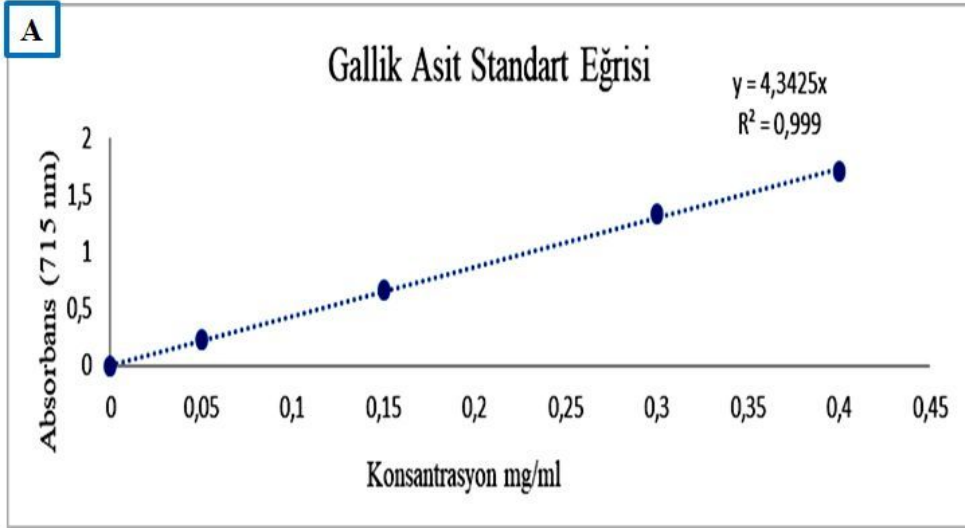
suşuna ait EPS üretimi ise 331.47 mg/L (Zhu ve diğerleri, 2018) olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz yüksek EPS miktarının en temel nedeni ise, EPS ekstraksiyonu için daha önce gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları neticesinde en verimli olduğu tespit edilen yöntemin kullanılmış olmasıdır (Almacıoğlu, 2013). Bununla beraber, ileri saflaştırma yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda ise daha yüksek EPS miktarları tespit edilebilmiştir. Ye, Chen, Wang, Yang, ve Bin (2018) tarafından Çin lahanası turşusundan izole edilen *W. cibaria* suşuna ait EPS üretimi 35.27 g/L olarak belirlenmiştir. *W. cibaria* suşuna ait EPS'lerin dekstran benzeri polisakkaritler olduğu da rapor edilmektedir (Vasanthakumari ve diğerleri, 2015)

4.3. Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

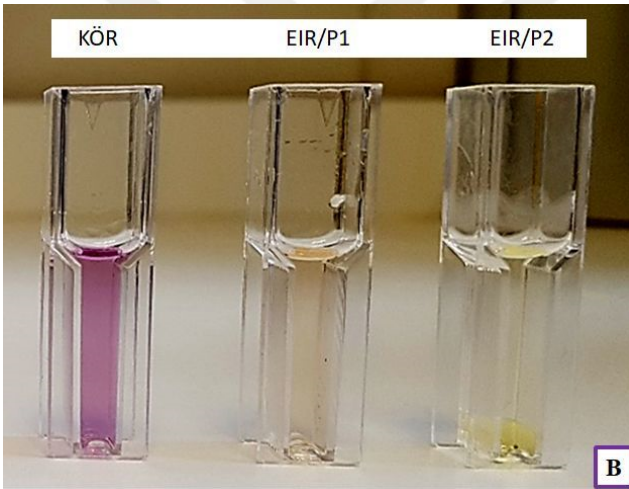
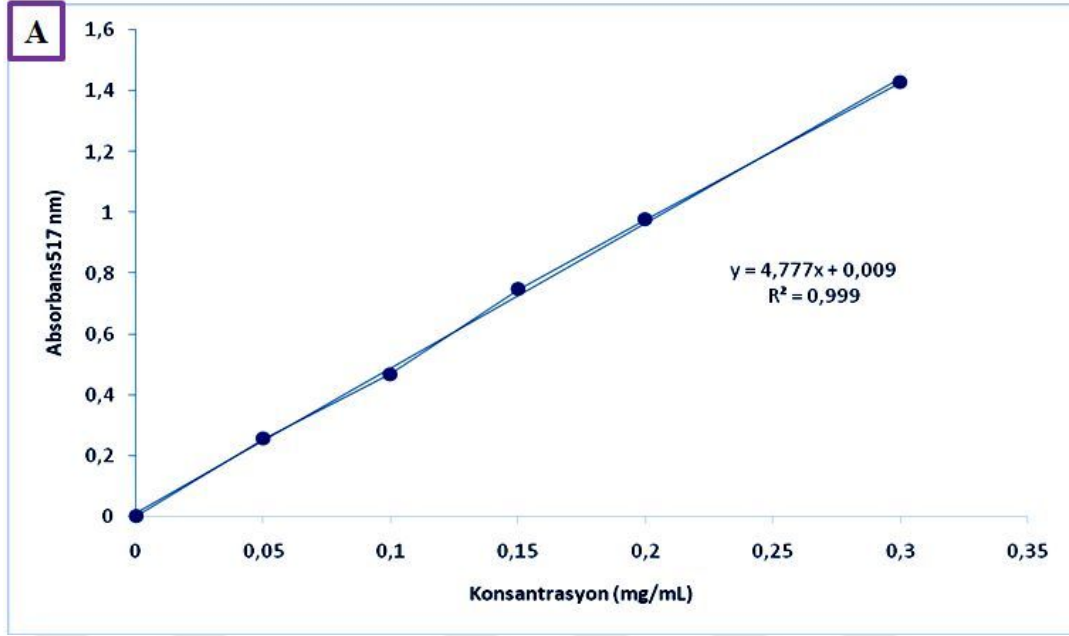
W. cibaria EIR/P-1 ve *W. cibaria* EIR/P-2 izolatlarına ait HBS ve EPS-R'lerin antioksidan etkileri fenolik madde miktarı ve DPPH radikalini giderici etkileri açısından değerlendirildiğinde, HBS'lerin yüksek antioksidan aktivite sergiledikleri belirlenmiştir. EPS-R'lerin ise kullanılan doz aralığında herhangi bir antioksidan etkinlikleri tespit edilememiştir.

Toplam fenolik madde miktarı tayini için GA standardı (kalibrasyon eğrisi) kullanılmıştır (Şekil 4.11a). Renk değişimleri spektrofotometrik yöntemler neticesinde değerlendirilmiş (Şekil 4.11b ve 4.11c) ve elde edilen sonuçlara göre; HBS'lerin fenolik içerikleri *W. cibaria* EIR/P-1 ve *W. cibaria* EIR/P-2 izolatları için sırasıyla $1,042 \pm 0,21$ ve $1,367 \pm 0,45$ mg GAE (gallik asit eşdeğeri) olarak belirlenmiştir.

DPPH radikalini giderici etkinin belirlenmesi amacıyla ise GA standardı (kalibrasyon eğrisi) kullanılmıştır (Şekil 4.12a). Renk değişimleri spektrofotometrik yöntemler neticesinde değerlendirilmiş (Şekil 4.12b) ve elde edilen sonuçlara göre; DPPH radikalini giderici etkileri *W. cibaria* EIR/P-1 ve *W. cibaria* EIR/P-2 izolatlarına ait 1mg/ml HBS'ler için sırasıyla $\%52 \pm 3,98$ ve $\%61 \pm 4,05$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. A. GA standart eğrisi, B ve C. GA standartında ve *Weissella cibaria* EIR/P-1 ile *Weissella cibaria* EIR/P-2 HBS'lerinde reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimleri



Şekil 4.12. A. GA standart eğrisi, B. K r, *Weissella cibaria* EIR/P-1 ile *Weissella cibaria* EIR/P2 HBS'lerinde (1mg/ml) reaksiyona bağlı meydana gelen renk değişimleri

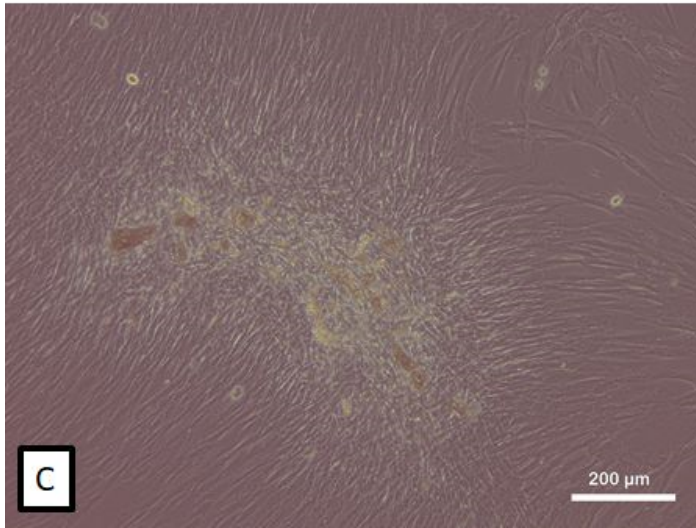
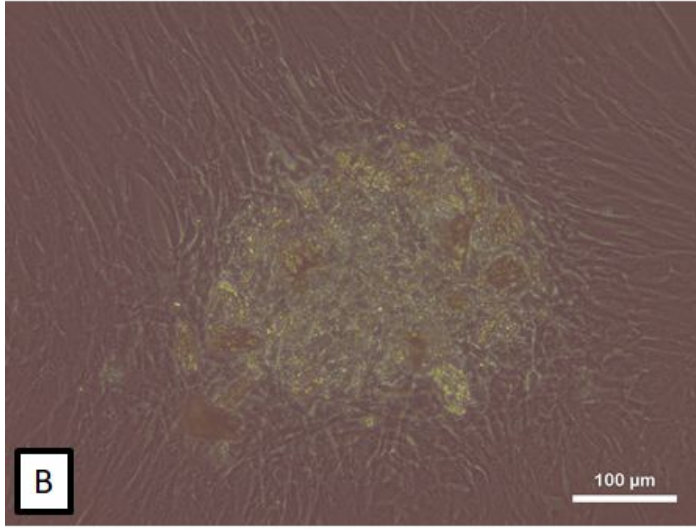
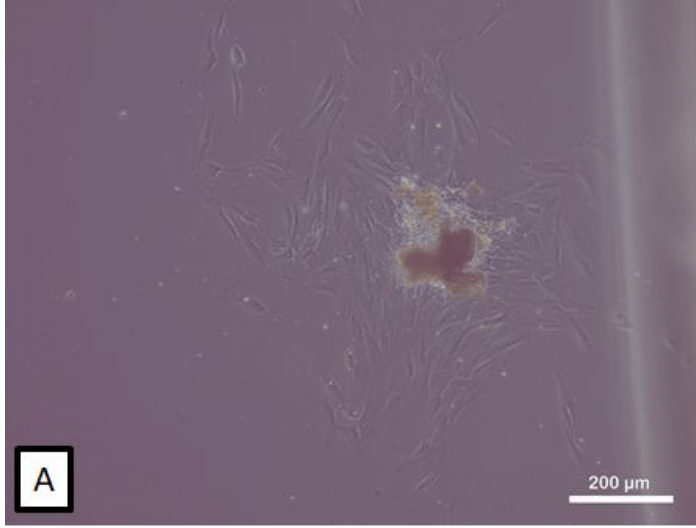
Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulunmuştur. Ta, Beena, V, Rejeesh, ve Archana (2019) tarafından hindistan cevizi suyundan izole edilen *W. cibaria* suşu tarafından üretilen HBS'nin DPPH radikalini giderici etkisi %27, *W. cibaria* KACC 91811P suşunun ise %23,53 (Yu ve diğerleri., 2019) olarak rapor edilmiştir. Liu ve Pan (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise çeşitli *Lactobacillus* türlerine ait HBS'lerin %8,7 ile 29 arasında DPPH radikalini giderici etkiye sahip oldukları belirtilmiştir.

Laktik asit fermantasyonu neticesinde meydana gelen antioksidan aktivitenin artışı,  -glukosidaz (EC 3.2.1.21), tanaz (EC 3.1.1.20), p-kumarik asit dekarboksilaz (PAD) (E.C. 4.1.1.102) veya feruloil esteraz (EC 3.1.1.73) gibi çeşitli enzimlerin aktivitesi ile

ilişkilendirilmektedir. Bu enzimler birçok LAB suşunda tanımlanmış olsa da *Weissella* türlerinde gerçekleştirilen çalışmalar sınırlı sayıdadır. Ancak *Weissella* türüne ait suşların enzim aktiviteleri diğer LAB suşları ile karşılaştırıldığında, 50 ile 100 kat daha fazla aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir (Fessard ve Remize, 2017). Dolayısıyla antioksidan aktivite açısından elde edilen etkili sonuçlar, *W. cibaria* izolatlarının fermentasyon süresince ürettikleri enzimlerin aktivitesi ile ilişkilendirilebilmektedir.

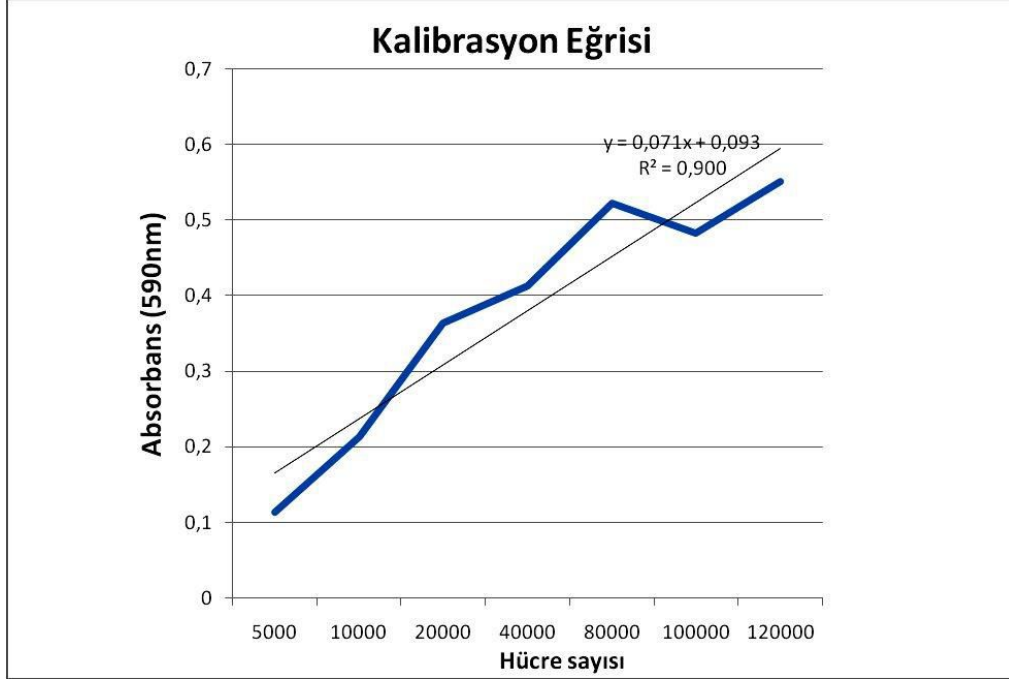
4.4. Postbiyotik Mediatörlerin İnsan Kaynaklı Periodontal Ligament Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri

PM'lerin iPDLF hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkinliklerinin değerlendirilebilmesi amacıyla; öncelikli olarak onam formu imzalatılmış sağlıklı bir bireyden diş (molar/pre-molar) temini gerçekleştirilmiş ve hücre kültürü teknikleri kullanılarak iPDLF hücreleri başarılı bir şekilde izole edilmiştir. İzole edilen hücreler kültürün ilk aşamasından itibaren koloni oluşturmuş ve bu kökten kendilerine özgü iğsi fibroblastik morfoloji sergileyerek prolifer olmuşturlardır. Belirli zaman aralıklarında kültüre edilen hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.13).



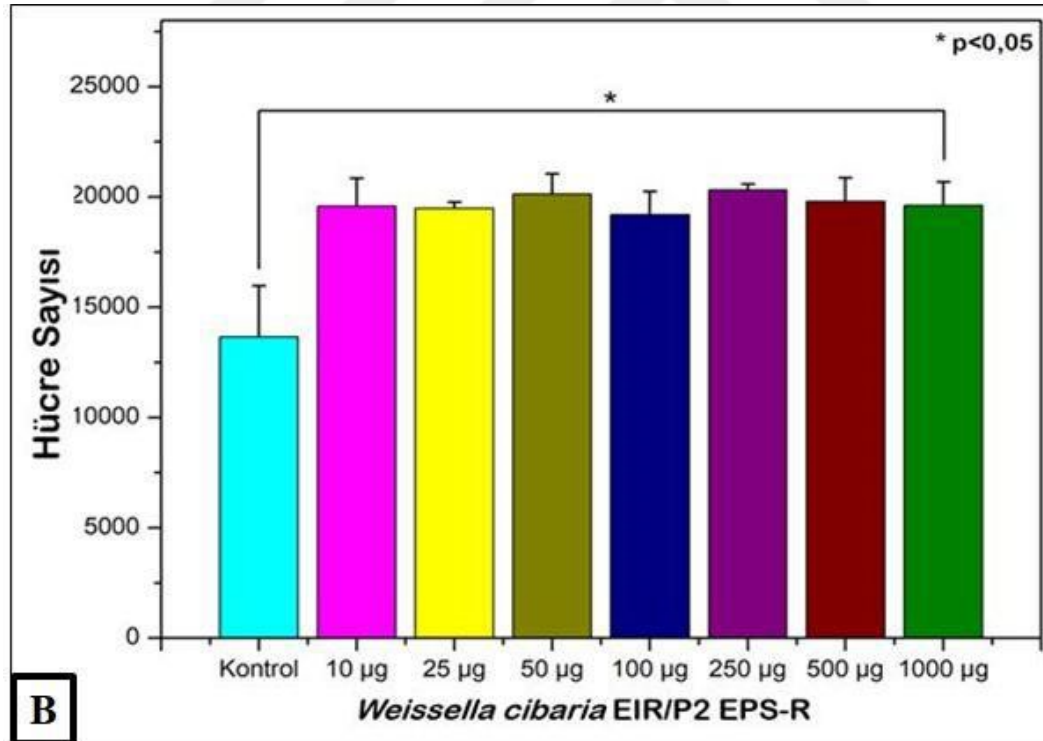
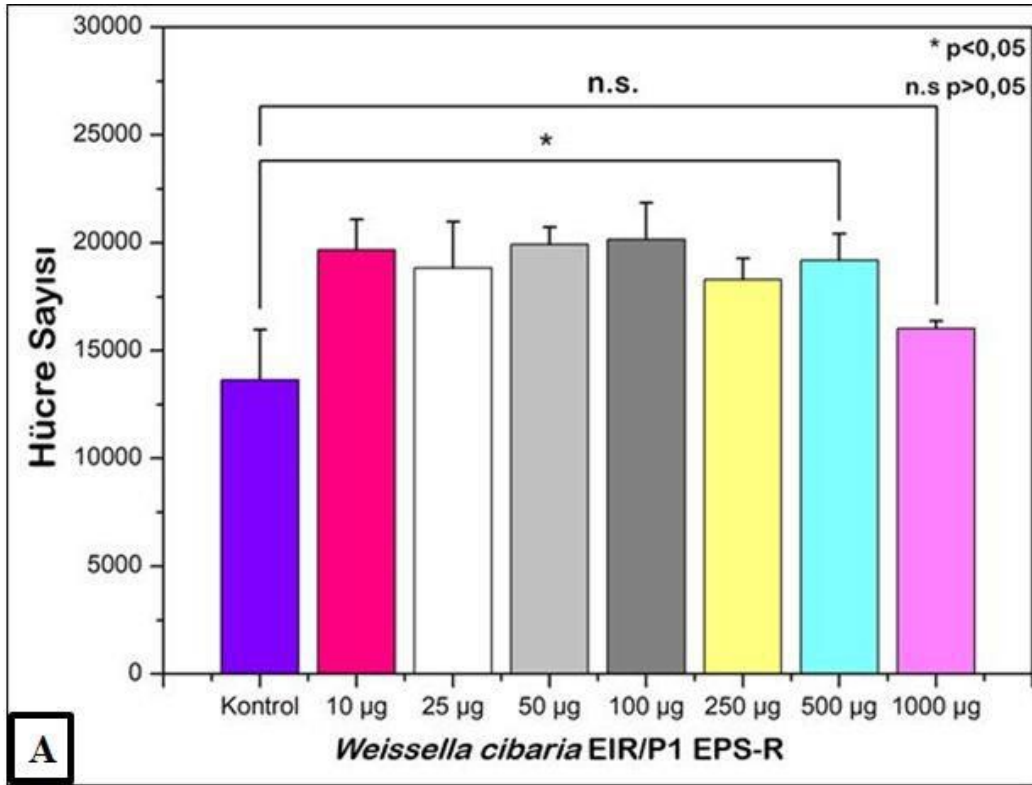
Şekil 4.13. 5.(a), 7.(b) ve 12.(c) günlerde iPDLF hücrelerinin invert faz-kontrast mikroskobu görüntüleri

Farklı konsantrasyonlarda (0-1000 µg/ml) hazırlanan PM'ler ile birlikte 24 saat süresince inkübe edilen iPDLF hücrelerinin canlılıkları MTT testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen spektrofotometrik değerler canlı hücre sayısına göre hazırlanan standart eğri (Şekil 4.14) dikkate alınarak değerlendirilmiş ve her iki izolata ait olan EPS-R ve HBS örneklerinin iPDLF hücre canlılığını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.15-4.16).

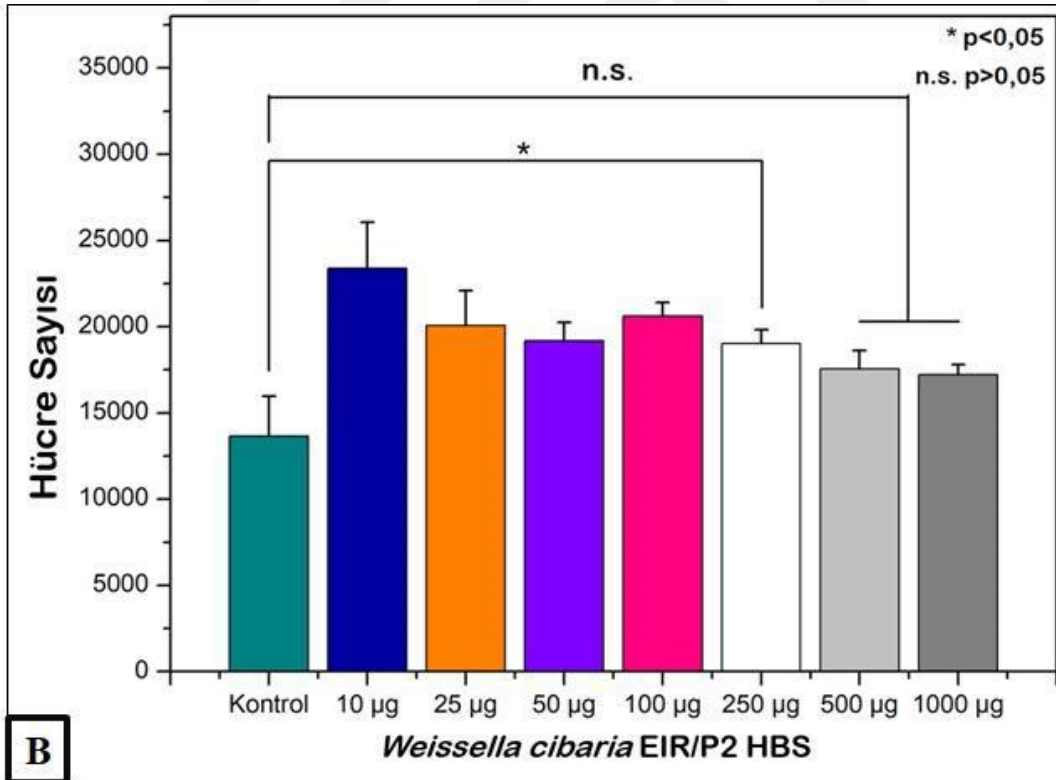
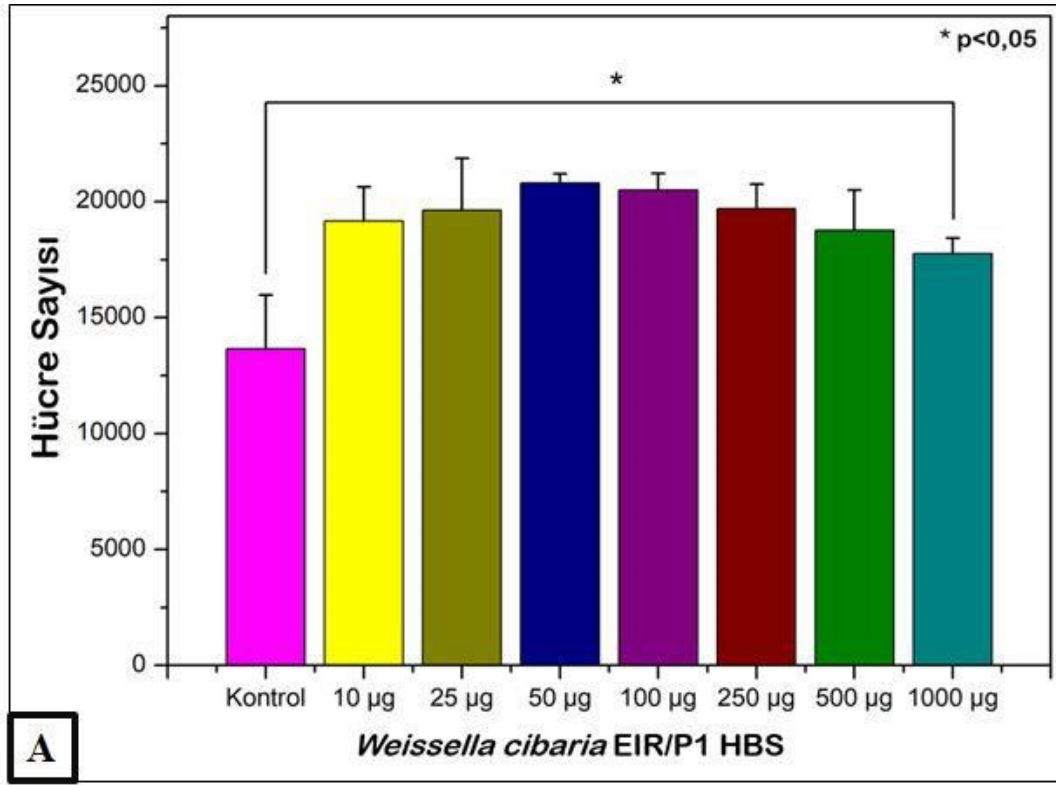


Şekil 4.14. MTT testi neticesinde oluşturulan canlı hücre sayısı standart (kalibrasyon) eğrisi

Farklı konsantrasyonlarda iPDLF hücre hatlarına uygulanan *Weissella cibaria* EIR/P1 izolatından elde edilmiş olan EPS-R'lerin 10 µg ila 500 µg arasındaki konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna olan etkileri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde hücre canlılığını arttırdığı ($p<0,05$), ancak >500 µg konsantrasyonuna sahip EPS-R'lerin ise kontrol grubu ile bir farkı olmadığı belirlenmiştir. *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatından elde edilen EPS-R'lerin ve *Weissella cibaria* EIR/P-1 izolatına ait HBS'lerin ise 10-1000 µg arasındaki tüm konsantrasyonlarının iPDLF hücreleri üzerinde kontrol grubuna göre etkinlikleri değerlendirildiğinde hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatına ait HBS'lerin ise 10-250 µg arasındaki konsantrasyonlarının iPDLF hücre canlılığını anlamlı düzeyde arttırarak proliferasyona katkı yaparken ($p<0,05$), >250 µg miktarındaki konsantrasyonların kontrol gurubu ile farkı olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.15. A. *Weissella cibaria* EIR/P-1 ve B. *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatına ait EPS-R'nin iPDFL hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 4.16. A. *Weissella cibaria* EIR/P-1 ve B. *Weissella cibaria* EIR/P-2 izolatına ait HBS'nin iPDLF hücre canlılığı üzerine etkisi

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Diş sağlığı yaşamın her evresinde genel sağlık durumunun önemli bir bileşeni olmuştur. 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 dikkat çekmektedir. Etkili bir periodontal tedavinin nihai hedefi, periodontiyumun tüm bileşenlerinin yenilenmesidir. Etkin bir yaklaşım ise; mikrobiyal etiyojolojiyi ve ilgili risk faktörlerini kontrol altına almayı, lokal inflamatuvar yanıtı ve buna bağlı oluşan oksidatif hasarı azaltmayı ve ilgili bölgenin rejenerasyonunu ve yumuşak doku ve kemik kaybını önlemeyi hedeflemelidir. Günümüzde periodontal hastalıklar nedeniyle yıkıma uğramış olan sert ve yumuşak dokuların rejenerasyonu için farklı cerrahi teknikler, çeşitli greft materyalleri, bariyer membranlar, büyüme faktörleri gibi çeşitli materyaller ve teknikler ile bu prosedürlerin kombinasyonları kullanılmakta ve farklı seviyelerde klinik başarılar elde edilebilmektedir. Gerçekleştirilen son çalışmalar; bu amaçla kullanılan ürünlere osteojenik farklılaşmayı desteklemek için simvastatin (Castro ve diğerleri, 2018; Ghadri ve diğerleri, 2018), anti-inflamatuvar özellik kazandırmak için Resveratrol (Wang ve diğerleri, 2018), anti-mikrobiyal etkinlik ve osteojenik farklılaşmayı desteklemek için çinko oksit (Nasajpour ve diğerleri, 2018), mezenkimal kök hücre fonksiyonunu güçlendirmek, kemik oluşumunu desteklemek ve bağışıklığı düzenlenmek için icariin (Zhang ve diğerleri, 2018) ilavelerini içermektedir. Ancak, üreticiler ve klinisyenler bu malzemelerin güvenilirliği ve toksisiteleri konusunda halen net değillerdir. Dolayısıyla; yeni ve doğal biyo-malzeme içeriklerinin geliştirilmesi hem hasta hem de küresel alanda büyük paya sahip mevcut pazar açısından halen önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, arı polenlerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş ve moleküler temelli çalışmalar neticesinde *Weissella cibaria* olarak tanımlanan iki izolat PM kaynağı olarak kullanılmıştır. PM'ler, canlı hücreler tarafından salgılanan ürünleri veya metabolik yan ürünleri, veya enzimler, peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevli muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzey proteinleri ve organik asitler gibi bakteriyel lizizden sonra ortaya çıkan çözünebilir faktörleri ifade etmektedir. Özellikle sinyal yolları ve bariyer fonksiyonu üzerinde canlı hücreler kadar etkili olduğu belirtilen postbiyotikler net kimyasal yapıları, güvenilir doz parametreleri, memeli enzimleri tarafından hidrolize karşı dirençli olmaları, uzun raf ömürleri ve anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, immüno-

modulator, anti-hipertansif, hipokolesterolemik, anti-kansinojenik ve anti-oksidan aktiviteye sahip olabilecek çeşitli sinyalleşme moleküllerini (mediatörler) içermeleriyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Ancak literatürde periodontal hastalıklar üzerinde PM'lerin etkinliklerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışmamızdan elde edilen veriler literatüre önemli katkılar sunacaktır.

Bu çalışmada PM kaynağı olarak *Weissella cibaria* izolatlarına ait EPS-R'ler ve HBS'ler kullanılmıştır. Her iki izolatında yüksek miktarda EPS üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak kullanılan dozlarda gerçekleştirilen analizler neticesinde antioksidan etkinliklerine rastlanılamamıştır. Bunun aksine, her iki izolata ait HBS'lerin antioksidan aktiviteleri oldukça etkili bulunmuştur. Bunun temel sebebinin, bakteri gelişimi sırasında hücre dışına salınan çok çeşitli metabolitlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *Weissella cibaria* izolatlarına ait EPS-R'ler ve HBS'lerin PDLF hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildiğinde ise, özellikle düşük dozların hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmaları ışığında bu ekstraktların, ağız sağlığı açısından önemli bir yer tutan PDLF hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin kayda değer olduğu ve bu ekstraktların ileride periodontal dokunun rejenerasyonunda tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda; hastaların yaşam kalitesi üzerinde olumsuz sonuçlara neden olan periodontal hastalıklar için en etkili olabilecek ürünlerin tasarlanmasına yönelik araştırmalar, gelişen teknolojiler ve bilimsel çalışmalar ışığında hız kazanmıştır. Ancak gerek literatür araştırmaları gerekse küresel pazar analizleri ve uzman görüşleri dikkate alındığında; periodontal hastalıkları hedef alan ürünler içerisinde kullanılabilecek yeni ve doğal içerikli biyo-malzemelerin geliştirilmesine yönelik halen karşılanmamış bir ihtiyaç bulunduğu dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında hedef ihtiyaçlara karşılık verebilmek amacıyla; tüm dünyada son yıllarda birçok alanda (gıda, çevre, sağlık, ziraat gibi) etkinlikleri kabul edilen probiyotiklerin üretmiş oldukları PM'lerin, periodontal hastalıklarda etkili bir yaklaşım olarak kullanım potansiyellerini belirlemek amacıyla ön bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde, özellikle hedef hücre canlılığını arttırdıkları belirlenen PM'lerin, hedef lokasyon odaklı tasarlanabilecek ve işlevsel olarak oluşturulacak her türlü yaklaşımda inovatif bir biyo-malzeme olarak kullanım potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdelnasser, S. M., Yahya, S. M. M., Mohamed, W. F., Asker, M. M. S., Abu Shady, H. M., Mahmoud, M. G., ve Gadallah, M. A. (2017). Antitumor exopolysaccharides derived from novel marine *Bacillus*: Isolation, characterization aspect and biological activity. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(7), 1847–1854. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.7.1847>
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., ve Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75(March), 105–114. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- Alm, A. (2008). On dental caries and caries-related factors in children and teenagers. *Swedish dental journal. Supplement*, (195), 7–63, 1p preceding table of contents. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18637315>
- Almacıoğlu, K., Probiyotik Özellik Gösteren Bazı Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin İmmunomodülatör Etkilerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi)
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., ve Pathak, H. (2014). Microbial Exopolysaccharides: Advances in Applications and Future Prospects. *Biotechnology Vol. 3: Microbial Biotechnology*, (July), 25. Erişim adresi: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3518.4484>
- Arnold, R. R., ve Ribeiro, A. A. (2019). Introduction to the Oral Cavity. İçinde *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota* (ss. 141–153). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-28737-5_6
- Ashi, H. (2017). *Sweet Taste Perception in Relation to Oral and General Health*.
- Ates, O. (2015). Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(December), 1–16. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Barça, E., Çifçibaş, E., ve Çintan, S. (2015). ADJUNCTIVE USE OF ANTIBIOTICS IN PERIODONTAL THERAPY. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 49(3), 55. Erişim adresi: <https://doi.org/10.17096/jiufd.90144>
- Beasley, S. S., ve Saris, P. E. J. (2004). Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Human Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 5051–5053. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.5051-5053.2004>
- Belhadj, H., Harzallah, D., Bouamra, D., Khennouf, S., Dahamna, S., ve Ghadbane, M.

- (2014). Phenotypic and genotypic characterization of some lactic acid bacteria isolated from bee pollen: A preliminary study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 33(1), 11–23. Erişim adresi: <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.11>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Cafiero, C., ve Matarasso, S. (2013). Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: ‘the 5Ps age’ has already started. *EPMA Journal*, 4(1), 16. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1186/1878-5085-4-16>
- Calasso, M., Mancini, L., Di Cagno, R., Cardinali, G., ve Gobbetti, M. (2015). Microbial cell-free extracts as sources of enzyme activities to be used for enhancement flavor development of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5874–5889. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9362>
- Castro, A. G. B., Löwik, D. W. P. M., Van Steenberghe, M. J., Jansen, J. A., Van Den Beucken, J. J. J. P., ve Yang, F. (2018). Incorporation of simvastatin in PLLA membranes for guided bone regeneration: effect of thermal treatment on simvastatin release. *RSC Advances*, 8(50), 28546–28554. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1039/c8ra04397c>
- Chaluvadi, S., Hotchkiss, A. T., ve Yam, K. L. (2016). Gut Microbiota. İçinde *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (ss. 515–523). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00036-8>
- Chantarawaratit, P., Sangvanich, P., Banlunara, W., Soontornvipart, K., ve Thunyakitpisal, P. (2014). Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. *Journal of Periodontal Research*, 49(2), 164–178. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jre.12090>
- Chen, F.-M., Sun, H.-H., Lu, H., ve Yu, Q. (2012). Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33(27), 6320–6344. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.048>
- Chen, F.-M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F., ve Wu, Z.-F. (2010). A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, 31(31), 7892–7927. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.019>
- Chen, Z. Y., Hsieh, Y. M., Huang, C. C., ve Tsai, C. C. (2017). Inhibitory effects of probiotic *Lactobacillus* on the growth of human colonic carcinoma cell line HT-29. *Molecules*,

- 22(1). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/molecules22010107>
- Chukkapalli, S. S., ve Lele, T. P. (2018). Periodontal cell mechanotransduction. *Open Biology*, 8(9), 180053. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1098/rsob.180053>
- Ciszek M. (2011). Biological function of exopolysaccharides from Probiotic bacteria. *Central European Journal of Immunology*, 36(1), 51–55.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., ve Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc- like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 595–603. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x>
- Dr. Brijendra Singh, D. B. S. (2013). Gingivitis – A silent disease. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 6(5), 30–33. Erişim adresi: <https://doi.org/10.9790/0853-0653033>
- Du, X., Dai, F., Yao, F., Tan, M., ve Pan, Q. (2018). Genome Sequence of Weissella cibaria M2, a Potential Probiotic Strain Isolated from the Feces of a Giant Panda . *Microbiology Resource Announcements*, 7(11), 1–2. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/mra.01121-18>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., ve Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., ve Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
- Fan, C., Zhang, X., ve Upton, Z. (2018). Anti-inflammatory effects of shikonin in human periodontal ligament cells. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 415–421. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1506482>
- Fessard, A., ve Remize, F. (2017). Why are Weissella spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? *Fermentation*, 3(3). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/fermentation3030038>
- Fierro-monti, C. (2017). Rol de los Probióticos como Bacterioterapia en Introducción. XIX, 30. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22592/o2017n30a2>
- Freitas, F., Alves, V. D., ve Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. *Trends in*

- Biotechnology*, 29(8), 388–398. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Gao, L., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., ve Chen, F. (2018). Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & Cell*, 9(5), 488–500. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1>
- Ghadri, N., Anderson, K. M., Adatrow, P., Stein, S. H., Su, H., Garcia-Godoy, F., Karydis, A., ve Bumgardner, J. D. (2018). Evaluation of Bone Regeneration of Simvastatin Loaded Chitosan Nanofiber Membranes in Rodent Calvarial Defects. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 09(02), 210–231. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4236/jbmb.2018.92012>
- Gjertsen, A. W., Stothz, K. A., Neiva, K. G., ve Pileggi, R. (2011). Effect of propolis on proliferation and apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 112(6), 843–848. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.08.004>
- Goršeta, K. (2015). Fissure Sealing in Occlusal Caries Prevention. İçinde *Emerging Trends in Oral Health Sciences and Dentistry: C. i* (s. 13). Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/59325>
- Haukioja, A. (2009). Probiotic Lactobacilli and bifidobacteria in the Mouth - in vitro Studies on Saliva-mediated Functions and Acid Production. İçinde *Helicobacter*.
- Holmlund, A. (2008). *Oral health and cardiovascular disease*.
- Holmlund, A., Lampa, E., ve Lind, L. (2017). Oral health and cardiovascular disease risk in a cohort of periodontitis patients. *Atherosclerosis*, 262, 101–106. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.009>
- Jäsberg, H. (2017). *Probiotic bifidobacteria and lactobacilli in oral health-interactions with biofilms and the host*. Erişim adresi: <https://doria32-kk.lib.helsinki.fi/handle/10024/135174>
- Jose, J. E., Padmanabhan, S., ve Chitharanjan, A. B. (2013). Systemic consumption of probiotic curd and use of probiotic toothpaste to reduce Streptococcus mutans in plaque around orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 144(1), 67–72. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2013.02.023>
- Joshi, D., Garg, T., Goyal, A. K., ve Rath, G. (2016). Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Delivery*, 23(2), 363–377. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.935531>

- Kang, M. S., Yeu, J. E., ve Hong, S. P. (2019). Safety evaluation of oral care probiotics Weissella cibaria CMU and CMS1 by phenotypic and genotypic analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/ijms20112693>
- Kesić, L., Milasin, J., Igic, M., ve Obradovic, R. (2008). Microbial Etiology of Periodontal Disease- Mini Review. *Medicine and biology*, 15 No. 1(1), 1–6.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., ve Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17038. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Kobayashi, R., Kobayashi, T., Sakai, F., Hosoya, T., Yamamoto, M., ve 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. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00623-9>
- Lamont, R. J., Koo, H., ve Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745–759. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Lim, H. S., Yeu, J. E., Hong, S. P., ve Kang, M. S. (2018). Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic weissella cibaria, CMU. *Molecules*, 23(8). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/molecules23081984>
- Linskens, H. E., ve Jorde, W. (1997). Pollen as. *New York*, 51(March 1995), 78–86.
- Listl, S., Galloway, J., Mossey, P. A., ve Marcenes, W. (2015). Global economic impact of dental diseases. *Journal of Dental Research*, 94(10), 1355–1361. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/0022034515602879>
- Liu, C. F., ve Pan, T. M. (2010). In vitro effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, 18(2), 77–86.
- Loesche, W. J., ve Grossman, N. S. (2001). Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 727–752. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.727-752.2001>
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., ve Arendt, E. K. (2018). Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 155–176. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537>
- Mailhot, J. M., Schuster, G. S., Garnick, J. J., Hanes, P. J., Lapp, C. A., ve Lewis, J. B. (1995). Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF- β 1

- stimulation. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(9), 679–685. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb00826.x>
- Malashree, L., Angadi, V., Yadav, K. S., ve Prabha, R. (2019). “Postbiotics” - One Step Ahead of Probiotics. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(01), 2049–2053. Erişim adresi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.801.214>
- Marchesan, J. T., Scanlon, C. S., Soehren, S., Matsuo, M., ve Kapila, Y. L. (2011). Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: A review. *Archives of Oral Biology*, 56(10), 933–943. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.003>
- Markowiak, P., ve Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). Erişim adresi: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Miguel, S. M.-S., Rupf, S., Frenzel, J., ve Eschrich, K. (2003). The effects of extracts from periodontopathic bacteria on human periodontal fibroblasts stimulated with mineralization supplements. *Journal of Oral Science*, 45(3), 127–137. Erişim adresi: <https://doi.org/10.2334/josnusd.45.127>
- Montero, E., Herrera, D., Marín, M. J., Figuero, E., Rodrigo, M., Iniesta, M., ve Sanz, M. (2017). Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(7), 708–716. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12752>
- Morales, A., Bravo-Bown, J., Bedoya, J., ve Gamonal, J. (2017a). Probiotics and Periodontal Diseases. İçinde *Insights into Various Aspects of Oral Health: C. i* (s. 13). Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.68814>
- Morales, A., Bravo-Bown, J., Bedoya, J., ve Gamonal, J. (2017b). Probiotics and Periodontal Diseases. İçinde *Insights into Various Aspects of Oral Health: C. i* (s. 13). Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.68814>
- 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., ... Ribeiro, A. A. (2019). Introduction to the Oral Cavity. *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota*, 28(10194), 141–153. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201703437>
- 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.,

- ve Tamayol, A. (2018a). A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics. *Advanced Functional Materials*, 28(3), 1–8. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201703437>
- 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., ve Tamayol, A. (2018b). A Multifunctional Polymeric Periodontal Membrane with Osteogenic and Antibacterial Characteristics. *Advanced Functional Materials*, 28(3), 1703437. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201703437>
- Nisiotou, A., Dourou, D., Filippousi, M. E., Banilas, G., ve Tassou, C. (2014). *Weissella uvarum* sp. nov., Isolated from wine grapes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3885–3890. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066209-0>
- Oda, H., Nakagawa, T., Maruyama, K., Dono, Y., Katsuragi, H., ve Sato, S. (2016). Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. *Journal of Oral Biosciences*, 58(2), 50–54. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.job.2015.11.001>
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzan, H., Allison, P., ve Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Presti, I., D’Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., ve Di Gennaro, P. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5613–5626. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6482-8>
- Rajeshwari, H. R., Dhamecha, D., Jagwani, S., Rao, M., Jadhav, K., Shaikh, S., Puzhankara, L., ve Jalalpure, S. (2019). Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *Journal of Controlled Release*. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.038>
- Ramenzoni, L. L., Russo, G., Moccia, M. D., Attin, T., ve Schmidlin, P. R. (2019). Periodontal bacterial supernatants modify differentiation, migration and inflammatory cytokine expression in human periodontal ligament stem cells. *PLoS ONE*, 14(7), 1–19. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219181>
- Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., ve Branch-Mays, G. L. (2010). Regeneration

- of Periodontal Tissue: Bone Replacement Grafts. *Dental Clinics of North America*, 54(1), 55–71. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.09.003>
- Ricks, N. J., Carroll, C., Walters, A., Newell, P. D., ve Chaston, J. M. (2017). Genome Sequence of *Weissella cibaria* DmW_103, Isolated from Wild *Drosophila*. *Genome Announcements*, 5(24), 4–5. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00512-17>
- Safiaghdam, H., Oveissi, V., Bahramsoltani, R., Farzaei, M. H., ve Rahimi, R. (2018). Medicinal plants for gingivitis: A review of clinical trials. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(10), 978–991. Erişim adresi: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.31997.7690>
- Safika, S., Wardinal, W., Ismail, Y. S., Nisa, K., ve Sari, W. N. (2019). *Weissella*, a novel lactic acid bacteria isolated from wild Sumatran orangutans (*Pongo abelii*). *Veterinary World*, 12(7), 1060–1065. Erişim adresi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1060-1065>
- Saha, S. (2014). *A new probiotic approach for the prevention and/or treatment of dental caries, oral candidiasis and periodontal diseases*. (December), 561–565.
- Schmid, J., Sieber, V., ve Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–24. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Aıl, Y., Glüer, C.-C., ve Schrezenmeir, J. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 838S–846S. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.838s>
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., ve Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. Erişim adresi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Seubbuk, S., Sritanaudomchai, H., Kasetsuwan, J., ve Surarit, R. (2017). High glucose promotes the osteogenic differentiation capability of human periodontal ligament fibroblasts. *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 2788–2794. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6333>
- Shi, L. H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Mohd Ismail, N. I., ve Yin, O. S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical Life Sciences Research*, 27(2), 73–90. Erişim adresi: <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6>
- Siaili, M., Chatzopoulou, D., ve Gillam, D. G. (2018). An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. *Saudi Dental Journal*,

- 30(1), 26–37. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2017.11.001>
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., ve Jr, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Stamatova, I. V. (2010). *Probiotic activity of Lactobacillus delbrueckii subsp . bulgaricus in the oral cavity*.
- Ta, A., Beena, A. K., V, A. S., Rejeesh, R., ve Archana, C. (2019). *Antioxidant property of Weissella cibaria DMA 18 isolated from tender coconut water*. 8(9), 1–6. Erişim adresi: <https://doi.org/2277-7695>
- Tahir, L., ve Nazir, R. (2018). Dental Caries, Etiology, and Remedy through Natural Resources. İçinde *Dental Caries - Diagnosis, Prevention and Management: C. i* (s. 13). Erişim adresi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.75937>
- Tallon, R., Bressollier, P., ve Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705–712. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>
- Tamil, T. H. E., ve Medical, N. M. G. R. (2018). *MASTER OF DENTAL SURGERY BRANCH – II*.
- Toiviainen, A. (2015). *Probiotics and Oral Health : in Vitro and Clinical Studies*.
- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., ve Otomo- Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456–462. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
- Vasanthakumari, D. S., Harikumar, S., Beena, D. J., Pandey, A., ve Nampoothiri, K. M. (2015). Physicochemical Characterization of an Exopolysaccharide Produced by a Newly Isolated *Weissella cibaria*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(2), 440–453. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1586-2>
- Vasanthakumari, S., Surya, H., ve Giriya, R. (2015). LWT - Food Science and Technology Characterization of an exopolysaccharide with potential health- bene fi t properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1179–1186. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>
- Vinicius, G., Pereira, D. M., Coelho, B. D. O., Irineudo, A., Júnior, M., Thomaz-soccol, V., ve Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic ? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060–2076. Erişim adresi:

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

- Vivekananda, M. R., Vandana, K. L., ve Bhat, K. G. (2010). Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (prodentis) in the management of periodontal disease: A preliminary randomized clinical trial. *Journal of Oral Microbiology*, 2(2010), 1–9. Erişim adresi: <https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5344>
- Wang, Y. J., Zhao, P., Sui, B. D., Liu, N., Hu, C. H., Chen, J., Zheng, C. X., Liu, A. Q., Xuan, K., Pan, Y. P., ve Jin, Y. (2018). Resveratrol enhances the functionality and improves the regeneration of mesenchymal stem cell aggregates. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(6). Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0109-y>
- Wu, H. C., Srionnual, S., Yanagida, F., ve Chen, Y. S. (2015). Detection and characterization of weissellicin 110, a bacteriocin produced by *Weissella cibaria*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13(3), 63–67. Erişim adresi: <https://doi.org/10.15171/ijb.1159>
- Yadav, K., ve Prakash, S. (2016). Pengaruh Metode Pembelajaran Demonstrasi Terhadap. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 73–80. Erişim adresi: <https://doi.org/10.15272/ajbps.v6i53.773>
- Ye, G., Chen, Y., Wang, C., Yang, R., ve Bin, X. (2018). Purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Weissella cibaria* YB-1 from pickle Chinese cabbage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1315–1321. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.019>
- Yu, H.-S., Lee, N.-K., Choi, A.-J., Choe, J.-S., Bae, C. H., ve Paik, H.-D. (2019). Antagonistic and antioxidant effect of probiotic *Weissella cibaria* JW15. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 851–855. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0519-6>
- Zahradnik, R. T., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C. H., ve Hillman, J. D. (2009). Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3™ a probiotic mouthwash. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 682–690. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04243.x>
- Zeichner-David, M. (2006). Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology 2000*, 41(1), 196–217. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00162.x>
- Zhan, D., Guo, L., ve Zheng, L. (2018). Inhibition of the receptor for advanced glycation promotes proliferation and repair of human periodontal ligament fibroblasts in response to high glucose via the NF-κB signaling pathway. *Archives of Oral Biology*,

87(December 2017), 86–93. Erişim adresi:
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.011>

Zhang, X., Han, N., Li, G., Yang, H., Cao, Y., Fan, Z., ve Zhang, F. (2018). Local icariin application enhanced periodontal tissue regeneration and relieved local inflammation in a minipig model of periodontitis. *International Journal of Oral Science*, 10(2), 19. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0020-3>

Zhang, Y., Wang, X., Li, H., Ni, C., Du, Z., ve Yan, F. (2018). Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99(January), 883–893. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146>

Zhu, Y., Wang, C., Jia, S., Wang, B., Zhou, K., Chen, S., Yang, Y., ve Liu, S. (2018). Purification, characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide from *Weissella cibaria* SJ14 isolated from Sichuan paocai. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115(2017), 820–828. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.067>

EKLERİ

EKLERİ

EK 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-050.01.04-E.1900106861
Konu : Başvuru İncelemesi(Dr. Öğr.
Üyesi Yavuz Emre ARSLAN)

30/07/2019

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğumuz "Probiyotik Kaynaklı Postbiyotik Mediatorlerin İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı 2011-KAEK-27/2019-E.1900085766 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 24.07.2019 tarih ve 14-08 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 24.07.2019
Karar No :2019-14

Karar08)2011-KAEK-27/2019-E.1900085766 no'lu araştırma Etik Kurul üyeleri tarafından değerlendirilmiştir. Proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'ın sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR." Kararı verilmiştir.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Belge Doğrulamak İçin: <https://ubys.comu.edu.tr/ERMS/Record/ConfirmationPage/Index> adresinden HHCTFE koda girerek belgeyi doğrulayabilirsiniz.

Adres : Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi
Çanakkale
e-posta : kadiryilmaz@comu.edu.tr

Bilgi İçin İrtibat : Kadir Yılmaz - Sekreter
Telefon :
Belgegeçer No :
İnternet Adresi :



1900106861 numaralı belge, 3070 sayılı Elektronik İmza Kanunun 5. maddesi gereğince 08.07.2019 tarihinde 30.07.2019 tarihinde güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hazal KİBAR
Doğum Yeri : ŞİRAN
Doğum Tarihi : 08.01.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2017
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler-Uluslararası-Ulusal:

Önbaş T., **Kibar H.**, Osmanağaoğlu Ö., Kıran F., “*Biyoterapötik yara örtüsü içeriğinde kullanılmak üzere etkin probiyotik suşun belirlenmesi*”, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), Ankara, TÜRKİYE, 26-27 Nisan 2018, pp.305-305

Kibar H., Kıran F., “*Potential Probiotics and Their Postbiotics Mediators for Periodontal Infections Control*”, II. International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Durres, ALBANIA, 9-12 Kasım 2018, pp.107-107

Kibar H., Arslan Y.E., Kıran F., “*Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Postbiyotik Mediatorların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi*”, International Symposium on Academic Studies in Science, Engineering and Architecture Studies (ISMS 2019), Ankara, TÜRKİYE, 13-15 Haziran 2019, pp.56-56

İLETİŞİM

E-posta Adresi : hazalkibar95@gmail.com
ORCID : 0000-0002-5188-7698