

**PERİODONTAL HASTALIKLARIN BİYOBELİRTEÇ
OLARAK SERUM VE TÜKÜRÜK IGG N-GLİKAN
PROFİLLERİ İLE TOPLAM SERUM N-GLİKANLARININ
KARAKTERİZASYONU**

**CHARACTERIZATION OF SERUM AND SALIVARY IGG
N-GLYCAN PROFILES AND TOTAL SERUM N-
GLYCANS AS BIOMARKERS FOR PERIODONTAL
DISEASES**

FATİH ÇAKIR

PROF. DR. BEKİR SALİH

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2025



Aileme...

ÖZET

PERİODONTAL HASTALIKLARIN BİYOBELİRTEÇ OLARAK SERUM VE TÜKÜRÜK IGG N-GLİKAN PROFİLLERİ İLE TOPLAM SERUM N-GLİKANLARININ KARAKTERİZASYONU

Fatih ÇAKIR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Nisan 2025, 67 Sayfa

Bu tez çalışmasında, serum ve tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerinin ve toplam serum N-bağlantılı Glikan (N-glikan) profillerinin karakterizasyonu yapılarak periodontal hastalıklarla ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmada, sağlıklı bireyler, gingivitis ve periodontitis hastalarından alınan serum ve tükürük örnekleri kullanılmıştır. Serum IgG ve toplam serum N-glikanları yüksek performanslı sıvı kromatografisi-hidrofilik etkileşim kromatografisi (HPLC-HILIC-FLD) sistemi ile analiz edilmiştir. Tükürükten izole edilen IgG glikopeptitleri ise nano-akışlı sıvı kromatografisi-kuadrupol zaman uçuşlu kütle spektrometresi (nLC-QTOF-MS/MS) kullanılarak incelenmiştir. Glikan ve glikopeptit profilleri, göreceli alan yüzdeleri üzerinden değerlendirilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis ANOVA testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, belirlenen glikan yapıların periodontal hastalıkların tanısındaki ayırt edicilik performansları ROC (Receiver Operating Characteristic) analizleri ile incelenmiştir.

Toplam serum N-glikan sonuçlarına göre, G12 glikanı (H4N3F1S1) 0.75 AUC değeri ile gingivitis tanısında güçlü bir ayırt edici özellik sergilemiştir. Bu glikan yapısı, erken dönem periodontal inflamasyonun biyokimyasal olarak saptanmasında umut vadeden bir biyobelirteç adayı olarak öne çıkmaktadır. G20 glikanı (H5N4F1S2) ise 0.68 AUC değeri ile periodontitis tanısında orta düzeyde ayırt edicilik göstermiş ve klinik anlamda faydalı olabilecek bir belirteç olarak değerlendirilmiştir.

Serum ve tükürük IgG N-Glikan sonuçlarına göre, H5N4 ve H5N4F1 glikanlarının sırasıyla 0.64 ve 0.68 AUC değerleriyle periodontitis tanısında, H3N5F1 ve H5N4 glikanlarının sırasıyla 0.65 ve 0.61 AUC değerleriyle gingivitis tanısında belirli düzeyde tanısal performans sergiledikleri söylenebilir.

Glikopeptit analizleri de benzer şekilde önemli bulgular ortaya koymuştur. IgG1-H3N5F1 glikopeptiti gingivitis grubunda yüksek seviyelerde tespit edilmiş, bu durum sağlıklı ve periodontitis gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. IgG1-H4N5F1 glikopeptiti, 0.79 AUC değeri ile gingivitis tanısında güçlü bir ayırt ediciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Periodontitis grubunda ise IgG1-H5N4F1S2 glikopeptitinin daha yüksek düzeylerde bulunması, bu yapının ileri doku yıkımıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, periodontitis ve gingivitis gibi periodontal hastalıkların hem IgG'ye özgü hem de toplam serum N-glikan profillerinde özgün değişimler belirlenmiştir. Tükürükten elde edilen sonuçlar, serum ile benzer eğilimler göstermiştir. Bu bulgular hem IgG'ye özgü hem de toplam serum glikan değişimlerinin periodontal hastalıkların non-invaziv tanısında ve hastalık ilerleyişinin izlenmesinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gingivitis, Biyobelirteç, N-Glikan, Glikomik, Glikoproteomik, Post-translasyonel Modifikasyon

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SERUM AND SALIVARY IGG N-GLYCAN PROFILES AND TOTAL SERUM N-GLYCANS AS BIOMARKERS FOR PERIODONTAL DISEASES

Fatih ÇAKIR

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH

April 2025, 67 pages

In this thesis study, the characterization of N-linked (N-glycan) profiles of IgG molecules isolated from serum and saliva samples, as well as total serum N-glycans, was performed to investigate their associations with periodontal diseases. Serum and saliva samples were collected from healthy individuals, gingivitis, and periodontitis patients. Serum IgG and total serum N-glycans were analyzed using high-performance liquid chromatography-hydrophilic interaction chromatography with fluorescence detection (HPLC-HILIC-FLD). IgG glycopeptides isolated from saliva were analyzed using nano-liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (nLC-QTOF-MS/MS). Glycan and glycopeptide profiles were evaluated based on relative area percentages, and differences between groups were determined using the Kruskal-Wallis ANOVA test. Additionally, the diagnostic performance of selected glycan structures in periodontal diseases was assessed through ROC analyses.

According to the total serum N-glycan results, the G12 glycan (H4N3F1S1) exhibited strong discriminatory potential in the diagnosis of gingivitis, with an AUC value of 0.75. This glycan structure emerges as a promising biomarker candidate for the biochemical detection of early-stage periodontal inflammation. On the other hand, the G20 glycan (H5N4F1S2) demonstrated a moderate discriminatory ability for periodontitis with an AUC value of 0.68, suggesting its potential clinical utility as a diagnostic marker.

Based on the serum and salivary IgG N-glycan results, H5N4 and H5N4F1 glycans showed AUC values of 0.64 and 0.68, respectively, indicating their relevance in periodontitis diagnosis. Meanwhile, H3N5F1 and H5N4 glycans, with AUC values of 0.65 and 0.61, respectively, demonstrated moderate diagnostic performance in identifying gingivitis.

Glycopeptide analyses revealed similarly significant findings. The IgG1-H3N5F1 glycopeptide was found at elevated levels in the gingivitis group, showing a statistically significant difference compared to healthy and periodontitis groups. Additionally, IgG1-H4N5F1 glycopeptide achieved an AUC of 0.79, indicating a strong discriminatory power for gingivitis diagnosis. In contrast, the higher abundance of IgG1-H5N4F1S2 glycopeptide in the periodontitis group suggests a potential association with advanced tissue destruction.

The results revealed distinct changes in both IgG-specific and total serum N-glycan profiles associated with periodontal diseases such as periodontitis and gingivitis. The findings from saliva samples exhibited trends similar to those observed in serum. These results suggest that alterations in both IgG-specific and total serum glycan profiles have the potential to serve as non-invasive biomarkers for the diagnosis and monitoring of periodontal diseases.

Keywords: Gingivitis, Biomarkers, Glycomics, Glycoproteomics, Post-translational Modification

TEŞEKKÜR

Öncelikle, kıymetli danışmanım Prof. Dr. Bekir Salih hocama tez süreci boyunca bana rehberlik ettiği, bilgi ve deneyimiyle yolumu aydınlattığı, sabrı ve desteği için sonsuz teşekkür ederim. Kendisinin yol göstericiliği, anlayışı ve akademik rehberliği yalnızca bu çalışmanın yönünü şekillendirmekle kalmamış, aynı zamanda bilimsel araştırma yapma motivasyonumu da sürekli canlı tutmuştur.

Bu çalışmanın planlanmasından yürütülmesine kadar geçen süreçte her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimiyle beni yönlendiren, bu zorlu süreci kolaylaştıran, her konuda desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Hacı Mehmet Kayılı hocama sonsuz teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini paylaştıkları, desteklerini esirgemedikleri ve tüm yardımları için Dr. Ülkü Güler ve Doç. Dr. Mehmet Atakay hocalarım içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, bilgi ve tecrübeleriyle tez sürecime katkı sağlayan, desteğini ve ilgisini her zaman hissettiren çok sevgili Dr. Dt. Nihan Akdoğan ve Doç. Dr. Burak Derkuş hocalarım içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım, çalışmanın her aşamasında gösterdiğiniz özveri ve samimi destek, bu tezin ortaya çıkmasında temel yapı taşlarından biri olmuştur.

Bu süreçte tanımış olmaktan büyük mutluluk duyduğum, tez sürecimin tümünde yanımda olduğunu hissettiğim, bilgi ve deneyimini esirgemeyen, samimiyeti, desteği ve dostane yaklaşımıyla bu süreci keyifli hale getiren değerli doktor adayı İzzet Avcı'ya teşekkür ederim.

Çalışmamın etik değerlendirme sürecinde yer alan Etik Kurul üyelerine ve bu onayı sağlayan kuruma, araştırmamın bilimsel ve etik standartlara uygun şekilde ilerlemesine katkı sundukları için teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen canım aileme ve sevgili abime en derin teşekkürlerimi sunarım. Varlığınız, bu süreci aşmamda en büyük güç kaynağım oldu.

Ayrıca, destekleri ve katkılarıyla bu çalışmanın tamamlanmasına doğrudan ya da dolaylı olarak yardımcı olan tüm arkadaşlarıma, birlikte çalışmaktan onur duyduğum iş arkadaşları ve yöneticilerime, iş birliği içinde bulunduğum şirketlere, kurum ve kuruluşlara içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periodontal Hastalıklar: Gingivitis ve Periodontitis.....	3
2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar (PTM'ler)	4
2.2.1. Post Translasyonel Modifikasyonların Klinik Önemi.....	5
2.2.2. Protein Glikozilasyonu	6
2.2.2.1. N-Glikanlar.....	7
2.3. Protein G	9
2.4. İmmüoglobulin G (IgG)	10
2.5. Glikomik.....	12
2.5.1 Glikoproteinlerden N-Glikanların Ayrılması	12
2.5.2. N-Glikan Etiketleme	13
2.5.3. N-Glikan Saflaştırma.....	14
2.5.4. IgG İzolasyon Yöntemi	15
2.6. HPLC-HILIC-FLD Kromatografik Analiz Yöntemi	16
2.7. Kütle Spektrometrisi	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	19
3.1. Kullanılan Kimyasallar	19
3.2. Katılımcıların Seçilmesi ve Periodontal Durumlarına Göre Sınıflandırılması	19

3.3. Klinik Periodontal Ölçümlerin Toplanması.....	19
3.3.1. Plak İndeksi (Pİ) (Silness & Loe).....	20
3.3.2. Sondalamada Cep Derinliği (SCD).....	20
3.3.3. Klinik Ataçman Kaybı (KAK).....	20
3.3.4. Sondalamada Kanama İndeksi (SKİ).....	21
3.4. Etik Onay	21
3.5. Örneklerin Toplanması	21
3.5.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması	21
3.5.2. Serum Örneklerinin Toplanması.....	22
3.6. İnsan Serumundan N-Glikanların Salınması	22
3.7. N-Glikanların Etiketlenmesi	23
3.8. N-Glikanların Saflaştırılması.....	23
3.9. İnsan Serumundan IgG İzolasyonu.....	23
3.10. IgG N-Glikanlarının Salınması.....	24
3.11. İzole Edilmiş IgG N-Glikanlarının Etiketlenmesi	24
3.12. IgG N-Glikanlarının Saflaştırılması.....	24
3.13. HPLC-HILIC-FLD ile IgG ve İnsan Serumu Toplam N-Glikanlarının Analizleri	25
3.14. Tükürük Örneklerinden IgG İzolasyonu ve Proteolitik Parçalanmaları	25
3.15. nLC-QTOF-MS/MS Analizleri.....	25
3.16. Veri Analizleri	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Periodontal Hastalıklarda Serum ve Tükürük IgG N-Glikanlarının Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....	28
4.2. Periodontal Hastalıklarda Tükürükten İzole Edilen IgG N-Glikopeptitlerin Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....	34
4.3. Periodontal Hastalıklarda Toplam Serum N-Glikanlarının Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....	38
4.4. Tartışma	44
4.4.1 Yöntemlerin Seçimi	44
4.4.2. Bulguların Karşılaştırılması.....	45
4.4.3. Glikan Yapılarının Tanısal Potansiyeli.....	46
5. YORUM.....	49

6. KAYNAKLAR.....	51
EKLER.....	54
EK 1 - Gingivitis, periodontitis ve sağlıklı grupları arasında serum IgG N- glikanlarının göreceli alan yüzdelerine ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir)	54
EK 2 - Gingivitis, periodontitis ve sağlıklı grupları arasında tükürük IgG N- glikanlarının göreceli alan yüzdelerine ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir)	57
EK 3 - Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında serum N- glikanlarının göreceli alan yüzdelerine ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren N-glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir)	59
EK 4 - Etik Kurul İzin Belgesi	65
EK 5 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	66
ÖZGEÇMİŞ..	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sırasıyla sağlıklı, gingivitis, periodontitis ve ileri periodontitis durumlarının şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. Sırasıyla N-Glikozilasyon ve O-Glikozilasyon kimyasal gösterimi.....	6
Şekil 2.3. N-Glikanların sentezi ve iki Antenli (IV), üç antenli (V,VI) ve dört antenli (VII) N-Glikan yapıları	8
Şekil 2.4. Yüksek mannoz, kompleks ve hibrit N-Glikan yapıları ve şematik gösterimleri	8
Şekil 2.5. IgG molekülünün şematik gösterimi	10
Şekil 2.6. IgG alt sınıflarının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.7. İnsan IgG kristal yapısı ve bağlı glikanlar.....	12
Şekil 2.8. PNGase F enzimatik reaksiyon gösterimi	13
Şekil 2.9. Prokainamid ile etiketlenmeden önce ve sonrasına ait glikan yapısı ve prokainamid floresans değerleri.....	14
Şekil 4.1. Serumdan izole edilen IgG N-glikanlarının HPLC-HILIC-FLD analizi sonucunda elde edilen kromatogramı. Kromatogramda literatürle uyumlu olarak 19 farklı N-glikan piki tespit edilmiştir. Glikan yapıları fukozlanmış, galaktoz içermeyen ve galaktoz içeren glikanlar şeklinde sınıflandırılmıştır	31
Şekil 4.2. Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında H3N4F1, H3N5F1, H5N4 ve H5N4F1 glikanlarına ait serum IgG N-glikanlarının göreceli alan yüzdelerinin kutu grafikleri ve hastalık tanısındaki ayırt ediciliklerini gösteren ROC eğrileri	32
Şekil 4.3. Serum IgG N-glikan profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları	33
Şekil 4.4. nLC-MS/MS analizleri sonucu tükürükten elde edilen IgG N-glikopeptitlerine ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramları.....	35

Şekil 4.5. Tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerine ait istatistiksel olarak anlamlı bulunan N-glikopeptitlerin (IgG1-H3N5F1, IgG1-H4N5F1 ve IgG1-H5N4F1S2) göreceli bolluklarının gingivitis, periodontitis ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırıldığı kutu grafikleri ve IgG1-H4N5F1 glikopeptiti için yapılan ROC analizi.....	36
Şekil 4.6. Tükürük IgG N-glikopeptit profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları	38
Şekil 4.7. Serum örneklerinden izole edilen toplam N-glikanların HPLC-HILIC-FLD analizi sonucunda elde edilen kromatogramı. Kromatogramda toplam 29 farklı N-glikan piki belirlenmiş ve her bir glikanın yeri işaretlenmiştir	39
Şekil 4.8. Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında göreceli alan yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren serum N-glikanlarına (G6, G7, G8, G10, G11, G12, G14, G17, G20 ve G26) ait kutu grafikleri.....	41
Şekil 4.9. G20 ve G12 glikanlarının periodontal hastalıkların tanısındaki ayırt edicilik performanslarını gösteren ROC eğrileri	42
Şekil 4.10. Serum N-glikan profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında gerçekleştirilen temel bileşen analizi (PCA) sonuçları	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Monosakkaritlerin adları, kısaltmaları, kimyasal yapıları ve renk ve şekil gösterimleri.....	6
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen periodontitis, gingivitis ve sağlıklı gruplara ait demografik ve klinik periodontal parametrelerin dağılımı. Ortalama yaş, cinsiyet oranları, plak indeksi (PI), sondalamada kanama yüzdesi (BOP%), cep derinliği (CD), diş eti çekilmesi (DÇ), klinik ataçman kaybı (AL) ve ortalama diş sayıları gruplar arasında karşılaştırılmıştır	27
Çizelge 4.2. Potansiyel biyobelirteçler ve AUC değerleri ile hastalığa ait tanısal performansları	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

m	Kütle
z	Yük Sayısı
v	Hacim
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ	Mikro
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
λ_{ex}	Uyarılma Dalga Boyu
λ_{em}	Emisyon Dalga Boyu
eV	Elektron Volt
Hz	Hertz

Kısaltmalar

ABC	Amonyum Bikarbonat
ACN	Asetonitril
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FA	Formik Asit
TFA	Trifloro Asetik Asit
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi

DHB	2,5-Dihidroksi Benzoik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	1,4-Dithiothreitol
ER	Endoplazmik Retikulum
IgG	İmmunoglobulin G
Fuc	Fukoz
Gal	Galaktoz
NeuAc	N-Asetil Nöromanik Asit, Siyalik Asit
GalNAc	N-Asetil Galaktoz Amin
Glc	Glikoz
GlcNAc	N-Asetil Glikoz Amin
Hex	Heksoz
HexNAc	N-Asetil Heksoz Amin
ESI	Elektrosprey İyonlaştırma
CID	Çarpışma İle İndüklenmiş Ayrıştırma
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
HILIC-FLD	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi Floresans Detektör
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
MALDI	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma
RPM	Dakikada Devir Sayısı
PNGase F	N-Glikozidaz F
QTOF	Dört Kutuplu Uçuş Zamanlı
SPE	Katı Faz Ekstraksiyon

1. GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, ağız ve diş sağlığını tehdit eden, bireylerin yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve dünya çapında yaygın olarak görülen inflamatuvar rahatsızlıklar arasında yer alır. Gingivitis, periodontal hastalıkların erken ve geri dönüşümlü bir evresi olarak kabul edilir ve plak birikimi sonucunda diş eti dokusunun inflamasyonu ile karakterizedir [1]. Ağız hijyenine dikkat edilmemesi gibi davranışsal faktörler hastalık riskini artırmaktadır [2]. Gingivitis tedavi edilmediği durumlarda, diş eti ve çevresindeki destek dokuların kaybına yol açan daha ileri bir durum olan periodontitise ilerleyebilir [3,4].

Periodontitis, diş eti çekilmesine ve diş kaybına yol açabilen kronik bir durumdur. Ancak gingivitis, bu ilerleyici süreçte erken bir basamak olduğundan, tedaviye erken aşamada başlanması hastalığın kontrol altına alınmasında önemlidir [5]. Gingivitis, uygun bir şekilde tedavi edilmediğinde ilerleyerek periodontitis gibi daha ciddi periodontal hastalıklara dönüşebilir [4].

Diş eti iltihabının daha yıkıcı periodontitis formlarına ilerlemesini önlemek için erken teşhis ve tedavinin kritik bir önemi vardır. Periodontal hastalıkların teşhisinde proteomik ve glikomik teknolojiler önemli ilerlemeler sağlamıştır. N-glikan profilleri, gingivitis ve periodontitis gibi hastalıkların biyobelirteçlerini tanımlamada kilit rol oynamaktadır [6]. Glikozilasyonun bağışıklık sistemi ve inflamasyon süreçlerindeki rolü, periodontal hastalıkların anlaşılmasında yeni bir bakış açısı sunmaktadır. İmmüoglobulin G'nin tükürük ve plazmadan elde edilen glikan profillerini karşılaştırarak, bu biyomoleküllerin periodontal hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilceğini göstermiştir [7].

Glikomik yaklaşımlar, bağışıklık sistemi yanıtlarının anlaşılmasında yeni ufuklar açmıştır. HPLC-HILIC-FLD yöntemi kullanılarak immüoglobulinlerden elde edilen N-glikan profillerini detaylı bir şekilde analiz edilmiş ve bu moleküllerin hastalık teşhisinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilceğini ortaya konulmuştur [8]. Benzer şekilde, insan tükürük glikoproteinlerinin yaş ve cinsiyete bağlı glikan modelleri

incelenerek bu moleküllerin antiviral savunmada ve inflamasyon süreçlerinde rol oynadığını tespit edilmiştir [9]. Serum ve tükürük immüoglobulinlerinin N-glikozilasyon değişikliklerinin oral mukozit gibi hastalıkların biyobelirteci olabileceği ortaya konmuştur [10].

HPLC-HILIC-FLD analitik tekniklerinin glikan profillemesinde kullanımı, biyobelirteçlerin hassas ve spesifik bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisi kullanarak glikoproteinlerden elde edilen N-glikan profillerinin detaylı analizini sağlamış ve bu yöntemin biyolojik örneklerin derinlemesine karakterizasyonu için uygun olduğu ortaya koyulmuştur [8].

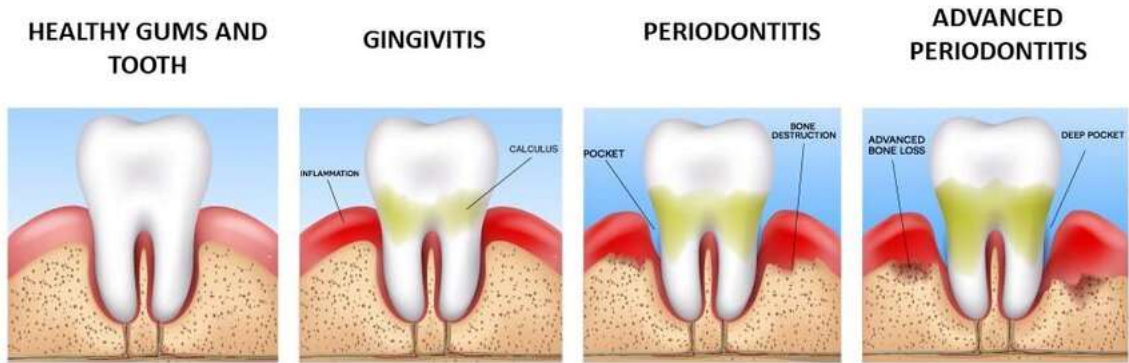
Bu çalışmanın amacı, gingivitis ve periodontitis hastalarının serum ve tükürük örneklerinden elde edilen serum toplam N-glikan ve serum IgG'ye ait N-glikan ve tükürük N-glikopeptit profillerini analiz etmek ve bu verileri sınıflandırmaktır. HPLC-HILIC-FLD ve nLC-QTOF-MS/MS yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar, periodontal hastalıkların erken teşhisinde yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu bağlamda, periodontal inflamasyonun moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına yönelik bilgi birikimi artırılarak, bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar: Gingivitis ve Periodontitis

Gingivitis, diş eti hastalıkları arasında en sık rastlanan ve genellikle tedavi edilebilir bir inflamatuvar hastalıktır. Bu hastalık, diş etlerinde kızarıklık, şişme ve kanama gibi belirtilerle kendini gösterir ve genellikle plak birikimi nedeniyle oluşur [1]. Plak, diş yüzeyinde biriken bakteri ve yiyecek artıklarıdır ve düzenli diş temizliği yapılmadığında diş eti dokusunu tahriş ederek iltihaplanmaya yol açabilir [2].

Gingivitis, uygun bir şekilde tedavi edilmediğinde ilerleyerek periodontitis gibi daha ciddi periodontal hastalıklara dönüşebilir, diş kaymalarına ve diş kaybına kadar ilerleyebilir [1,2,11]. Periodontitis, diş kaybına yol açabilen kronik bir durumdur. Ancak gingivitis, bu ilerleyici süreçte erken bir basamak olduğundan, tedaviye erken aşamada başlanması hastalığın kontrol altına alınmasında önemlidir [5,12]. Şekil 2.1’de sağlıklı, gingivitis ve periodontitis durumlarına ait şematik gösterim verilmiştir.



Şekil 2.1. Sırasıyla sağlıklı, gingivitis, periodontitis ve ileri periodontitis durumlarının şematik gösterimi [15].

Gingivitis genellikle sistemik sağlık sorunlarıyla da ilişkilendirilmektedir. Örneğin, bireyin bağışıklık sistemi zayıfsa veya diyabet gibi sistemik hastalıkları varsa gingivitisin görülme riski artabilir [2,13]. Ayrıca, sosyal ve davranışsal faktörlerin de bu hastalığın yaygınlığını etkilediği bilinmektedir. Sigara ve tütün ürünlerinin kullanımı, obezite,

genetik faktörler, stres, yetersiz ağız hijyeni ve düzensiz diş hekimi kontrolleri gingivitisin daha sık görülmesine yol açmaktadır [2,14].

Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar, gingivitisin altında yatan biyokimyasal süreçleri anlamada önemli ilerlemeler sağlamıştır. Özellikle proteomik çalışmalar, gingivitis sırasında salyada bulunan proteinler ve peptitler ile hastalık ilişkisini daha ayrıntılı bir şekilde incelemiştir [11]. Bu tür analizler, gingivitisin teşhisinde ve tedavisinde biyobelirteçlerin rolünü araştırmak açasından umut vadetmektedir. Tükürük örnekleri ile proteomik ve glikomik analizler sayesinde periodontal hastalıklarda ayırt edici biyokimyasal profiller tespit edilmiştir [6].

N-glikan profillemeye gibi ileri analitik teknikler de gingivitisin biyolojik temelini anlamada kullanılmaktadır. Özellikle immünoglobulinlerin glikozilasyon yapılarındaki değişikliklerin hastalığın tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılabilereceği öne sürülmüştür [8,10]. Tükürük glikoproteinlerin bu bağlamda detaylı analizi, gingivitisin teşhisinde daha hassas ve spesifik yöntemlerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır [7].

Sonuç olarak, gingivitis, hem klinik belirtileri hem de biyokimyasal süreçleriyle dikkat çeken önemli bir diş eti hastalığıdır. Tedavi edilmeyen gingivitisin daha ciddi periodontal hastalıklara dönüşme riski, bu hastalığın erken tanı ve tedavisinin önemini artırmaktadır. Güncel glikomik, proteomik ve glikoproteomik araştırmalar, gingivitisin biyolojik mekanizmalarını anlamada ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirmede kritik bir rol oynamaktadır.

2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar (PTM'ler)

Post translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler), proteinler, lipitler, nükleik asitler gibi biyomoleküllerin biyolojik işlevlerini ve özelliklerini çeşitlendiren önemli biyokimyasal değişikliklerdir. Proteinler, translasyon sonrasında çeşitli kimyasal modifikasyonlarla işlenerek stabilite, hücresel lokasyon ve işlevsellik gibi özgün yapısal ve fonksiyonel özellikler kazanırlar. Böylelikle hücre içi ve hücreler arası süreçlerin kontrol edilmesini

sağlar. Bu modifikasyonlar, karmaşık biyolojik sistemlerin hassas bir şekilde düzenlenmesi için hayati öneme sahiptir [16].

En yaygın PTM türleri arasında glikozilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon yer alır [16]. Glikozilasyon, biyomolekül yapısına karbonhidrat (şeker) zincirlerinin eklenmesini ifade eder. Protein glikozilasyonu, protein katlanması, stabilitesi ve hücre sinyalleşmesi üzerinde önemli bir rol oynar [9]. N-glikanların sentezi gibi spesifik glikozilasyon süreçleri, proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını etkileyen temel mekanizmalardan biridir [17].

2.2.1. Post Translasyonel Modifikasyonların Klinik Önemi

PTM'ler, enfeksiyonlar ve inflamatuvar hastalıklar dahil birçok sağlık durumunda önemli biyobelirteçler olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle N-glikanların profilleri, enfeksiyon hastalıklarına karşı bağışıklık tepkisinin modülasyonu ve hastalık progresyonunun değerlendirilmesi için kritik öneme sahiptir [6,9]. Bu nedenle, PTM'lerin yapısal ve fonksiyonel analizleri, klinik uygulamalar açısından geniş bir araştırma alanı sunmaktadır.

PTM'lerin incelenmesi, birçok hastalık mekanizmasının anlaşılmasında ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik bir öneme sahiptir. Örneğin, hatalı glikozilasyon süreçleri, kanser, diyabet ve bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Glikozilasyon bozukluklarının diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarla bağlantılı olduğu belirtilmiştir [18]. Ayrıca, glikanların kanser biyolojisi ve tedavisi üzerindeki etkisi derinlemesine incelenmiştir. [19]. Glikanların kanser ve inflamasyondaki rolü detaylandırılarak bu süreçlerin terapötik hedef olarak potansiyeli vurgulanmıştır [20].

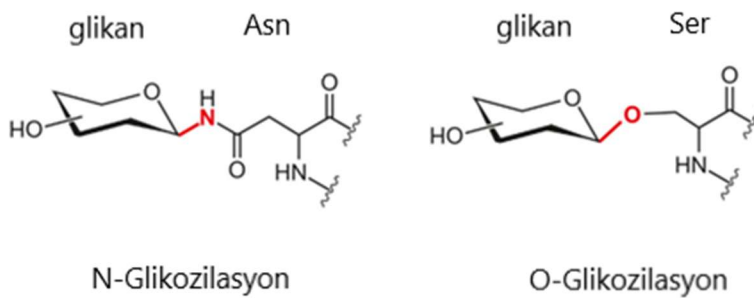
Bu bağlamda, glikozilasyonun ve diğer PTM mekanizmalarının detaylı incelenmesi, hem hücresel işleyişin temelini açıklamakta hem de biyoteknolojik uygulamalarda yenilikçi çözümler geliştirmek için önemli fırsatlar sunmaktadır.

2.2.2. Protein Glikozilasyonu

Glikozilasyon, proteinlerde yaygın olarak görülen ve enzimatik bir süreç ile protein biyomoleküllerine şeker moleküllerinin eklenmesiyle gerçekleşen ve proteinlerin stabilitesini, katlanmasını ve hücresel işlevlerini etkileyen önemli bir PTM türüdür [9], [17]. Şeker (karbonhidrat) grupları bağlı bu biyomolekül yapılar glikoprotein olarak adlandırılmaktadır. Şeker gruplarının farklı şekillerde birleşerek oluşturdukları yapılar ise glikan olarak adlandırılır.

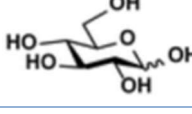

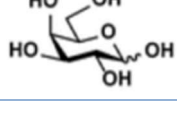

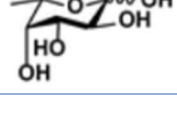

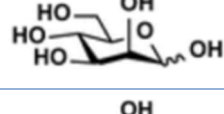

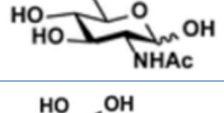

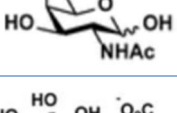

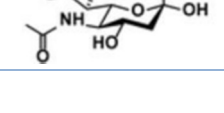

Glikozilasyon sürecinde şeker yapılarının glikoproteinlere transferi endoplazmik retikulum (ER) veya ER membranında başlar ve glikoziltransferaz (GT), glikozidaz ve nükleotid şeker taşıyıcıları ve diğer enzimler ile birlikte golgi aygıtında tamamlanır [17]. Bu süreçte dolikol pirofosfat aracılığıyla glikan prekürsörleri oluşturulur ve proteinlere transfer edilir. Bu mekanizma, proteinin biyolojik işlevselliğini artıran üç boyutlu yapının stabilize edilmesini sağlar [17,21].

Şekil 2.2’de N-Glikozilasyon ve O-Glikozilasyona ait kimyasal yapı gösterimi verilmiştir. Protein glikozilasyonu şeker gruplarının protein sekansına bağlanma farklılıklarına göre N-Glikozilasyon ve O-Glikozilasyon olarak ayrılır. N-glikanlar proteinlerin Asn-X(Prolin hariç)-Ser/Thr (Nadiren Sistein) sekansındaki amit azotuna GlcNAc içeren yapı bağlanır. O-glikanlarda ise durum şeker yapısının Ser/Thr yapısındaki hidroksil gruplarına eklenmesiyle oluşmaktadır. Proteoglikanlar ise çok kez glikozilasyona uğramış, doğrusal zincirli, yüksek oranda sülfat içerebilen ve farklı biyosentetik yollarla üretilen yapılardır [17,18].



Şekil 2.2. Sırasıyla N-Glikozilasyon ve O-Glikozilasyon kimyasal gösterimi [22].

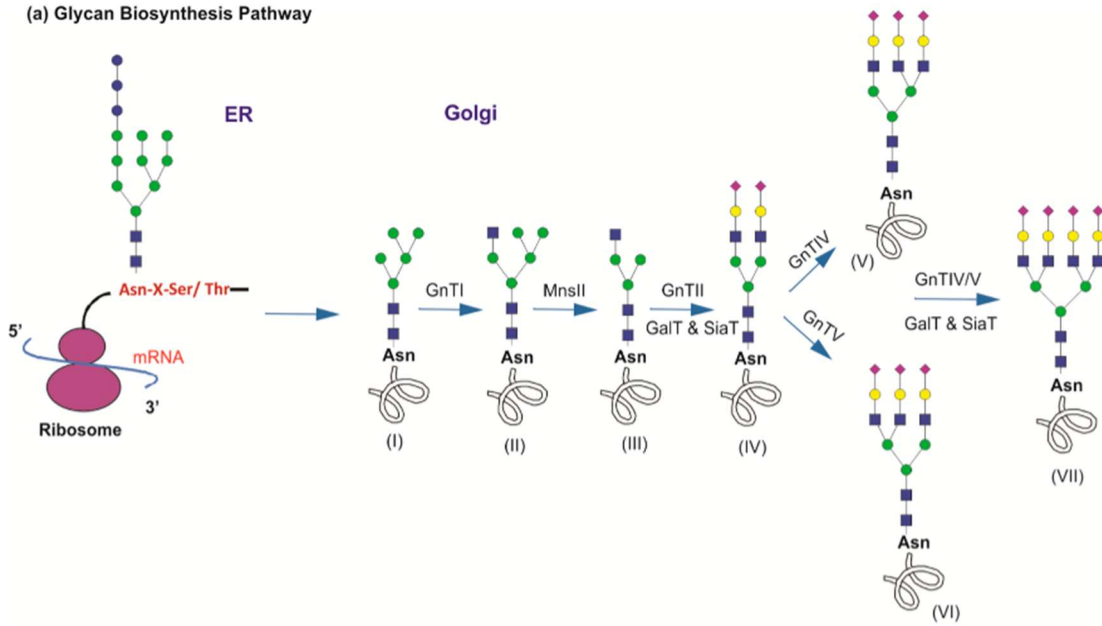
Çizelge 2.1. Monosakkaritlerin adları, kısaltmaları, kimyasal yapıları ve renk ve şekil gösterimleri.

Monosakkarit Adı	Kısaltılmış Adı	Kimyasal Yapısı	Renk ve Şekil Gösterimi
Glikoz	Glc		
Galaktoz	Gal		
Fukoz	Fuc		
Mannoz	Man		
N-Asetil Glikozamin	GlcNAc		
N-Asetil Galaktozamin	GalNAc		
N-Asetil Nöraminik Asit (Sialik Asit)	NeuAc		

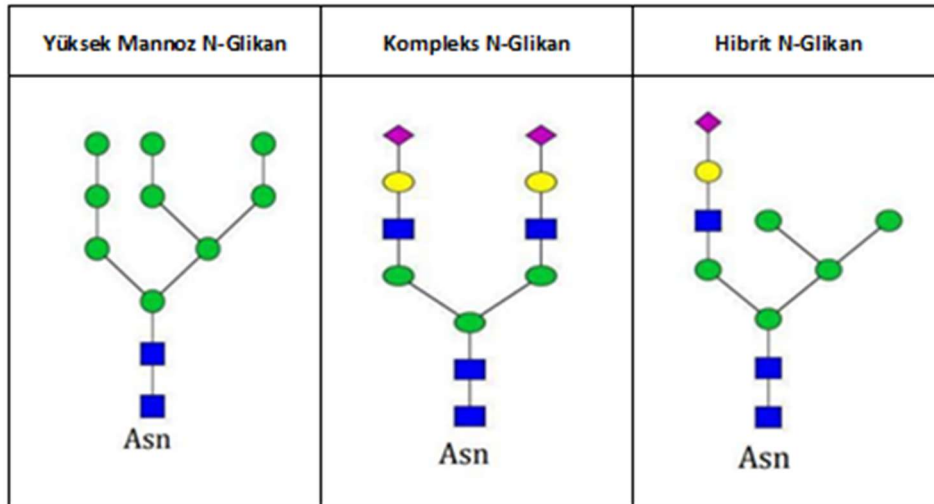
2.2.2.1. N-Glikanlar

Karbonhidratlar proteinlerin Asn-X(Prolin hariç)-Ser/Thr (Nadiren Sistein) sekansındaki amit azotuna N-asetil glikozamin içeren yapı bağlanarak N-glikanları oluştururlar. Genellikle 8 veya 9 mannoz (man) monosakkariti içeren cis-golgi bölümündeki glikoproteinlere bağlı N-glikan yapıları yüksek mannoz tipindedir. Golgi içerisindeki enzimler tarafından başlangıçta cis golgi bölümünde olmak üzere mannoz monosakkarit birimleri kaldırılır ve spesifik bir enzim olan N-Asetil Glukozaminyltransferazlar ile N-Asetil Glukozamin transferi, komplek ve hibrit N-glikan yapılarının sentezi başlar. Hibrit N-glikanlarda beş Mannoiz monosakkarit birimi tutulur ve diğer monosakkarit birimleri eklenir. Kompleks bir yapı oluşturmak için hibrit yapı üzerinde bulunan beş Mannoiz

monosakkarit biriminin terminal uçlarındaki iki tanesi uzaklaştırılır ve ikinci bir N-asetil Glukozamin edinerek kompleks ve iki antenli N-glikan yapılarının sentezi başlar. Altı kata kadar veya daha fazla dallanabilen ve farklı monosakkarit birimlerini içerebilen yapılar oluşur [17,23]. Şekil 2.3’de N-glikanların sentezine ait şematik gösterimi ve Şekil 2.4’de N-glikan yapılarının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. N-Glikanların sentezi ve iki antenli (IV), üç antenli (V,VI) ve dört antenli (VII) N-Glikan yapıları [23].



Şekil 2.4. Yüksek mannoz, kompleks ve hibrit N-Glikan yapıları ve şematik gösterimleri.

N-glikanlar, proteinlerin immün yanıt, hücre adezyonu ve patojen tanıma gibi süreçlerde kritik roller oynamasını sağlar [7]. Hücre yüzeyinde yer alan glikanlar, patojen tanıma ve hücre-hücre etkileşimlerinde kritik bir rol oynar [18]. Örneğin, bazı viral enfeksiyonlarda glikanlar, virüslerin konak hücre yüzeyine bağlanma süreçlerini kolaylaştırabilir veya engelleyebilir. Bu süreç özellikle HIV giriş mekanizmalarında belirleyicidir [24]. Ayrıca, glikozilasyonun düzensizlikleri kanser ve nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok patolojik durumun temelinde yer alır. Kanser hücrelerinde gözlenen anormal glikozilasyon profilleri, bu hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırabilir ve metastatik özelliklerini artırabilir [2,19].

Tükürükte ve plazmada bulunan immüoglobulinlerin (IgA ve IgG) N-glikan profilleri, potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir ve bu profiller, bireyin yaşına, cinsiyetine ve sağlık durumuna göre değişiklik gösterebilir [7]. Örneğin, tükürük gibi biyolojik sıvılarda yer alan N-glikoproteinlerin profilleri, periodontitis gibi hastalık durumlarında önemli değişiklikler gösterebilir. Örneğin, periodontitis hastalarında spesifik N-glikopeptitlerin seviyelerindeki değişiklikler, hastalığın biyolojik mekanizmalarına dair önemli bilgiler sunabilir [6].

2.3. Protein G

Protein G, Streptokok grubu bakteriler tarafından üretilen ve immüoglobulin G'ye (IgG) yüksek bağlanma afinitesi gösteren bir yüzey proteinidir. Bu protein, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilir ve bağlanma özelliği nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Protein G, bağışıklık sistemi proteini olarak post-translasyonel modifikasyonların (PTM) işlevselliğini anlamada model olarak kullanılan bir proteindir. Protein G'nin antikorlarla bağlanma mekanizmaları, özellikle glikolizasyon gibi PTM'lerin işlevsel etkilerini incelemek için değerli bir araçtır. IgG'nin farklı türlerine yüksek afinitesi, Protein G'yi immünojenik analizler ve saflaştırma işlemleri için önemli bir bileşik haline getirir [25].

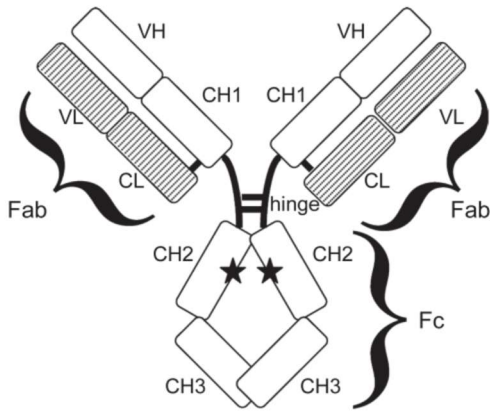
Protein G'nin immüoglobulinlerle etkileşimleri, hem temel bilimlerde hem de tıbbi araştırmalarda kullanılmaktadır. İmmüoglobulinlerin glikozilasyon profillerinin belirlenmesinde protein G önemli bir rol üstlenmektedir [6]. Ayrıca, bu protein immüoglobulinlerin biyobelirteç potansiyelini araştırmak için de kullanılmıştır [7].

Protein G, immüoglobulinlerle güçlü bağlanma özellikleri sayesinde hem bakterilerin patogenezi mekanizmalarının anlaşılmasında hem de biyoteknolojik uygulamalarda kritik bir araç olarak ön plana çıkmaktadır.

2.4. İmmüoglobulin G (IgG)

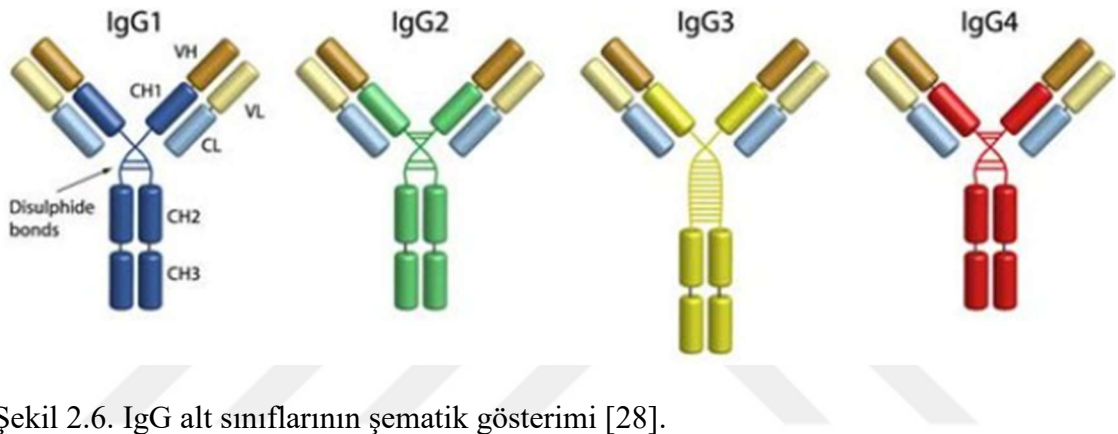
İmmüoglobulin G (IgG), insan bağışıklık sisteminin en bol bulunan antikor sınıfıdır ve toplam serum immüoglobulinlerinin yaklaşık %75-80'ini oluşturur [26]. Bu molekül, adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olarak, patojenlere karşı spesifik bir savunma mekanizması sunar.

Şekil 2.5'de IgG molekülüne ait şematik gösterim yer almaktadır. IgG, iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşan Y şeklinde bir glikoproteindir. Molekülün Fab bölgeleri antijenlere bağlanmayı sağlarken, Fc bölgesi efektör işlevlere aracılık eder. Bu yapı, IgG'nin opsonizasyon, nötralizasyon ve kompleman aktivasyonu gibi biyolojik işlevlerini mümkün kılar [7,26]. IgG'nin Fc bölgesindeki glikozilasyon, fonksiyonlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Örneğin, IgG üzerindeki glikan yapılarının antikorun etkililiği ve bağışıklık sistemine katkısı üzerinde büyük bir rol üstlenmektedir [9].

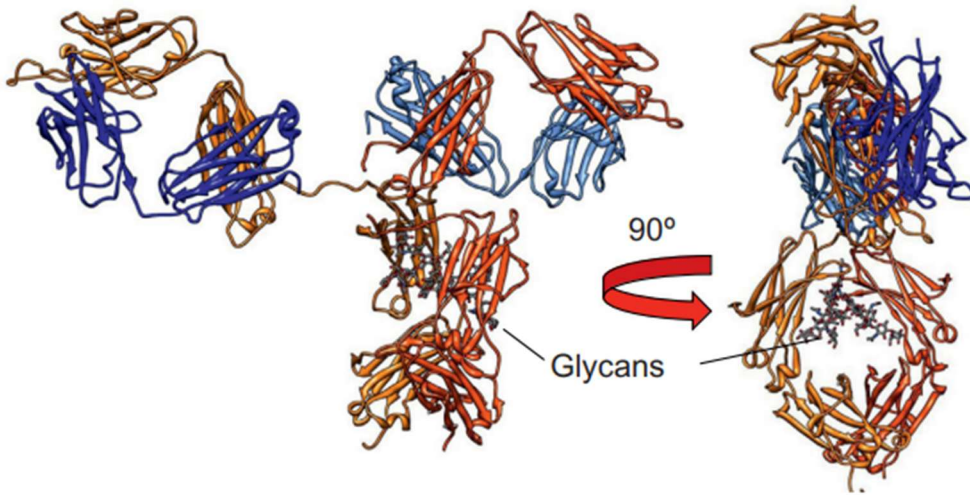


Şekil 2.5. IgG molekülünün şematik gösterimi [27].

Şekil 2.6’da şematik olarak gösterildiği üzere insan IgG molekülü IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olarak dört alt sınıfa ayrılır. Bu sınıflandırma IgG ağır zincirindeki sabit bölgelerin yapısal, işlevsel ve antijenik farklılıklarına dayanarak sağlıklı bir insan serumunda bulunma oranına göre sıralanmış ve numaralandırılmıştır [26]. Bu alt sınıflar, farklı antijenlere karşı bağışıklık yanıtlarında ve patojenlere karşı savunmada çeşitli roller üstlenir [7]. IgG, patojenlere karşı savunmada hayati bir rol oynayan çok yönlü bir antikordur.



Klinik ve biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra, glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarının incelenmesi, bağışıklık sisteminin daha iyi anlaşılmasına ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlar. İmmüoglobülin glikoproteinlerinin Fc bölgesindeki glikan yapılarının antikor fonksiyonu üzerinde etkiye sahip olduğu bilinmektedir. IgG molekülünün normal olmayan bir şekilde glikozilasyonu zararlı etkiler de verebilmektedir. Sialik asit ve galaktoz açısından yoksun olan IgG glikoproteinlerinin normal seviyeden yüksek olması romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ilişkili olabilir [26]. IgG'nin glikozilasyon profillerinin çeşitli hastalık durumlarında değişiklik gösterebileceği ve potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bilinmektedir [7]. Yapılan çalışmalarda periodontitis gibi durumlarda IgG'nin glikozilasyon paternlerinde belirgin değişiklikler olduğunu görülmüştür [6]. Şekil 2.7’de insan IgG kristal yapısı ve Fc bölgesine bağlı N-glikanlar gösterilmiştir.



Şekil 2.7. İnsan IgG kristal yapısı ve bağlı glikanlar [29].

2.5. Glikomik

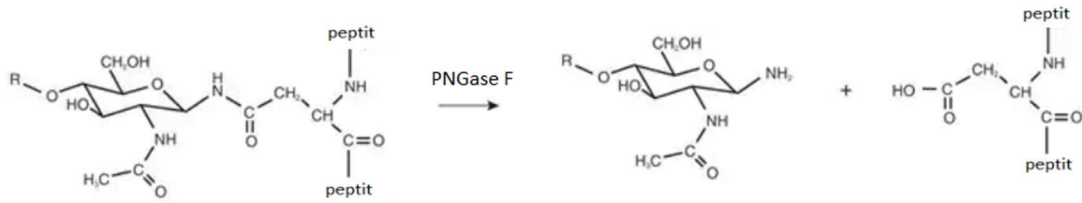
Glikomik, glikozilasyona uğramış biyomoleküllerin glikan yapılarını tanımlamak, kapsamlı analizini yapmak ve biyolojik süreçteki rollerini anlamak için kullanılan bir disiplin olarak tanımlanabilir. Glikanların, proteinlerin biyolojik aktivitelerinde büyük rol oynadığı bilinmektedir [8]. Bu alandaki gelişmeler, hücre biyolojisi, hastalık mekanizmaları ve terapötik uygulamalar için yeni kapılar aralamaktadır [30]. Glikan profillerindeki değişiklikler, çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Anormal glikozilasyon, çeşitli hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca, glikomik teknolojiler ilaç tasarımında yeni hedefler sunmaktadır [31,32]. Glikomikler, biyolojik ve klinik bilimlerde giderek önem kazanan bir alan olarak, hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için güçlü bir araçtır. Gelecekte, glikomik teknolojilerin daha fazla erişilebilir hale gelmesiyle birlikte, bu alandaki keşiflerin insan sağlığına katkıları artacaktır [30,33].

2.5.1. Glikoproteinlerden N-Glikanların Ayrılması

Glikoproteinlerden N-glikanların ayrılması, glikomik ve glikoproteomik analizlerin temel adımlarından biridir. Bu süreç, glikan yapılarının detaylı analizine olanak sağlar ve biyolojik sistemlerdeki işlevlerini anlamak için kritik öneme sahiptir. N-glikanların

ayrılması, özellikle biyobelirteçlerin keşfi ve terapötik glikoproteinlerin kalite kontrolünde yaygın olarak kullanılır [8].

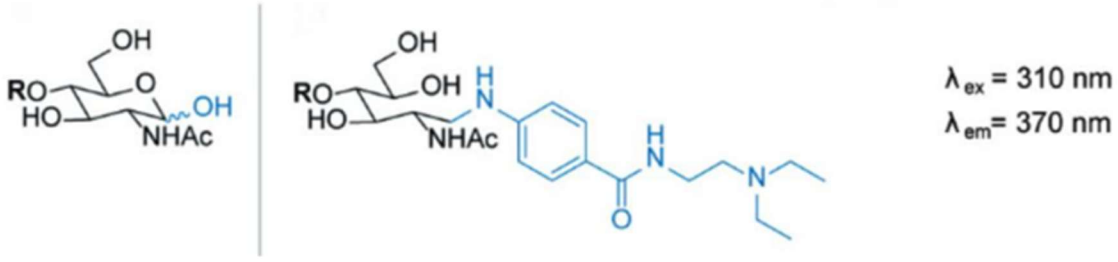
Endoglikozidaz ve glikozidaz gibi spesifik enzimler N-glikanların glikoprotein biyomoleküllerinden ayrılması için kullanılır. Endoglikozidazlardan biri olarak PNGase F glikanların glikoproteinden ayrılması için çoğunlukla tercih edilen bir enzimdir. Şekil 2.8’de PNGase F enzimine ait enzimatik reaksiyon gösterimi bulunmaktadır. PNGase F, glikoproteinlerin asparajin yan zincirine bağlı N-glikanları hidroliz ederek serbestleştirir. Glikoproteinlerden bilinen neredeyse tüm N-glikanları serbest bırakır. Tetra ve pentaanten zincirleri serbest bırakan tek enzimdir. Bu enzimatik reaksiyon, genellikle hafif bazik pH (7.5-8.5) ve 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilir. Numunenin denatüre edilmesi, enzimin etkinliğini artırabilir. Bu nedenle SDS gibi denatüre edici kimyasallar kullanılabilir [34].



Şekil 2.8. PNGase F enzimatik reaksiyon gösterimi.

2.5.2. N-Glikan Etiketleme

N-glikanların floresan özelliğe sahip etiketlerle işaretlenmesi, kromatografik ve MS analizlerinde sinyal yoğunluğunu artırır. Prokainamid veya 2-aminobenzamid (2-AB) gibi etiketler N-glikanların etiketlenmesinde yaygın olarak kullanılır [8]. N-glikanların serbest indirgen uçlarında yer alan aldehit grupları, prokainamid gibi amin içeren ajanlarla Schiff bazı (imin) oluşturacak şekilde kondenzasyon reaksiyonuna girer. Bu Schiff bazı, yapıya floresan özellik kazandırır. Ancak bu yapı, imin formu ile açık form arasında bir denge halindedir ve kararsızdır. Bu nedenle, reaksiyonu takiben pikolinboran (PB) gibi bir indirgen ajan kullanılarak bu geçici imin yapısı indirgenir, böylece kararlı, floresan etiketli bir türev elde edilmiş olur. Şekil 2.9’da N-glikan yapısının etiketlenmeden önce ve sonraki durumu gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Prokainamid ile etiketlenmeden önce ve sonrasına ait glikan yapısı ve prokainamid floransans değerleri.

2.5.3. N-Glikan Saflaştırma

N-glikanların 96-kuyucuklu plak sistemleriyle saflaştırılması, yüksek verimli ve standartlaştırılmış bir süreç sağlayarak glikomik ve glikoproteomik analizlerinin önemli bir adımını oluşturmaktadır. Bu yöntem ile özellikle geniş örnek gruplarında tekrar edilebilirliğin artırılması ve işlemlerin otomasyona uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır [8]. Enzimatik yöntemler kullanılarak ayrılan N-glikanların, kalan protein ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması için saflaştırma adımları uygulanır [33]. 96-kuyucuklu plakalarda kullanılan bağlama reçineleri, N-glikanların polar özelliklerine dayalı olarak seçici bir şekilde bağlanmasını sağlar. Bu aşamada numuneler bir tampon içerisinde hazırlanarak plakanın kuyucuklarına yüklenir. Glikanların reçineye bağlanması için uygun pH ve iyonik kuvvet koşulları sağlanır. 96-kuyucuklu plakanın kuyucukları, safsızlıkları uzaklaştırmak için çeşitli tampon çözeltiler ile yıkanır ve bağlanmayan bileşenler uzaklaştırılır. Glikanların polar yapısı sayesinde N-glikan yapıları çözeltiden ayrışmadan reçinelerde tutulur. N-glikanlar, genellikle yüksek tuz konsantrasyonuna sahip veya uygun pH değerine sahip tamponlar kullanılarak elüsyona işleme alınır. Elüsyon tampon çözeltileri ile birlikte polarite ve iyonik kuvvetlerin sayesinde glikanlar serbest bırakılır. Böylece hedeflenen N-glikanlar, kuyucuklardan toplanarak analiz için hazır hale getirilmiş olur.

Birden fazla numunenin eş zamanlı olarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmesi olarak tanır ve deney sürelerini kısaltır. Sabit kuyucuk boyutları ve reçine kapasiteleri sayesinde tutarlı sonuçlar elde edilmesini sağlar. 96-kuyucuklu plaka sistemleri, N-glikanların saflaştırılmasında yüksek verimli ve standart bir yöntem sunarak glikomik ve

glikoproteomik çalışmaların temelini oluşturur. Bu yöntem, klinik araştırmalar ve endüstriyel süreçlerde glikan analizi için güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini sağlar.

2.5.4. IgG İzolasyon Yöntemi

IgG izolasyonu, genellikle plazma veya serum örneklerinden gerçekleştirilir. İzolasyon yöntemleri, yüksek saflık ve aktiviteyi koruma prensibiyle tasarlanmıştır. Protein A ve Protein G, IgG İmmünoglobülinlerinin Fc bölgesine bağlanma özelliğine sahiptir. Protein A, özellikle insan IgG1, IgG2 ve IgG4 izotipleriyle yüksek afinite gösterirken, Protein G, daha geniş bir IgG yelpazesine uyumludur. Protein G reçineleri kullanılarak örnek içerisindeki IgG biyomolekülleri seçici olarak bağlanır ve saflaştırılır [26].

Protein G reçineleri 96-kuyucukla plakaya veya mikrosantrifüj tüplerine eklenir. Protein G reçinesi, bağlama tamponu ile önceden dengeye getirilir. Bağlama tamponu biyolojik pH, protein yapıları için fizyolojik uyumluluk ve sodyum ve potasyum iyonları ile protein-ligand veya antikor-antijen bağlanmasında iyonik kuvvetlerin dengelenmesini sağlamaktadır. Böylelikle glikoproteinlerin doğal yapısının korunması ve yüksek bağlanma verimliliği amaçlanmaktadır. Uygun ortam oluşturulduktan sonra serum veya plazma örneği plaka kuyucuklarına veya mikrosantrifüj tüplerine eklenir. Örnekler, belirli bir süre (30-90 dk) yavaş bir şekilde karıştırılarak inkübasyon işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem sayesinde IgG'nin reçineye bağlanmasını sağlanır. Daha sonra düşük tuz içeriğine sahip spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak amacıyla yıkama tamponu kuyucuklara eklenerek numune artıkları santrifüj, vakum veya manyetik bir sistemle uzaklaştırılır. Yıkama işlemi genellikle 2-5 kez tekrarlanır. Sonrasında elektrostatik ve hidrojen bağları gibi etkileşimlerin zayıflatılması ve kırılması amacıyla düşük pH değerine sahip (2.5-3.5) elüsyon tamponu eklenir ve bağlanan IgG kuyucuklardan çözündürülür. Elüsyon sırasında IgG'nin stabilitesini korumak için hemen nötralizasyon tamponu eklenir. Saflaştırılmış IgG, ayrı bir toplama plakasına veya mikrosantrifüj tüplerine aktarılır ve analizler için hazır hale getirilir.

2.6. HPLC-HILIC-FLD Kromatografik Analiz Yöntemi

HPLC (Yüksek Performanslı/Basınçlı Sıvı Kromatografisi) sıvı şekilde enjekte edilen örneğin pompalar yardımıyla bir ayırıcı kolona gönderilmesi, kimyasal bileşenlerin kolonda ayrılmasıyla birlikte dedektör tarafından sinyal değişikliğine bağlı olarak algılanması ve buna bağlı olarak bir kromatogram oluşturması tekniğine dayanan sıvı kromatografik bir yöntemdir. HPLC-HILIC-FLD polar ve hidrofilik moleküllerin analizinde, glikanların yapı ve miktar tayininde yaygın olarak kullanılan yüksek hassasiyetli bir tekniktir. Bu yöntem ile polar bileşiklerin ayrımında yüksek performans gözlenirken, floresan bir molekül ile etiketleme sayesinde düşük konsantrasyonlardaki glikanların tespit edilmesini mümkün kılar [8].

HILIC, polar moleküllerin hidrofilik kolonlarla etkileşime girerek ayrılmasını sağlar. Bu sistem, glikanların polar yapısını detaylı bir şekilde ayırmada kritik bir rol oynar [32].

HILIC kolonlar (sabit faz) genellikle silika bazlı, amid veya amino gruplar ile modifiye edilmiş nötr, yüklü veya zwitteriyon bir iç yüzeye sahiplerdir. HILIC mekanizması, sabit faz ile hareketli sulu fazın organik bileşeni arasında moleküler arası etkileşimlere (hidrojen bağı, dipol-dipol, van der Waals, iyonik ve elektrostatik etkileşimler) dayanan karmaşık bir kombinasyona dayanır. Kolon modifikasyonlarına bağlı olarak etkileşim mekanizmaları değişmektedir.

HILIC bağı sistemlerde tipik mobil (hareketli) fazlar, asetonitril başta olmak üzere organik değiştiricileri olan sulu çözeltilerdir. Sulu mobil (hareketli) fazın içerdiği su ile sabit faz birleşerek sabit fazın analite karşı olan afinitesini artar. HILIC kolonlarda, sulu fazın yüzdesi artırılarak analitlerin ayrımı sağlanırken, organik fazın yüzdesindeki artış ile analitlerin kolonda tutunmaları artar. Amonyum format ve asetat gibi tampon çözeltiler, organik çözücü sistemlerinde kolayca çözünebilir ve dengelenmemiş elektrostatik kuvvetlerin kontrolü, iyonlaşma optimizasyonu ve kromatografik ayırma önemli bir rol oynamaktadır.

FLD, belirli bir dalga boyunda floresan özellik gösteren moleküllerin uyarılması ve uyarılmış moleküllerin emisyonunun ölçümüne dayalı bir dedektördür. HILIC kolonlar ile ayrılan moleküllerin uyarılması sonucu emisyon yoğunluğuna bağlı olarak farklı sinyaller elde edilir. Bu sinyaller kromatograma dönüştürülerek veri elde edilir.

2.7. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi (MS), atomlar ve moleküllerin iyonlaştırılarak belirli bir yük kazandırılıp kütle/yük (m/z) oranını ölçerek yapısal ve nicel bir analiz tekniği olarak kullanılmaktadır. Biyoanalitik ve kimyasal analizlerde sıklıkla kullanılan bu teknik, glikomik analizlerde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir. Proteinler ve glikanlar gibi biyomoleküllerin yapısal açıdan incelenmesine olanak sağlamaktadır.

Kütle spektrometrisinde atom veya moleküllerin iyonlaşması gerekmektedir. İyonların cihaz içerisindeki gelişen süreçte çarpışmalarını ve yük kaybını engellemek için yüksek vakum altında çalışmaktadır. Böylelikle, iyonlaşan türün doğru bir şekilde dedektöre ulaşması hedeflenmektedir. MS, genel olarak iyonlaşma, ayrışma ve tespit bölümlerini içermektedir. Bir örnek verme sistemi (örneğin sıvı veya gaz kromatografisi) kullanarak sisteme giren tür çeşitli iyonlaştırma teknikleri kullanarak negatif veya pozitif olarak yüklenirler. Pozitif veya negatif yüklü iyonlar bir kütle analizöründen geçerler ve bu aşamada kütle/yük (m/z) oranına göre birbirlerinden ayrılırlar. Birbirinden ayrılan türler farklı zamanlarda dedektöre ulaşır ve m/z oranına göre tespit edilirler.

İyonlaştırma teknikleri arasında elektron iyonizasyon (EI), elektrosprey iyonizasyon (ESI), matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) gibi teknikler bulunmaktadır. Her bir iyonlaştırma tekniği farklı bir avantaja ve dezavantaja sahip olabilmektedir. Elektron iyonizasyonu (EI) bir sert iyonizasyon tekniğidir. EI tekniği kullanarak moleküllerin iyon kaynağından salınan yüksek enerjili (70 eV) elektronlar ile çarpıştırılarak iyonlaştırılması sağlanır. Burada yapılar yüksek enerjili elektronlar nedeniyle parçalanmaktadır. ESI ve MALDI teknikleri ise yumuşak iyonlaştırma teknikleridir. Moleküllerin minimum parçalanmayla iyonlaştırılmasını sağlar. ESI tekniğinde sıvı numunelerin iyonlaştırılmaları sağlanırken, MALDI tekniğini kuru ve

kristalimsi bir matriks içerisinde bulunan numunelerin iyonlaştırılması esasına dayanır. ESI tekniğinde iyonlar farklı yüklerde ($z=1,2,3\dots20\dots$) olabilirler. Böylelikle yüksek molekül ağırlığına sahip iyonlar daha düşük m/z değerlerinde analiz edilebilirler. MALDI tekniğinde ise genellikle tek yüklü nadiren çok yüklü iyonlar oluşmaktadır. ESI tekniğinde analiz süresi MALDI tekniğine göre daha uzundur. Ayrıca çalışma kütle aralıkları birbirlerinden farklıdır. MALDI tekniğinde yaklaşık 300 kDa gibi yüksek kütle aralığında çalışılabilmektedir. ESI tekniğinde ise yaklaşık 70 kDa kütleyle sahip moleküller analiz edilmektedir. MALDI tekniğinin veri yorumlamaları da tek yüklü iyonlar sayesinde ESI tekniğine göre daha kolay olabilmektedir. MALDI ve ESI teknikleri özellikle proteomik ve glikomik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen kütle spektrometrik teknikler arasındadır.

Sıvı fazda iyonlaşma sağlamak için kullanılan yumuşak bir iyonlaşma tekniği olan ESI sıvı kromatografisi ile birlikte kullanılabilir. Bu yöntemde çözücü ile birlikte örnek yüksek voltaj uygulanan bir kılcal bir (kapiler) elektroda aktarılır ve bu kapiler uç ile birlikte cihaz içerisine püskürtülür. Kapilerin ucuna uygulanan yüksek voltaj ve üretilen yüksek elektrik alanı sayesinde küçük yüklü damlacıklar oluşur. Kurutucu bir gaz ve sıcaklık yardımıyla (Azot) çözücünün uzaklaşmasını sağlar. Çözücünün buharlaşması sonrası damlacıklar yüzeyindeki yük yoğunluğu kademeli olarak artmaktadır. Örnek moleküllerinin yüklerinin elektrostatik itmeleri sonucu yüzey geriliminde meydana gelen değişim bir patlamaya neden olur. Bir veya birden fazla yüklü iyon bölünerek analitin gaz fazında farklı yüklerle cihaza girmesi sağlanır. Kütle analizöründe ayrılan moleküller dedektör yardımıyla tespit edilirler. Bu yöntem sıvı analiz, çok yüklü iyonlar ile daha düşük m/z oranlarında çalışabilme, yüksek kütleyle sahip moleküllerin analizi, kalitatif ve kantitatif analiz gibi imkanlar sunmaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Klinik ve radyografik muayene sonucunda çalışmada yer almayı kabul eden katılımcılar tarafından toplanan kanlardan elde edilen serum ve tükürük örnekleri, SDS (sodyum dodesil sülfat), Igepal CA (oktilfenoksipolietoksietanol), PBS (Disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum klorür, potasyum klorür), PNGase F, prokainamid hidroklorür, 2-pikolinboran, metanol, glikan spe, asetonitril, amonyum bikarbonat, formik asit, etanol, protein G, asetik asit, dimetil sülfoksit (DMSO) ve deiyonize su sistemi kullanılmıştır.

3.2. Katılımcıların Seçilmesi ve Periodontal Durumlarına Göre Sınıflandırılması

Periodontal hastalık/durum teşhisi için hastaların mevcut panoramik radyografları değerlendirilecek ve rutin klinik periodontal indeksleri (Pİ, SCD, KAK ve SKİ) kaydedilecektir. Periodontal sağlık ve periodontitis teşhisinde '2017 Periodontal ve Peri-implant Hastalıkların ve Durumların Sınıflandırılması' baz alınmıştır [5,35]. Tüm klinik periodontal kayıtlar tek bir klinisyen tarafından (NA) toplanmıştır. Klinik periodontal indeksler dental ayna ve Williams periodontal sondu kullanılarak ağızdaki tüm dişlerinin altı yüzeyinden (mid-bukkal, meziobukkal, distobukkal, mid-palatinal, meziopalatinal, distopalatinal) ölçülerek kaydedilmiştir.

3.3. Klinik Periodontal Ölçümlerin Toplanması

Çalışmada kayıt altına alınacak klinik periodontal indekslerin toplanmasında Williams periodontal sondası (LM Dental AB, Nynäshamn, İsveç) kullanılmıştır.

3.3.1. Plak İndeksi (Pİ) (Silness & L e)

Pİ Skorlaması : Diş yüzeyinde plak yoksa, sond yüzeyi tamamen temiz ise 0, diş yüzeyinde gözle izlenebilir plak yoksa ancak sond diş yüzeyinde gezdirdikten sonra sond yüzeyinde boyaya batırılmış gibi ince film tabakası şeklinde plak mevcut ise 1, sond diş yüzeyinde gezdirdikten sonra, sond yüzeyinde makroskobik olarak izlenebilen plak kitlesi mevcut ise 2, diş yüzeyinde dental kalkulus varlığı mevcut ise 3 ile numaralandırılmıştır. Tek bir dişe ait ortalama değer, o dişten toplanan skorlar toplamının 6'ya bölünmesi ile elde edilecektir. Toplam ağız skoru ortalamasının hesaplanmasında ise, 'Tüm dişlerin ortalama değerlerinin toplamı/ Veri toplanan diş sayısı' denklemi kullanılacaktır.

3.3.2. Sondalamada Cep Derinliği (SCD)

SCD Skorlaması: Periodontal sond ile  l lembilen, dişeti kenarı ve cep tabanı arasındaki mesafedir. Ölüm milimetre (mm) cinsinden  l l p kaydedilir. Tüm ağızın SCD ortalamasının hesaplanmasında ise, 'Tüm dişlere ait ortalama değerlerin toplamı / Veri toplanan diş sayısı' denklemi kullanılacaktır.

3.3.3. Klinik Ataçman Kaybı (KAK)

KAK Skorlaması: Periodontal sond ile  l lembilen, dişeti kenarı ile cep tabanı arasındaki mesafedir. Ancak SCD skorundan farklı olarak dişeti çekilmesi varlığı bu skoru etkileyecektir. Dişeti çekilmesi mevcutsa mine- sement sınırı ile dişeti kenarı arasındaki çekilme mesafesi SCD skoruna eklenerek hesaplanır. Dişeti çekilmesi yoksa SCD skoru KAK skoru ile eşittir. Dişeti  ekilmesi (D ), mine-sement birleşimi ile dişeti kenarı arasındaki mesafe olarak tanımlanmış ve çalışmaya katılan her bireyde, dahil edilen her bir dişin meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual ve distolingual olmak üzere toplam 6 farklı noktadan Williams periodontal sondası ile milimetre cinsinden  l lm şt r.

3.3.4. Sondalamada Kanama İndeksi (SKİ)

SKİ Skorlaması: Periodontal sond cep içerisinde gezdirildikten yaklaşık 20 saniye sonra kanamanın olup olmadığının değerlendirilmesidir. Kanama olan bölgenin skoru (+), kanama olmayan bölgenin skoru (-) olarak kayıt altına alınır. Her katılımcı için '(Kanayan yüzey sayısı / Toplam diş yüzeyi sayısı) x 100' formülü kullanılarak tüm ağızın sondalamada kanama yüzdesi hesaplanmıştır.

3.4. Etik Onay

Bu çalışma, insan katılımcılardan elde edilen biyolojik örnekler üzerinden Periodontal Hastalıklarla İlişkili Glikomik Biyobelirteçlerin Belirlenmesi konulu çalışma gerçekleştirilmesine yönelik olup Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve etik kurallar çerçevesinde incelenerek uygun bulunmuştur. Çalışmaya başlamadan önce ilgili etik kuruldan resmi onay alınmış olup EK 4.' de yer almaktadır. Katılımcılar araştırmanın amacı, kapsamı ve yapılacak işlemler hakkında detaylı şekilde bilgilendirilmiş, gönüllü katılım esas alınmıştır. Tüm katılımcılardan yazılı onam formları alınmış ve bilgiler gizlilik ilkelerine uygun olarak anonim şekilde saklanmıştır. Etik ilkeler doğrultusunda çalışmada, Helsinki Bildirgesi'nde yer alan insan hakları ve bireysel mahremiyete saygı ilkelerine tam anlamıyla uyulmuştur. Çalışmada herhangi bir şekilde katılımcı sağlığına zarar verici, rahatsız edici veya onur kırıcı bir yöntem uygulanmamıştır.

3.5. Örneklerin Toplanması

Gerekli ekipman ve altyapı, örneklerin toplanacağı klinikte hazır durumdadır.

3.5.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması

Tükürük örnekleri, sabah saat 09:00 ile 11:00 arasında toplanmış, kontaminasyondan (kanama vb.) kaçınmak için klinik periodontal ölçümler tükürük toplanmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Katılımcılar örnek alımının yapıldığı sabah herhangi bir oral hijyen

uygulamasını yapmamaya ve örnek alımından en az 2 saat öncesine kadar herhangi bir şey yiyip içmemeye özen göstermişlerdir. Örnekleme esnasında, bireylerin ağızlarında biriktirdikleri tükürüğü steril toplama tüplerine tükürmeleri sağlanmış ve bu işlem, en az 5 mL hacminde uyarılmamış tükürük elde edilene dek sürdürülmüştür. Elde edilen tükürük örnekleri, 10 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra, süpernatant faz steril pastör pipeti yardımıyla çökelti kısmından dikkatlice ayrılmış ve steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Numuneler, analiz sürecine kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir [36].

3.5.2. Serum Örneklerinin Toplanması

Venöz kandan serum örneklerini elde etmek amacıyla katılımcılardan antekübital bölgedeki venden 9 mL kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri, santrifüj öncesinde yaklaşık 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, örnekler 10 dakika süreyle 4000 rpm'de santrifüj işlemine tabi tutulmuş, santrifüj sonrası oluşan süpernatant serum kısmı, steril pastör pipeti kullanılarak alttaki çökelti kısmından dikkatle ayrılmış ve steril ependorf tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen serum örnekleri, analiz yapılmaya dek -80 °C'de saklanmıştır [36].

3.6. İnsan Serumundan N-Glikanların Salınması

10 µL serum örneği mikrosantrifüj tüpüne alındı. Denatürasyon işlemi için 20 µL %2 SDS ilave edildi, karıştırıldı ve santrifüj yapıldı. 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Buharlaşma durumunda örnek kaybını minimum seviyelere indirmek için tekrar santrifüj edildi. Sitoplazmik zarı kırmak için 10 µL %4 İgepal eklendi ve karıştırıldı. 10 µL 5x PBS tamponu eklenerek ve karıştırılarak enzimatik reaksiyon için uygun bir ortam hazırlandı. N-glikanları, glikoproteinlerin asparajin aminoasiti ve N-asetil glukozamin arasındaki glikozidik bağı kırmak için 1U PNGase F eklenerek ve karıştırıldı. Enzimlerin denatürasyonu önlemek ve tüm glikanların salınımı için 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı.

3.7. N-Glikanların Etiketlenmesi

37 °C’de inkübasyona bırakılan örnekler alındı ve santrifüj edildi. 20 µL prokainamid ajanı eklenerek etiketlenmiştir. 20 µL 2-pikolinboran eklenmiş ve 65 °C’de 2 saat inkübasyonu bırakılmıştır. Prokainamid çözeltisi stok olarak 165 mg prokainamid 1.5 mL DMSO:CH₃COOH (70:30 v/v) içerisinde çözülmüştür. Pikolinboran çözeltisi olarak 67.2 mg 2-pikolinboran 1.5 mL DMSO:CH₃COOH (70:30 v/v) içerisinde çözülmüştür.

3.8. N-Glikanların Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi 96-kuyucuklu plaka ve Glikan SPE katı faz ekstraksiyonu kullanılarak gerçekleştirildi. 96-kuyucuklu plaka üzerindeki kuyucuklar 1 mL metanol (MeOH) ile yıkandı. Her kuyucuk için 10 mg poliamit reçine içeren Glikan SPE kullanıldı. 1 mL %10 ACN kuyucuklara eklenerek yıkandı. Ardından 2 kez 1 mL %90 ACN eklenerek yıkandı. Her 15 µL örnek miktarı için 85 µL %100 ACN eklenerek bir yükleme çözeltisi hazırlandı ve kuyucuklara eklendi. 15 dakika beklemeye bırakıldı. 1 mL %90 ACN ile 5 kez yıkandı. Ardından toplama plakası yerleştirilerek 100 µL %10 ACN ile 5 dakika aralıklarla 4 kez yıkandı. 400 µL elüsyon yapılan örnekler mikrosantrifüj tüplerine alındı. 45 °C’de 2 saat kurutucuya bırakıldı. Kuruyan örnekleri analize hazır hale getirmek için 70 µL %100 ACN ve 30 µL ultra saf su eklendi, karıştırıldı ve etiketlenmiş insert viallere (analiz şişeleri) aktarıldı.

3.9. İnsan Serumundan IgG İzolasyonu

Her bir örnek için 75 µL Protein G reçinesi bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Yüksek hızda 15 saniye santrifüjlendi. Üst fazdaki sıvı atıldı. 50 µL 1xPBS bağlayıcı tampon çözelti eklendi, karıştırıldı ve 15 saniye yüksek hızda santrifüjlendi. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra 50 µL serum 1xPBS tampon çözeltisi ile 1:1 oranında seyrettilerek reçine bulunan mikrosantrifüj tüpüne alındı ve karıştırıldı. 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Yüksek hızda 15 saniye tekrar santrifüj edilerek üst faz dikkatli bir şekilde alındı ve ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak verim kontrolleri için ayrıldı. Bu adım 4 kez daha aynı şekilde tekrarlandı. Daha sonra 50 µL 0.1 M formik asit elüsyon tamponu inkübasyon yapılan mikrosantrifüj tüpüne (Protein G reçinesi içeren) eklendi, karıştırıldı. 5 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonrasında yüksek hızda santrifüjlendi. Ekstrate

edilmiş IgG içeren üst faz alınarak ayrı bir temiz mikrosantrifüj tüpüne alındı. 3 kez daha bu işlem tekrarlandı ve her 50 µL supernatant için 5 µL 1 M amonyum bikarbonat eklendi. 15 dakika 300 rpm hızda karıştırıldı. Daha sonra hızlı vakum konsantratör kullanılarak 45 °C’de kurutuldu.

3.10. IgG N-Glikanlarının Salınması

Kurumuş örneklere 30 µL %1.33 SDS eklendi. 5 dakika 500 rpm hızda 20 °C’de karıştırıldı. Daha sonra 70 °C’de 10 dakika beklemeye alındı. Her bir örnek için 10 µL %4 Igepal ilave edildi ve karıştırıldı. 10 µL 5xPBS eklendi. Son olarak 1U PNGase F eklenerek 18 saat inkübasyona bırakıldı.

3.11. İzole Edilmiş IgG N-Glikanlarının Etiketlenmesi

37 °C’de inkübasyona bırakılan örnekler alındı ve santrifüj edildi. 12.5 µL prokainamid ajanı eklenerek etiketlenmiştir. 12.5 µL 2-pikolinboran eklendi ve 65 °C’de 2 saat inkübasyonu bırakıldı. Prokainamid çözeltisi stok olarak 165 mg prokainamid 1.5 mL 70 DMSO: 30 CH₃COOH (v/v) içerisinde çözülmüştür. Pikolinboran çözeltisi olarak 67.2 mg 2-pikolinboran 1.5 mL 70 DMSO: 30 CH₃COOH (v/v) içerisinde çözülmüştür.

3.12. IgG N-Glikanlarının Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi 96-kuyucuklu plaka ve Glikan SPE katı faz ekstraksiyonu kullanılarak gerçekleştirildi. 96-kuyucuklu plaka üzerindeki kuyucuklar 400 µL etanol (EtOH) ile yıkandı. Her kuyucuk için 10 mg poliamit reçine içeren Glikan SPE kullanıldı. 2 tekrarlı olarak 400 µL %96 ACN kuyucuklara eklenerek yıkandı. Her 15 µL örnek miktarı için 85 µL %100 ACN eklenerek bir yükleme çözeltisi hazırlandı ve kuyucuklara eklendi. 15 dakika beklemeye bırakıldı. 400 µL %96 ACN ile 5 kez yıkandı. Toplama plakası yerleştirildi. 200 µL ultra saf su ile elüsyon işlemi tamamlandı. Elüsyon yapılan örnekler mikrosantrifüj tüplerine alındı. 45 °C’de 2 saat kurutucuya bırakıldı. Kuruyan örnekleri analize hazır hale getirmek için 70 µL %100 ACN ve 30 µL ultra saf su eklendi, karıştırıldı ve etiketlenmiş insert viallere (analiz şişeleri) aktarıldı.

3.13. HPLC-HILIC-FLD ile IgG ve İnsan Serumu Toplam N-glikanlarının Analizleri

Su ile elüe edilen prokainamit etiketli N-glikanların analizi için, her örneğe hacimce IgG için %75, insan serumu için %70 oranında asetonitril (ACN) eklendi. Analizler, Thermo UHPLC-HILIC-FLD sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. N-glikanların kromatografik ayrımı için Waters Glycan BEH Amide kolonu (130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm, IgG için; 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm insan serumu için) kullanıldı. Floresan dedektör (FLD) ayarlarında eksitasyon dalga boyu 310 nm ve emisyon dalga boyu 370 nm olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı IgG analizlerinde 60 °C, insan serumu toplam N-glikom analizleri için 25 °C olarak ayarlandı. Mobil faz A olarak 50 mM amonyum format (pH 4.4), mobil faz B olarak ise %100 asetonitril (ACN) kullanıldı. IgG N-glikanlarının analizlerinde Mobil faz B'nin oranı 30 dakika boyunca %75'ten %62'ye düşürüldü ve akış hızı 0.4 mL/dk olarak sabitlendi. İnsan serum toplam N-glikan analizleri için mobil faz B'nin oranı 25 dakika boyunca %70'ten %58'e düşürüldü ve akış hızı 0.56 mL/dk olarak sabitlendi. Her örnek için enjeksiyon hacmi 25 µL olarak belirlendi.

3.14. Tükürük Örneklerinden IgG İzolasyonu ve Proteolitik Parçalanmaları

IgG izolasyonu için 50 µL Protein G manyetik agaroz boncukları kullanılmıştır. Boncuklar öncelikle dört kez 200 µL 1X PBS ile yıkanmış ve ardından her kuyucuğa 50 µL tükürük örneği ve 50 µL 2X PBS eklenerek 3 saat inkübe edilmiştir. Yükleme sonrasında, boncuklar 200 µL 1X PBS ile yıkanarak IgG'nin elüsyonu için 200 µL 0.1 M formik asit eklenmiş ve 15 dakika inkübasyon yapılmıştır. Elüsyon sonrası pH dengelemesi için 20 µL 1 M amonyum bikarbonat ilave edilmiştir. Elde edilen IgG fraksiyonları 45°C'de vakum konsantratörü kullanılarak kurutulmuştur. Kurutulan IgG örnekleri, 20 µL 50 mM amonyum bikarbonat (ABC) içerisinde 500 rpm'de 10 dakika çözündürülmüştür. Sonrasında her örneğe 20 µL (0.05 µg/µL) tripsin eklenerek, proteolitik sindirim için 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

3.15. nLC-QTOF-MS/MS Analizleri

Tükürük örneklerinden izole edilen IgG fraksiyonlarının N-glikopeptit profilleri, Bruker timsTOF Pro (QTOF) cihazı kullanılarak nLC-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz

edilmiştir. Kromatografik ayırma, 10 cm uzunluğundaki nanoLC kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve akış hızı 0.7 µL/dk olarak ayarlanmıştır. Mobil faz A olarak %0.1 formik asit (FA) içeren su, mobil faz B olarak ise %95 asetonitril (ACN) ve %0.1 formik asit içeren çözelti kullanılmıştır. Gradyan elüsyon programı kapsamında, mobil faz B oranı 25 dakika içerisinde %3'ten %30'a kademeli olarak artırılarak glikopeptitlerin etkin şekilde ayrılması sağlanmıştır. Kütle spektrometresi tarafında iyonların parçalanması için basic stepping CID (collision-induced dissociation) yöntemi kullanılmıştır. Bu yaklaşım, hem peptit omurgasına hem de bağlı glikan yapılarına ait fragment iyonlarının elde edilmesine olanak tanımıştır. Uygulanan bu analiz protokolü, tükürük kaynaklı IgG N-glikopeptitlerinin yüksek hassasiyet ve doğrulukla profillenmesini sağlamış, elde edilen MS/MS verileri glikopeptit yapıların güvenilir şekilde tanımlanmasına uygun bir temel sunmuştur.

3.16. Veri Analizleri

IgG ve İnsan Serumu Toplam N-glikan profillerine ilişkin veriler, UHPLC-HILIC-FLD analizleri sonucunda elde edilmiş ve pik alanlarının kantifikasyonu için Thermo Chromeleon yazılımı kullanılmıştır. Her bir glikan yapısına ait kromatografik pikler manuel olarak incelenmiş, entegrasyon işlemi standardize edilerek gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen ham pik alanları, bireyler arası karşılaştırılabilirliğin sağlanması amacıyla toplam alan normalizasyonu yöntemi ile işlenmiş ve her bir glikanın göreceli bolluk değeri hesaplanmıştır. Serum ve tükürük örneklerinden elde edilen IgG N-glikanlarının göreceli alan yüzdeleri arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Kruskal-Wallis ANOVA testi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler ve ROC analizleri OriginPro (OriginLab Corporation, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkları görselleştirmek amacıyla kutu grafikleri JASP (Version 0.17.2, University of Amsterdam) yazılımı ile oluşturulmuştur. Tüm analizlerde $p < 0.05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

Tükürük örneklerinden izole edilen IgG fraksiyonlarının N-glikopeptit profilleri, nLC-QTOF-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen MS verileri öncelikle Bruker DataAnalysis yazılımı ile değerlendirilmiştir. Glikopeptitlerin ön tanımlamaları, teorik m/z değerleri ile spektrumların manuel karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır. Daha

sonra, MS/MS spektrumlarının detaylı analizi ve glikopeptit yapıların otomatik tanımlanması için MSFragger Glyco yazılımı kullanılmış ve bu yazılım aracılığıyla glikan bağlı peptidlere ait karakteristik fragment iyonları tespit edilmiştir. Tanımlanan glikopeptitlerin alıkonma zamanları (retention time) GlycoGenius platformu üzerinden belirlenmiştir. Son aşamada, her bir glikopeptitin göreceli miktarlarının hesaplanabilmesi için LacyTools yazılımı kullanılmış ve toplam alan normalizasyonu yaklaşımı uygulanarak kantifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu süreç sayesinde, glikopeptit profilleri hem kalitatif hem de kantitatif olarak detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Periodontal Hastalıklarda Serum ve Tükürük IgG N-Glikanlarının Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi

İmmünoglobulin G (IgG) molekülleri, glikan yapılarındaki değişikliklerin çeşitli hastalık durumlarında biyobelirteç potansiyeline sahip olması nedeniyle önemlidir. Bu çalışmada, serum ve tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerinin N-bağlantılı (N-glikan) profilleri karakterize edilmiş ve periodontal hastalıklarla ilişkileri incelenmiştir.

Çizelge 4.1’de periodontal sağlık durumu farklı olan üç grup (periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler) klinik periodontal indeksler ve demografik özellikler açısından değerlendirilmiştir. Katılımcıların yaş ortalamaları incelendiğinde, periodontitis grubunun ortalama yaşının (40.86 ± 8.77) diğer gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Gingivitis grubunun yaş ortalaması (30.89 ± 8.67) olup sağlıklı bireylerde bu değer (26.50 ± 4.03) olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, periodontitisin daha ileri yaşlarda ortaya çıkma eğiliminde olduğunu desteklemektedir. Cinsiyet dağılımı tüm gruplarda dengeli olup, gruplar arasında belirgin bir kadın-erkek oranı farklılığı bulunmamaktadır.

Klinik periodontal indekslere bakıldığında, Plak İndeksi (PI ort.) periodontitis (2.60) ve gingivitis (3.55) gruplarında sağlıklı bireylere (0.72) kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Gingivitis grubunda PI değerinin periodontitis grubundan bile daha yüksek olması, plak birikiminin erken evre periodontal hastalıklarda daha baskın bir etken olabileceğini göstermektedir. Sondalamada Kanama İndeksi (BOP%) değerleri periodontitis grubunda (80.67%) en yüksek düzeyde bulunurken, gingivitis grubunda (41.84%) ve sağlıklı bireylerde (3.97%) çok daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular, inflamasyon şiddetinin hastalığın ilerlemesiyle doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir.

Cep Derinliği (CD ort.) ve Klinik Ataçman Kaybı (AL ort.) değerleri periodontitis grubunda sırasıyla (3.38 mm) ve (3.56 mm) olup, diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde artmıştır. Sağlıklı bireylerde CD (1.29 mm) ve AL (1.29 mm) değerleri düşük, gingivitis grubunda ise (1.46 mm) ve (1.48 mm) ile orta düzeydedir. Bu sonuçlar, periodontitis hastalarında periodontal destek dokuların belirgin şekilde kaybedildiğini ortaya koymaktadır. Diş Eti Çekilmesi (DÇ ort.) de benzer şekilde periodontitis grubunda (0.18 mm) daha yüksektir; gingivitis (0.02 mm) ve sağlıklı bireyler (0.01 mm) gruplarında ise ihmal edilebilir düzeydedir. Son olarak, ortalama diş sayısı tüm gruplarda benzer bulunmuş olup, periodontitis grubunda hafif bir azalma (25.71 diş) gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen periodontitis, gingivitis ve sağlıklı gruplara ait demografik ve klinik periodontal parametrelerin dağılımı. Ortalama yaş, cinsiyet oranları, plak indeksi (PI), sondalamada kanama yüzdesi (BOP%), cep derinliği (CD), diş eti çekilmesi (DÇ), klinik ataçman kaybı (AL) ve ortalama diş sayıları gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

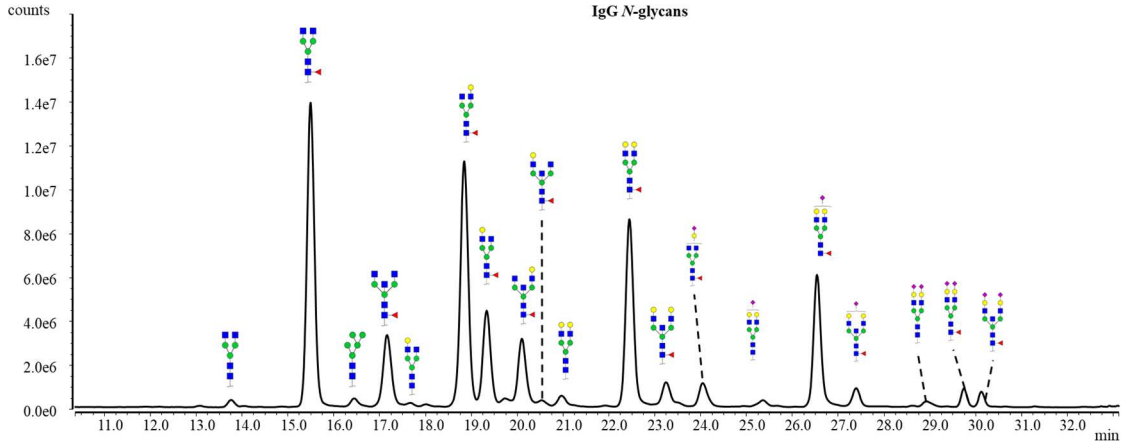
	Periodontitis	Gingivitis	Sağlıklı
Ortalama Yaş±Standart Sapma	40.86±8.77	30.89±8.67	26.50±4.03
Kadın %	52.38	42.11	46.67
Erkek %	47.62	57.89	53.33
PI ort.	2.60	3.55	0.72
BOP%	80.67	41.84	3.97
CD ort.	3.38	1.46	1.29
DÇ ort.	0.18	0.02	0.01
AL ort.	3.56	1.48	1.29
Diş sayısı	25.71	27.21	27.82

Sonuç olarak, çalışmaya dahil edilen örneklemin demografik ve klinik verileri, periodontal hastalık şiddeti ile yaş, plak birikimi, kanama oranı, cep derinliği ve ataçman kaybı gibi klinik parametreler arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu veriler, periodontal hastalıkların tanısında ve hastalık progresyonunun izlenmesinde klinik indekslerin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Serum ve tükürükten IgG izolasyonu, Protein G boncukları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen serum IgG'lerinin glikan profilleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-hidrofilik etkileşim kromatografisi-floresan dedeksiyonu (HPLC-HILIC-FLD) yöntemi ile analiz edilmiştir. Tükürükten izole edilen IgG moleküllerinin glikan yapıları ise nano-akışlı sıvı kromatografisi ve tandem kütle spektrometrisi (nLC-MS/MS) kullanılarak detaylı şekilde incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, serumdan izole edilen IgG moleküllerinin N-glikan profillerinin analizi yapılmıştır. Şekil 4.1'de sunulan kromatogramda, 19 adet farklı N-glikan piki tespit edilmiştir. Elde edilen bu glikan profilleri, literatürde daha önce tanımlanmış IgG glikan yapılarıyla yüksek derecede uyumluluk göstermektedir.

Belirlenen glikan yapıları genel olarak fukozlanmış glikanlar, galaktoz içermeyen (agalaktozile) glikanlar ve galaktoz içeren (monogalaktosile veya digalaktosile) glikanlar şeklinde sınıflandırılmıştır. Fukozlu glikanlar, çekirdek fukozilasyonu içeren yapılar olup, inflamasyon ve bağışıklık yanıtı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Agalaktozile glikanların artışı, kronik inflamasyon ve otoimmün hastalıklarla bağlantılıdır. Öte yandan, galaktoz içeren glikanlar, anti-inflamatuvar özellikler gösterme potansiyeline sahiptir.



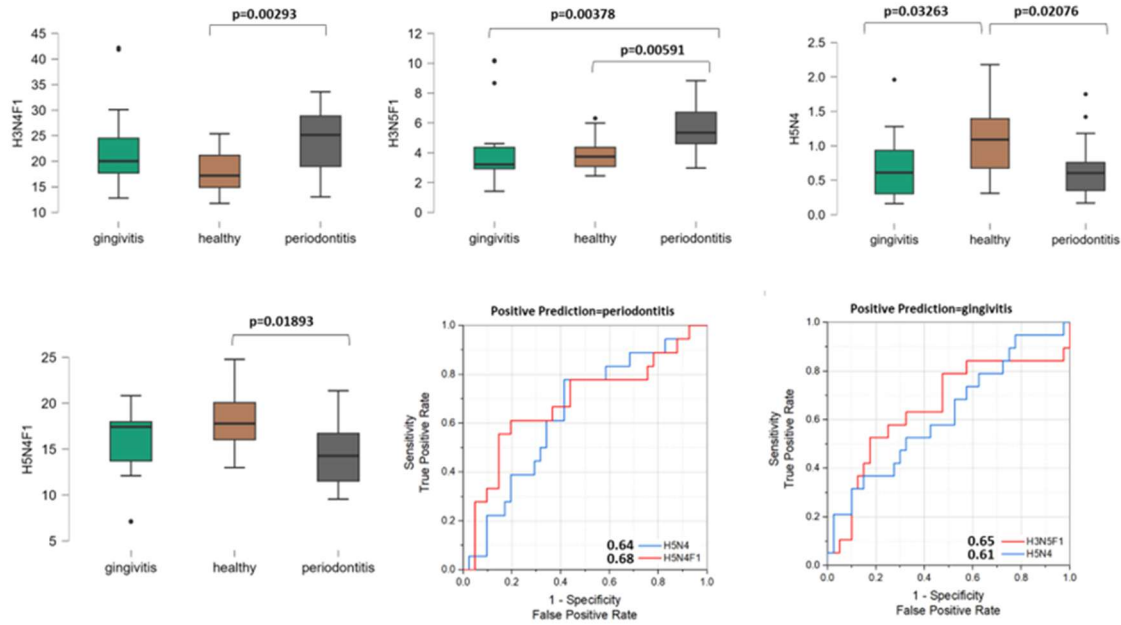
Şekil 4.1. Serumdan izole edilen IgG N-glikanlarının HPLC-HILIC-FLD analizi sonucunda elde edilen kromatogramı. Kromatogramda literatürle uyumlu olarak 19 farklı N-glikan piki tespit edilmiştir. Glikan yapıları fukozlanmış, galaktoz içermeyen ve galaktoz içeren glikanlar şeklinde sınıflandırılmıştır.

Kromatogramda görülen her bir N-glikana ait pikin alanı, Thermo Chromeleon yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Pik alanları üzerinden toplam alan normalizasyon yaklaşımı uygulanarak her bir glikanın göreceli alan yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu göreceli alan değerleri, gingivitis ve periodontitis grupları arasında karşılaştırmalı analizler yapılmasında kullanılmıştır. Elde edilen veriler, periodontal hastalık durumlarının IgG N-glikan profilleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Gruplar arasındaki farkların belirlenebilmesi amacıyla “Kruskal-Wallis ANOVA” testi uygulanmış, bu testin sonuçları EK 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Periodontal hastalıkların IgG N-glikan profilleri üzerindeki etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, dört farklı N-glikan tipinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Anlamlı farklılık gösteren glikanlar H3N4F1, H3N5F1, H5N4 ve H5N4F1 olarak belirlenmiştir. H3N4F1 ve H3N5F1 yapıları çekirdek fukozilasyonu içeren ve düşük anten sayısına sahip glikanlardır. Şekil 4.2'de gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında dört farklı N-glikan yapısına (H3N4F1, H3N5F1, H5N4 ve H5N4F1) ait göreceli alan yüzdeleri kutu grafikleri ile sunulmuştur. H3N4F1 ve H3N5F1 glikanlarının periodontitis grubunda göreceli olarak daha yüksek değerlere ulaştığı gözlenmiştir. Özellikle H3N5F1 için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuş ($p = 0.00591$) ve periodontitis grubunda

belirgin bir artış kaydedilmiştir. H5N4 glikanı ise gingivitis grubunda daha düşük düzeylerde bulunurken, sağlıklı bireylerde daha yüksek değerlere ulaşmış, periodontitis grubunda ise tekrar azalma göstermiştir. Benzer şekilde, H5N4F1 glikanı da sağlıklı bireylerde en yüksek değerlere sahipken, periodontitis grubunda belirgin bir düşüş göstermiştir.

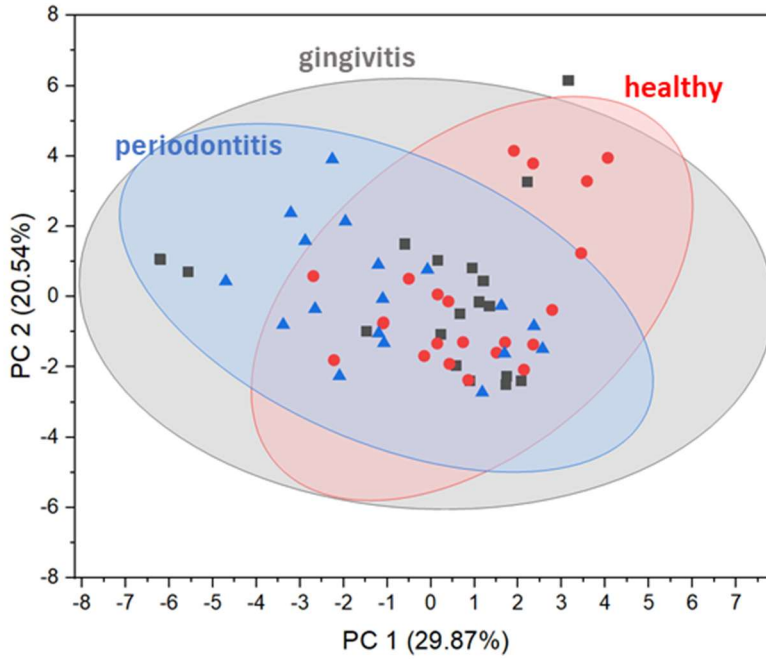
Şekil 4.2'de ayrıca, bu glikanların hastalık tanısındaki performansını değerlendirmek amacıyla yapılan ROC (Receiver Operating Characteristic) analizleri de yer almaktadır. Periodontitis tanısı için yapılan ROC analizinde H5N4 ve H5N4F1 glikanlarının sırasıyla 0.64 ve 0.68 AUC (Area Under Curve) değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu değerler, H5N4F1'in periodontitis hastalarının ayırt edilmesinde H5N4'e kıyasla daha yüksek bir doğruluk sunduğunu göstermektedir. Gingivitis tanısı için yapılan ROC analizlerinde ise H3N5F1 ve H5N4 glikanlarının sırasıyla 0.65 ve 0.61 AUC değerleri hesaplanmış, H3N5F1 glikanının gingivitis hastalarının tanımlanmasında daha iyi bir ayırt ediciliğe sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında H3N4F1, H3N5F1, H5N4 ve H5N4F1 glikanlarına ait serum IgG N-glikanlarının göreceli alan yüzdelерinin kutu grafikleri ve hastalık tanısındaki ayırt ediciliklerini gösteren ROC eğrileri.

Genel olarak, Şekil 4.2’de sunulan bulgular, serum IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalık durumlarına özgü değişiklikler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle H3N5F1 ve H5N4F1 glikanları, hem göreceli alan değişimleri hem de ROC analizlerinde elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, gingivitis ve periodontitis hastalıklarının tanısında potansiyel biyobelirteç adayları olarak öne çıkmaktadır. Bu sonuçlar, periodontal hastalıkların sistemik immün yanıt üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde yansıttığını ve glikan analizlerinin periodontal hastalıkların erken tanı ve sınıflandırılmasında önemli bir katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

Şekil 4.3’de serum IgG N-glikan profillerine dayalı olarak yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları gösterilmektedir. PCA, örnekler arasındaki varyasyonu en iyi şekilde özetleyen iki temel bileşen üzerinden grupların ayrışmasını görselleştirmek amacıyla uygulanmıştır. Birinci temel bileşen (PC1) varyansın %29,87’sini, ikinci temel bileşen (PC2) ise %20,54’ünü açıklamaktadır. Bu iki bileşen birlikte veri setindeki toplam varyansın yaklaşık %50,41’ini temsil etmekte olup, örneklerin büyük bir kısmının bu iki boyutta etkin bir şekilde ayrılabilmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Serum IgG N-glikan profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları.

PCA grafiğinde periodontitis, gingivitis ve sağlıklı gruplara ait örneklerin dağılımı incelendiğinde, periodontitis grubunun (mavi üçgenler) sol alt bölgede yoğunlaştığı görülmektedir. Sağlıklı bireyler (kırmızı daireler) ise sağ üst bölgede daha kompakt bir şekilde yer almaktadır. Bu durum, sağlıklı bireylerin glikan profillerinin periodontitis hastalarına kıyasla belirgin bir farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Gingivitis grubuna ait örnekler (gri kareler) ise daha merkezi bir konumda ve diğer iki gruba göre daha dağınık bir dağılım sergilemektedir.

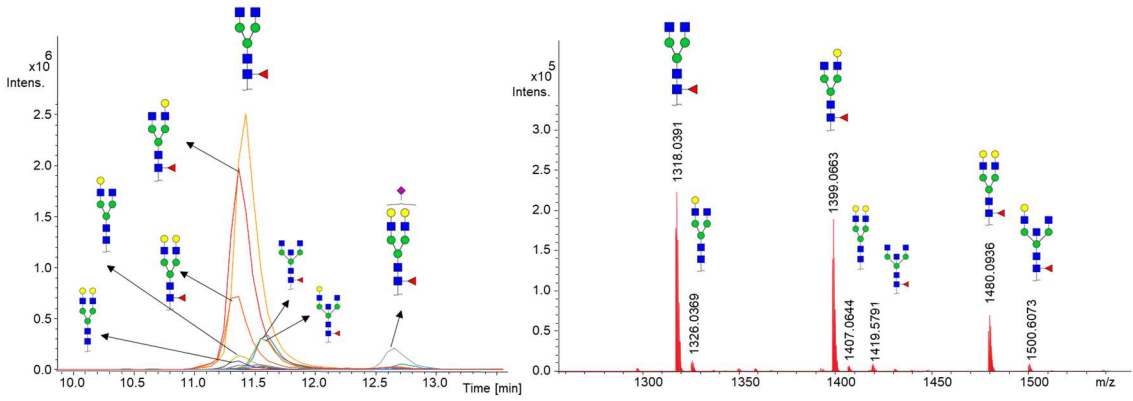
Örneklerin dağılımı ve elipsler tarafından temsil edilen varyans bölgeleri göz önünde bulundurulduğunda, periodontitis ve sağlıklı bireyler arasında belirgin bir ayrışma olduğu, gingivitis grubunun ise her iki gruba da kısmen benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu durum, gingivitisin periodontal sağlık ve periodontitis arasında bir ara durum teşkil ettiğini ve glikan profillerinin bu geçişi yansıttığını düşündürmektedir. Genel olarak PCA analizi, serum IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalık durumlarına göre farklılaştığını ve glikan örüntülerinin potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

4.2. Periodontal Hastalıklarda Tükürükten İzole Edilen IgG N-Glikopeptitlerin Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerinin N-bağlantılı glikopeptit (N-glikopeptit) profilleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiş ve periodontal hastalık durumları ile ilişkileri de incelenmiştir. Analizler, nLC-MS/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş, glikopeptitlerin göreceli bollukları LacyTools yazılımı ile hesaplanmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, IgG1 izotipine ait 13 farklı N-bağlantılı glikopeptit yapısı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, Bruker DataAnalysis yazılımı kullanılarak manuel olarak değerlendirilmiştir.

Tanımlama sürecinde her bir glikopeptite özgü teorik kütle/yük (m/z) oranları hesaplanmış ve bu değerler MS spektrumları ile karşılaştırılarak öncü iyonlar belirlenmiştir. Ayrıca MS/MS spektrumlarında, glikopeptitlerin doğrulanması amacıyla karakteristik oksonyum iyonları (örneğin, HexNAc m/z 204.08 ve HexHexNAc m/z

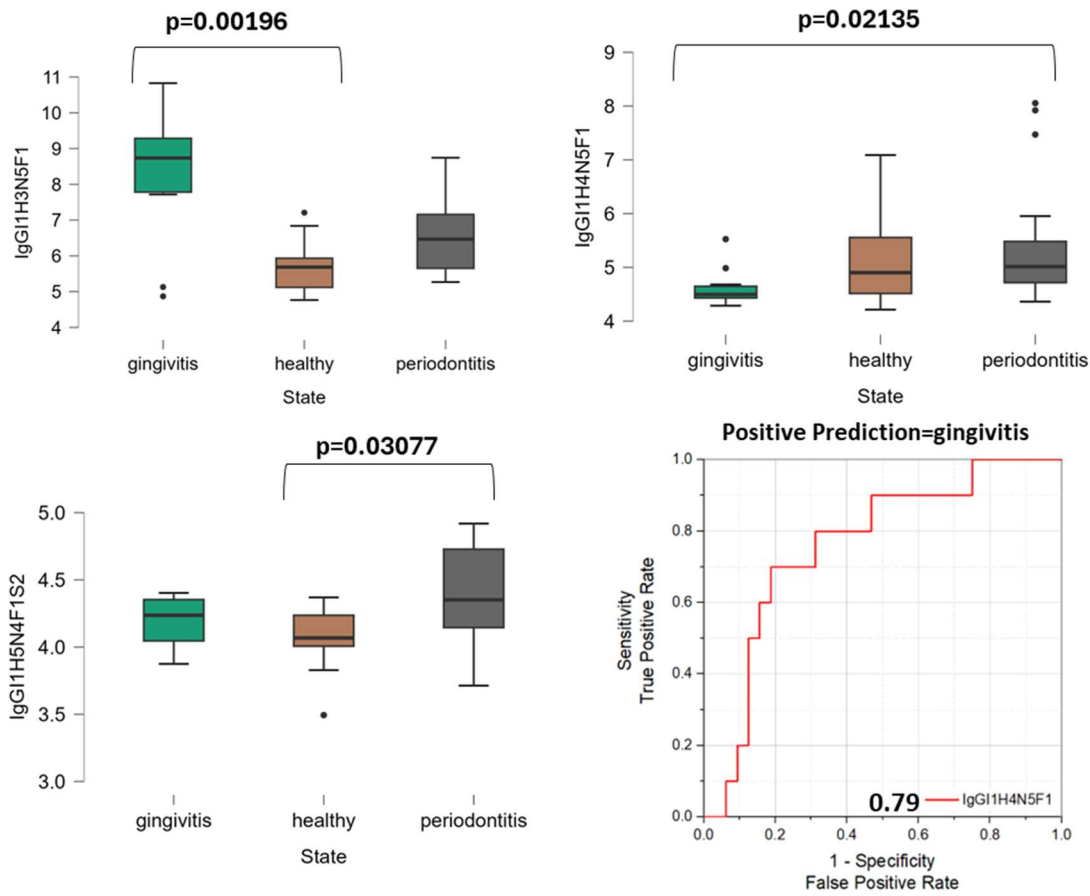
366.10) taranmış ve elde edilen fragmentasyon verileri ile yapısal doğrulamalar desteklenmiştir. Tespit edilen glikopeptitlere ait kromatografik alıkonma zamanları da belirlenerek, hem kantitatif analizler hem de karşılaştırmalı glikozilasyon çalışmaları için referans veriler oluşturulmuştur. Şekil 4.4'te, tespit edilen N-glikopeptit yapılarına ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramları (Extracted Ion Chromatograms, EIC) sunulmakta olup, her bir glikopeptitin alıkonma zamanı ve göreceli bolluk düzeyi görsel olarak izlenebilmektedir.



Şekil 4.4. nLC-MS/MS analizleri sonucu tükürükten elde edilen IgG N-glikopeptitlerine ait ekstrakte edilmiş iyon kromatogramları.

Elde edilen veriler üzerinde Kruskal-Wallis ANOVA testi uygulanmış ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar değerlendirilmiştir. Ayrıca, belirlenen glikopeptit yapılarının periodontal hastalıkların tanısal performansını belirlemek amacıyla ROC analizleri yapılmıştır. İlgili glikopeptitlerin göreceli bolluklarına ilişkin gruplar arasındaki istatistiksel analiz sonuçları EK 2'de sunulmaktadır. Kruskal-Wallis ANOVA testi ile belirlenen anlamlı farklılıklar ve p-değerleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Şekil 4.5 IgG1 alt sınıfına ait üç farklı N-glikopeptitin (H3N5F1, H4N5F1 ve H5N4F1S2) göreceli bolluklarına ilişkin kutu grafiklerini göstermektedir. IgG1-H3N5F1 glikopeptiti gingivitis grubunda yüksek düzeylerde bulunmuş, sağlıklı ve periodontitis gruplarında ise daha düşük bolluk değerleri göstermiştir. IgG1-H4N5F1 glikopeptitinde ise, gingivitis grubunda belirgin şekilde daha düşük seviyeler gözlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. IgG1-H5N4F1S2 glikopeptiti, periodontitis grubunda diğer gruplara göre daha yüksek seviyelerde bulunmuş, bu da ileri periodontal hasar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.



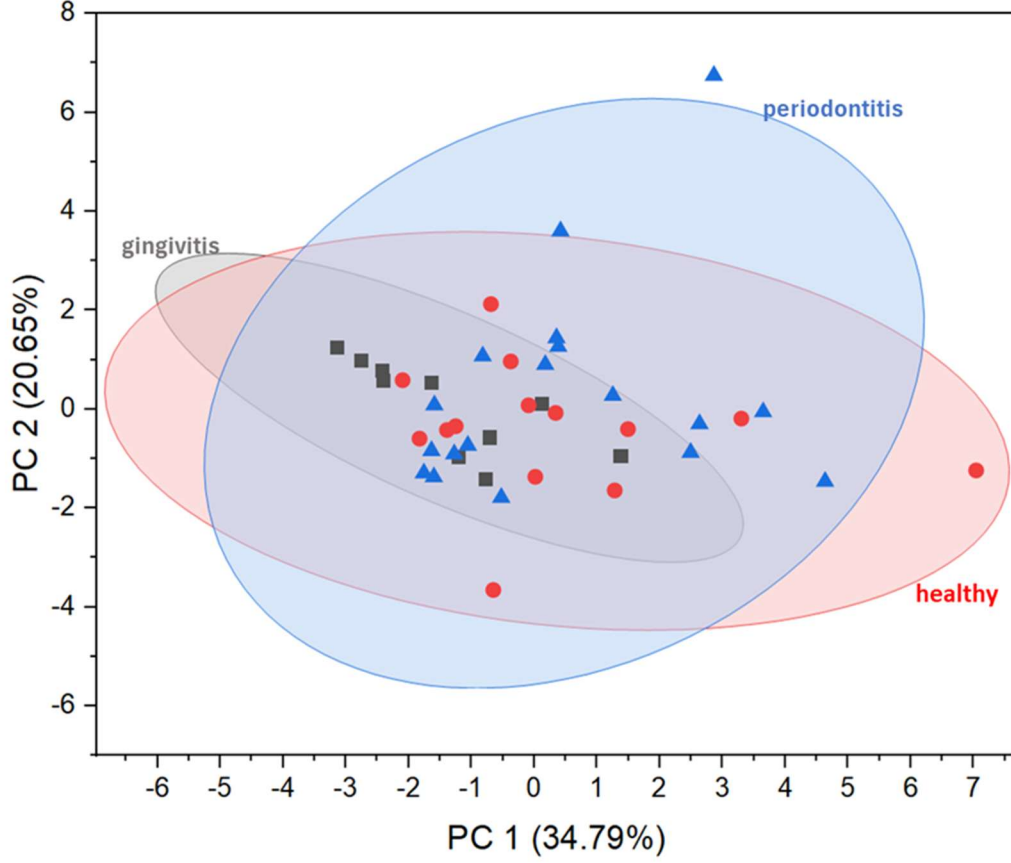
Şekil 4.5. Tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerine ait istatistiksel olarak anlamlı bulunan N-glikopeptitlerin (IgG1-H3N5F1, IgG1-H4N5F1 ve IgG1-H5N4F1S2) göreceli bolluklarının gingivitis, periodontitis ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırıldığı kutu grafikleri ve IgG1-H4N5F1 glikopeptiti için yapılan ROC analizi.

Aynı şekilde, Şekil 4.5.'in sağ alt köşesinde, IgG1-H4N5F1 glikopeptiti kullanılarak yapılan ROC analizi sunulmuştur. ROC analizi sonucunda, IgG1-H4N5F1 yapısının gingivitis tanısında AUC = 0,79 değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu değer, glikopeptitin gingivitis hastalarını sağlıklı bireylerden ayırmada iyi bir tanısal performans sergilediğini göstermektedir. AUC değerinin 0.75'in üzerinde olması, bu glikopeptit yapısının gingivitis için umut verici bir biyobelirteç adayı olabileceğini desteklemektedir.

Genel olarak Şekil 4.5, tükürükten izole edilen IgG N-glikopeptitlerinin periodontal hastalıklarla ilişkili özgün değişiklikler gösterdiğini ve belirli glikopeptit yapıların periodontal hastalıkların tanı süreçlerinde biyobelirteç olarak potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.

Şekil 4.6'da tükürük IgG N-glikopeptit profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireylerin PCA sonuçları verilmiştir. Periodontitis grubuna ait örnekler (mavi üçgenler) daha çok pozitif PC1 ve hafif pozitif PC2 eksenlerinde toplanmıştır. Gingivitis grubuna ait örnekler (gri kareler) orta bölgede yer almakta ve sınırlı bir dağılım göstermektedir. Sağlıklı bireyler (kırmızı daireler) ise negatif PC1 eksenini boyunca daha fazla yoğunlaşmış görünmektedir. Özellikle sağlıklı bireyler ve periodontitis hastaları arasında belirli bir ayrışma olduğu gözlenmekte, gingivitis grubunun ise her iki grup arasında bir geçiş pozisyonu aldığı dikkat çekmektedir.

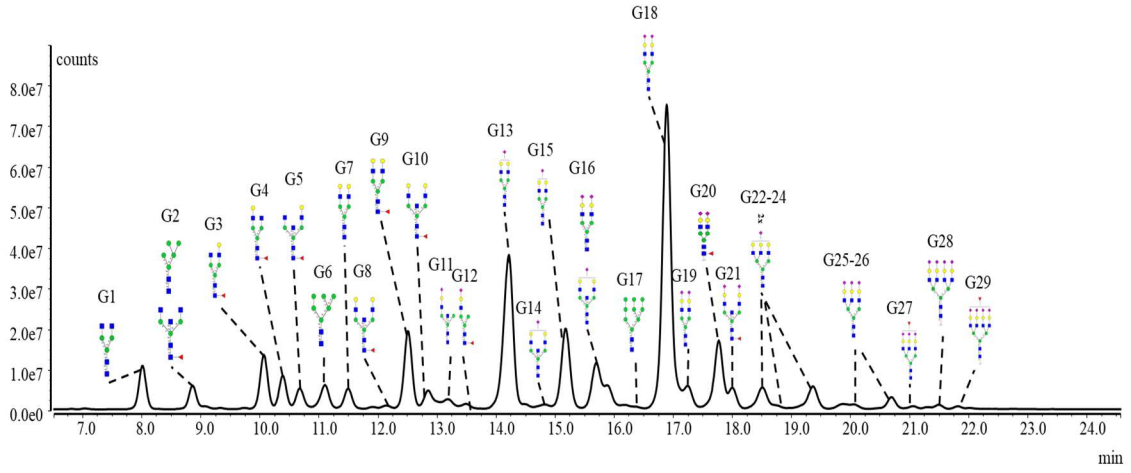
Grafikte gösterilen elipsler, her grubun varyansını ve örnek dağılımını temsil etmektedir. Periodontitis grubunun elipsi sağ tarafa kaymış ve sağlıklı grubun elipsiyle kısmi bir örtüşme göstermiştir. Gingivitis grubunun dağılımı daha dar bir varyans göstermektedir ve hem sağlıklı hem de periodontitis gruplarıyla sınırlı bir örtüşme sergilemektedir. Bu durum, periodontal hastalıkların progresyonu boyunca glikopeptit profillerinde kademeli değişimler olduğunu ve gingivitis evresinin moleküler profiller açısından bir ara faz teşkil ettiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.6. Tükürük IgG N-glikopeptit profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında yapılan temel bileşen analizi (PCA) sonuçları.

4.3. Periodontal Hastalıklarda Toplam Serum N-Glikanlarının Biyobelirteç Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, periodontal hastalıkların toplam serum N-glikan profilleri üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve bu glikan yapıların hastalık tanısındaki biyobelirteç potansiyeli değerlendirilmiştir. Serum örneklerinden izole edilen glikanlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-hidrofilik etkileşim kromatografisi-floresan dedeksiyonu (HPLC-HILIC-FLD) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda toplam 29 farklı N-glikana ait pik tanımlanmış olup, bu glikanlara ilişkin kromatogramlar Şekil 4.7’de sunulmaktadır.



Şekil 4.7. Serum örneklerinden izole edilen toplam N-glikanların HPLC-HILIC-FLD analizi sonucunda elde edilen kromatogramı. Kromatogramda toplam 29 farklı N-glikan piki belirlenmiş ve her bir glikanın yeri işaretlenmiştir.

Her bir N-glikan yapısına ait pikin alanı, Thermo Chromeleon yazılımı kullanılarak hesaplanmış, ardından toplam pik alanı üzerinden normalizasyon yapılarak göreceli alan yüzdeleri belirlenmiştir. Bu yöntem, örnekler arasındaki teknik farklılıkların minimize edilmesini sağlamış ve gruplar arası karşılaştırmaların daha doğru bir şekilde yapılmasına imkân tanımıştır. Elde edilen göreceli alan verileri kullanılarak, gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında karşılaştırmalı analizler gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla Kruskal-Wallis ANOVA testi uygulanmış ve bu testin sonuçları EK 3'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

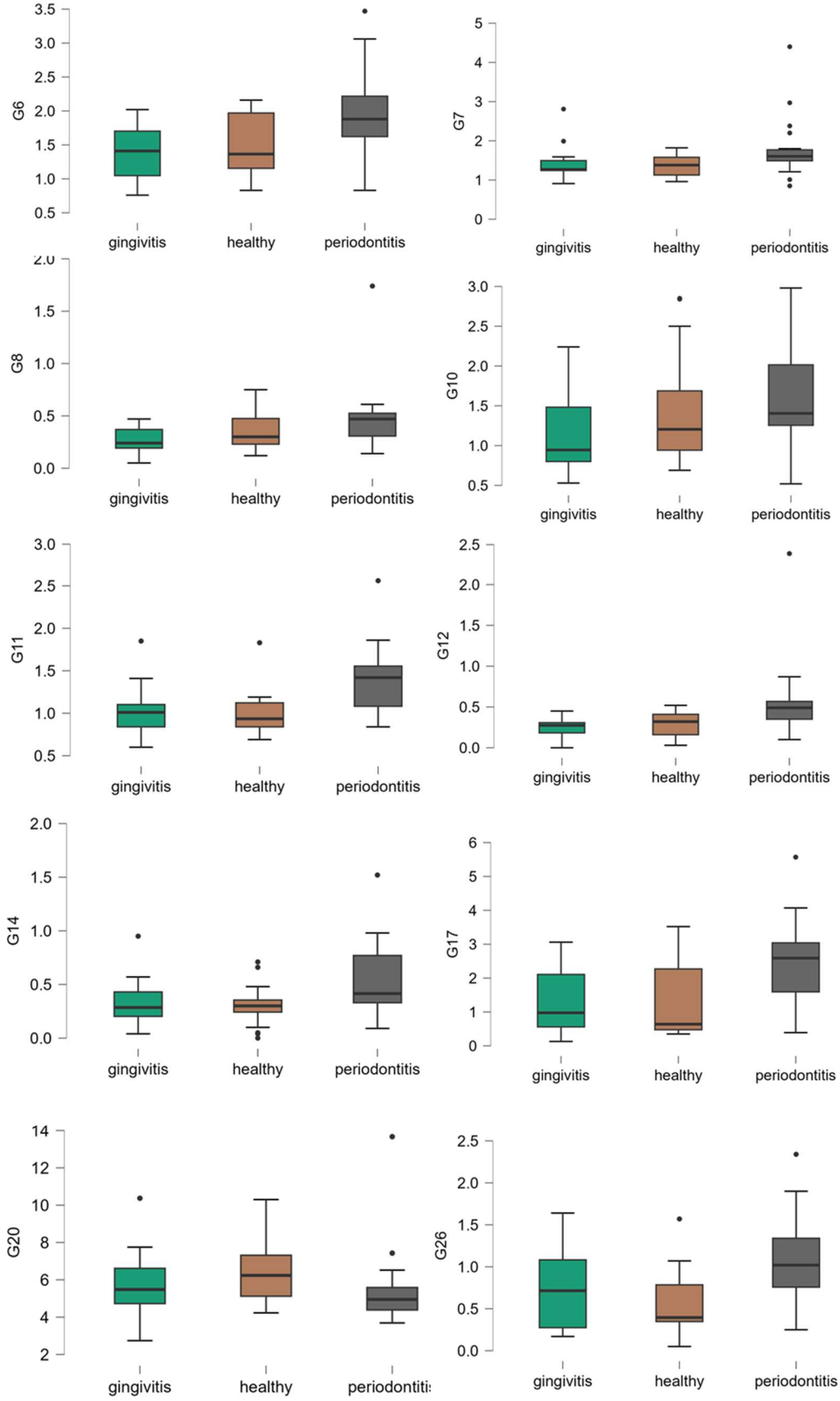
Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, toplam serum N-glikan profilleri içinde belirli glikan piklerinde periodontal hastalık grupları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçlarına göre, G6, G7, G8, G10, G11, G12, G14, G17, G20 ve G26 numaralı glikan piklerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu bulgu, periodontal hastalıkların, spesifik N-glikan yapılarına ait göreceli alan yüzdelerinde değişimlere yol açtığını göstermektedir. Anlamlı farklılık gösteren glikan yapılarının inflamasyon ve immün yanıt süreçleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Özellikle bu glikan profillerinde gözlenen değişimler, periodontal hastalıkların biyomoleküler düzeyde sistemik etkiler oluşturduğunu

desteklemekte ve ilgili glikan yapılarının hastalık tanısında potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Şekil 4.8'de, gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren toplam 10 glikan yapısına (G6, G7, G8, G10, G11, G12, G14, G17, G20 ve G26) ait kutu grafikleri sunulmuştur. Bu glikan yapıları, Kruskal-Wallis ANOVA testi ile yapılan analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı değişiklikler gösterdiği belirlenen yapılar olup, periodontal hastalıkların serum N-glikan profilleri üzerindeki etkilerini yansıtmaktadır.

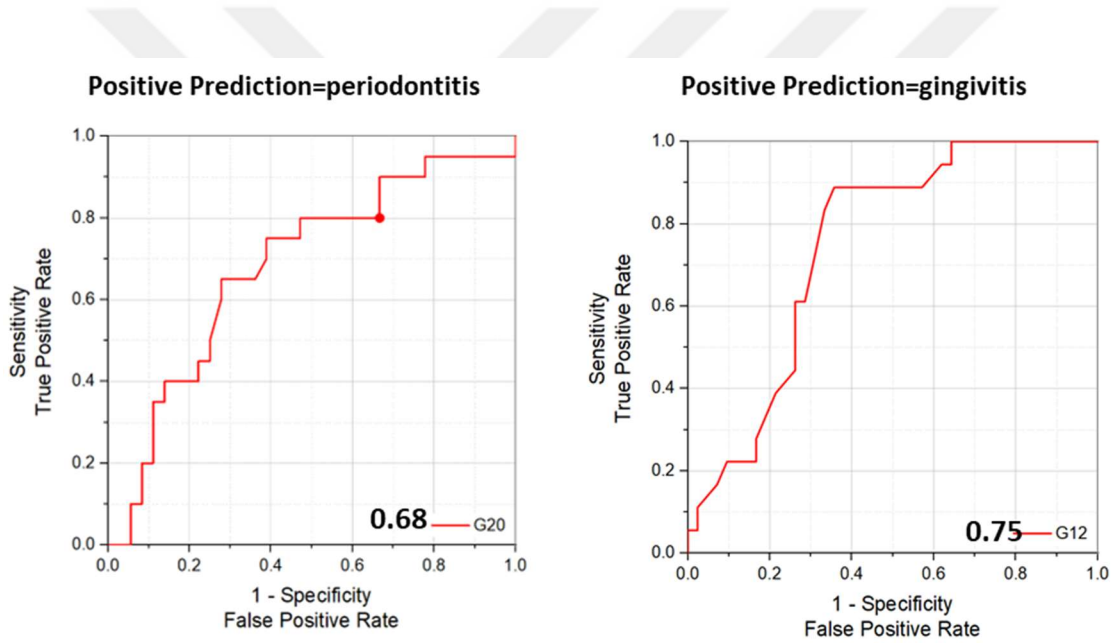
Grafiklere genel olarak bakıldığında, G6, G7, G10, G11, G12, G14 ve G17 glikanlarının periodontitis grubunda belirgin şekilde artış gösterdiği görülmektedir. Özellikle G6, G11 ve G14 glikanlarının periodontitis grubunda diğer gruplara göre daha yüksek göreceli alan yüzdelere sahip olması dikkat çekicidir. Bu artışlar, periodontal hastalığın ilerlemesiyle birlikte inflamasyon kaynaklı glikan değişimlerinin sistemik yansımalarını işaret etmektedir. G8 ve G26 glikanlarında ise periodontitis grubunda hafif bir artış gözlenmekle birlikte değişim daha sınırlı kalmıştır. Diğer yandan, G20 glikanı gingivitis grubunda daha yüksek göreceli alan yüzdelere sahipken, periodontitis grubunda bu değer azaldığı görülmektedir. Bu durum, G20 glikanının gingivitis gibi daha erken evre periodontal inflamasyon durumlarında artış gösterdiğini, hastalık ilerledikçe ise azaldığını düşündürmektedir. G26 glikanında da benzer bir eğilim gözlenmekte olup, gingivitis grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek düzeyler kaydedilmiştir.

Kruskal-Wallis ANOVA testi ile yapılan analizlerde belirlenen bu glikan yapıları, periodontal hastalıkların serum N-glikan profillerinde özgün değişikliklere yol açtığını göstermektedir.



Şekil 4.8. Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında göreceli alan yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren serum N-glikanlarına (G6, G7, G8, G10, G11, G12, G14, G17, G20 ve G26) ait kutu grafikleri.

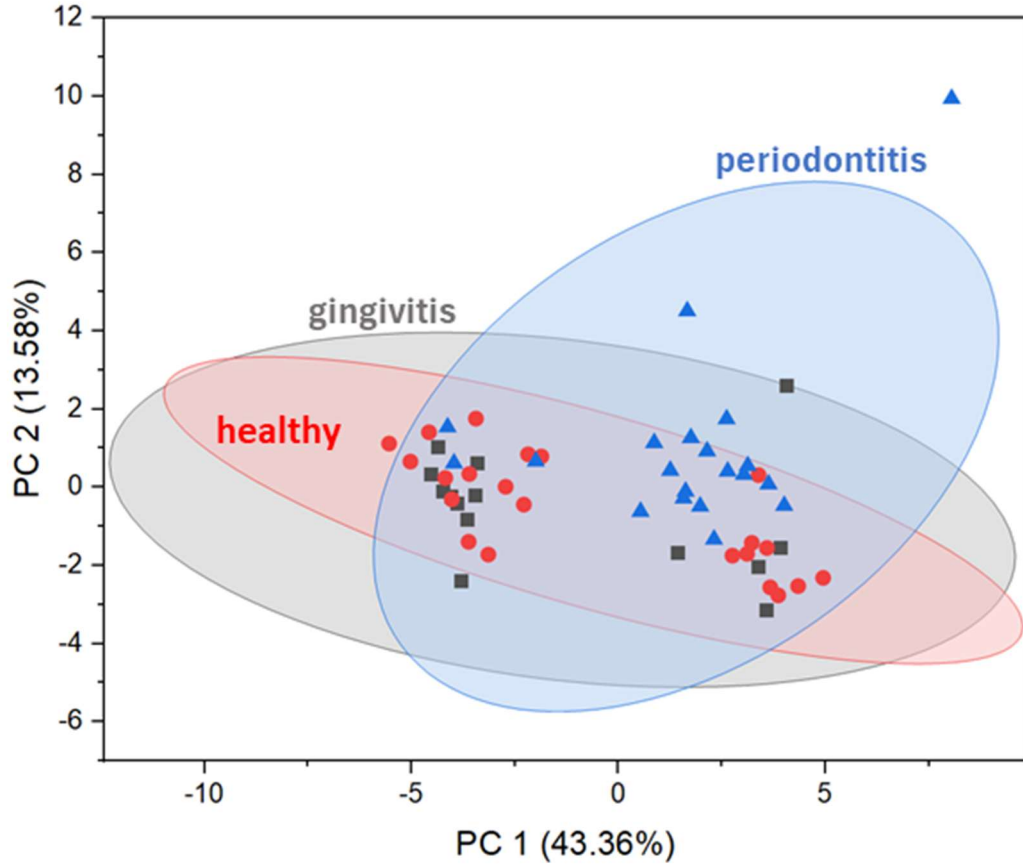
Şekil 4.9., G20 ve G12 glikanlarının periodontal hastalık gruplarını ayırt etmedeki tanısal performansları ROC (Receiver Operating Characteristic) analizleri ile gösterilmektedir. Soldaki grafik, G20 glikanı (H5N4F1S2) kullanılarak periodontitis hastalarının tanımlanmasına yönelik ROC analizini sunmaktadır. G20 glikanı için AUC (Area Under Curve) değeri 0.68 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, G20 glikanının periodontitis hastalarını ayırt etmede orta düzeyde bir doğruluk sağladığını göstermektedir. AUC değeri 0.5'in üzerinde olduğu için G20, periodontitis tanısında anlamlı bir ayırt ediciliğe sahiptir; ancak AUC'nin 0.7'nin hemen altında kalması, tanısal gücünün sınırlı olduğunu da düşündürmektedir. Bu sonuç, G20 glikanının periodontitisin biyobelirteci olabileceğini, ancak klinik uygulamalarda daha yüksek doğruluk sağlayacak ek biyobelirteçlerle desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.



Şekil 4.9. G20 ve G12 glikanlarının periodontal hastalıkların tanısındaki ayırt edicilik performanslarını gösteren ROC eğrileri.

Sağdaki grafik ise, G12 glikanı (H4N3F1S1) kullanılarak gingivitis hastalarının tanımlanmasına yönelik ROC analizini göstermektedir. G12 glikanı için hesaplanan AUC değeri 0.75 olup, bu değer gingivitis hastalarını sağlıklı bireylerden ayırmada iyi bir ayırt edicilik sağladığını göstermektedir. AUC'nin 0.75 olması, G12 glikanının gingivitis için umut verici bir biyobelirteç adayı olabileceğini ortaya koymaktadır. G12, özellikle erken periodontal inflamasyonun biyokimyasal belirlenmesinde tek başına önemli bir tanısal değere sahip olabilir.

Şekil 4.10'da, serum N-glikan profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında gerçekleştirilen temel bileşen analizi (PCA) sonuçları sunulmaktadır. Birinci temel bileşen (PC1) varyansın %43.36'sını, ikinci temel bileşen (PC2) ise %13.58'ini açıklamaktadır. Bu iki bileşen birlikte, verisetindeki toplam varyansın yaklaşık %56.94'ünü temsil etmekte olup, örneklerin büyük bir kısmının bu iki boyutta etkili bir şekilde ayrılabilmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Serum N-glikan profillerine göre periodontitis, gingivitis ve sağlıklı bireyler arasında gerçekleştirilen temel bileşen analizi (PCA) sonuçları.

PCA grafiğinde, periodontitis grubuna ait örnekler (mavi üçgenler) sağ üst bölgede belirgin bir şekilde gruplaşmıştır. Sağlıklı bireyler (kırmızı daireler) ise sol alt bölgede yoğunlaşmıştır. Gingivitis grubuna ait örnekler (gri kareler), sağlıklı ve periodontitis grupları arasında bir geçiş bölgesinde yer almakta ve daha yaygın bir dağılım göstermektedir. Periodontitis ve sağlıklı gruplar arasında net bir ayrışma gözlemlenmekte, gingivitis grubunun ise her iki gruba da kısmen yakınlık gösterdiği görülmektedir.

Elipsler her grubun varyansını ve örnek dağılımını temsil etmektedir. Periodontitis grubunun elipsi, sağlıklı ve gingivitis gruplarının elipslerinden açık bir şekilde ayrılmaktadır. Sağlıklı ve gingivitis grupları arasında ise kısmi bir örtüşme söz konusudur. Bu sonuçlar, periodontitis hastalarının serum N-glikan profillerinin sağlıklı bireylerden önemli ölçüde farklılaştığını, gingivitis bireylerinin ise ara bir örüntü sergilediğini ortaya koymaktadır. Genel olarak Şekil 4.10, serum N-glikan profillerinin periodontal hastalık durumlarına göre belirgin farklılıklar gösterdiğini ve bu moleküler profillerin, periodontal hastalıkların tanısal sınıflandırmasında potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

4.4. Tartışma

4.4.1. Yöntemlerin Seçimi

Bu çalışmada farklı biyolojik matrislerden (tükürük ve serum) elde edilen örneklerde IgG N-Glikanlarının ve serum toplam N-glikanlarının profillenmesi hedeflenmiştir. Ancak, içerik ve biyokimyasal yapı bakımından önemli farklılıklar gösterdiklerinden, analiz sürecinde çeşitli analitik zorluklar ortaya çıkmıştır. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek amacıyla, kullanılan analiz yöntemleri örnek tipine özgü olarak seçilmiş ve optimize edilmiştir.

Tükürük örnekleri, düşük IgG konsantrasyonu ve kompleks matris içeriği nedeniyle yüksek duyarlılığa sahip kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak analiz edilmiştir. MS yöntemi, yalnızca düşük miktardaki glikopeptitlerin başarıyla tespit edilmesini sağlamakla kalmamış, aynı zamanda peptit dizilimi üzerinden glikanların özgül olarak IgG'ye ait olduğunu doğrulama imkânı sunmuştur.

Buna karşılık, serum örneklerinde ise IgG miktarının daha yüksek ve stabil olması nedeniyle, glikan profillerinin görece karşılaştırmaya olanak tanıyan, tekrarlanabilir bir yöntem olan HPLC-HILIC-FLD tekniği tercih edilmiştir. Her ne kadar bu çalışmada mutlak konsantrasyon değerleri elde edilmemiş olsa da, kromatogramda elde edilen pik alanlarının birbirlerine oranlanması yoluyla görece kantitatif değerlendirme yapılmıştır. Bu yaklaşım, bireyler ve gruplar arasında glikan düzeylerindeki farklılıkların

yorumlanmasında yeterli duyarlılığı sağlamıştır. Ayrıca, mevcut literatürde serum IgG N-glikan analizlerinin çoğunlukla HPLC-HILIC-FLD ile gerçekleştirilmesi, bu çalışmanın yöntemsel tutarlılık açısından literatür ile uyumlu bir tercihtir.

Her iki yöntemin bir arada kullanılması, hem yapısal hem kantitatif açıdan zenginleştirilmiş glikan verilerinin elde edilmesini sağlayarak, periodontal hastalıkların moleküler temelli incelenmesine çok boyutlu bir yaklaşım sunmuştur.

4.4.2. Bulguların Karşılaştırılması

Yapılan analizler, serum ve tükürük örneklerindeki IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalık durumuna göre belirgin şekilde farklılaştığını göstermektedir. Kruskal–Wallis testi sonuçlarına göre hem gingivitis hem de periodontitis gruplarında belirli IgG glikan yapıların dağılımı sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar sergilemiştir ($p < .05$). Özellikle periodontitis grubunda agalaktozile IgG formlarının belirgin bir artış gösterdiği, buna karşılık galaktozlu IgG glikanlarının azaldığı saptanmıştır. Literatürde de kronik inflamatuvar hastalıklarda galaktoz eksik (hipogalaktozile) IgG glikanlarında artış olduğu ve bunun artmış inflamasyon düzeyiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir [37].

Literatürde periodontitisli bireylerin serum ve dişeti yarığı sıvısında galaktoz içermeyen IgG düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, periodontitis gibi kronik inflamatuvar bir hastalıkta IgG üreten B hücrelerinin anormal glikozilasyon yapması sonucu pro-inflamatuvar IgG izoformlarının üretilebileceğine işaret etmektedir [38]. Aynı şekilde, ileri periodontitis hastalarında IgG ağır zincirlerinde galaktoz varlığının belirgin şekilde azaldığı ve inflamasyon ilerledikçe IgG'nin hipogalaktozilyona uğradığı belirtilmiştir [39].

Sonuçlarımız periodontal hastalık şiddeti arttıkça IgG'nin N-glikan yapılarında galaktoz ve buna bağlı sialik asit içeriğinin azaldığını göstermektedir. Ayrıca, temel bileşen analizi (PCA) sonuçları da, IgG glikan profillerinin periodontal sağlık durumuna göre ayrıştığını

göstermiştir. Literatürde hastalığa özgü glikozilasyon imzalarının romatoid artrit gibi diğer inflamatuvar hastalıklarda da grupları ayırt ettiği bilinmektedir [37].

Özellikle agalaktozile IgG yüzdesinin periodontitis derecesi arttıkça yükselmesi ve bu değişimin PCA ile ayrışabilir olması, IgG glikan yapılarının periodontitis patogenezinde rol oynayabilecek dinamik bir belirteç olduğunu düşündürmektedir. Düşük galaktoz ve dolayısıyla düşük sialik asit içerikli IgG glikan profili, aktif periodontal inflamasyonun serolojik bir yansımasıdır.

4.4.3. Glikan Yapılarının Tanısal Potansiyeli

Bu çalışmada, periodontal hastalıklar özelinde tükürük IgG N-glikopeptitleri, serum IgG N-glikanları ve toplam serum N-glikanları incelenmiş; bu biyolojik sıvılardan elde edilen glikan profilleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.2’de gösterildiği üzere, yapılan analizler sonucunda, AUC (Area Under Curve) değerleri 0.61 ile 0.79 arasında değişen beş glikan yapısı, potansiyel biyobelirteç olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Potansiyel biyobelirteçler ve AUC değerleri ile hastalığa ait tanısal performansları

	Periodontitis	Gingivitis
H3N5F1 (Serum IgG N-Glikan)		AUC 0.65
H5N4 (Serum IgG N-Glikan)		AUC 0.61
H5N4F1 (Serum IgG N-Glikan)	AUC 0.68	
H4N3F1S1 (G12 – Serum Toplam N-Glikan)		AUC 0.75
H5N4F1S2 (G20 - Serum Toplam N-Glikan)	AUC 0.68	
IgG1-H4N5F1 (Tükürük IgG N-Glikopeptit)		AUC 0.79

Bu glikan yapılarının ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) değerleri, testlerin hastalıklı ve sağlıklı bireyleri ne kadar doğru ayırt edebildiğini gösteren temel bir metriktir. AUC değeri 1'e yaklaştıkça testin tanısal ayırt ediciliği artmakta, 0.5'e yaklaştıkça ise testin ayırt edicilik gücü azalmaktadır. Bu çalışmada tespit edilen glikanlardan bazılarının AUC değeri 0.75'in üzerinde bulunarak anlamlı bir tanısal ayırt edicilik sınıfında yer almıştır. Bu değerler, söz konusu glikan yapılarının klinik olarak anlamlı bir ayırım yapabildiğini göstermektedir.

Elde ettiğimiz bulgular, IgG N-glikan profilindeki değişimlerin periodontal hastalıkların tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. ROC analizleri, belirli glikan yapı kombinasyonlarının ayırıcı güce sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nitekim güncel literatürde, IgG N-glikanlarının çeşitli hastalık gruplarını sağlıklı bireylerden yüksek duyarlılıkla ayırabildiği bildirilmektedir [37].

Bu bulgular periodontal hastalığa özgü IgG glikan değişimlerinin tanısal değerine işaret etmektedir. Ancak, IgG glikanlarındaki hipogalaktozilasyon diğer inflamatuvar hastalıklarda da gözleendiği için özgüllük sorunları yaşanabilir. Dolayısıyla IgG glikan biyobelirteçlerinin, periodontal hastalığa özgü olduğunu göstermek için diğer klinik parametrelerle birlikte değerlendirilmesi gereklidir.

Bununla birlikte çalışmamızın avantajı, glikan değişimlerinin hem serum hem de tükürük örneklerinde tutarlı olarak gözlemlenmiş olmasıdır. Bu durum, lokal inflamasyonun da glikozilasyon desenini etkilediğini düşündürmektedir. Ayrıca IgG glikanlarının sadece tanıda değil, hastalık aktivitesini izleme ve tedavi yanıtını değerlendirme süreçlerinde de potansiyel taşıdığı literatürde belirtilmektedir [7].

Periodontal hastalıkların tanısında tükürük gibi non-invaziv biyolojik örneklerin kullanımı giderek önem kazanmaktadır. Çalışmamızda serumun yanı sıra tükürük örnekleri de değerlendirilmiş ve periodontitisli bireylerin tükürüğünde agalaktozile IgG glikanlarının arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, literatürde tükürükten izole edilen IgG N-glikanlarının inflamatuvar süreçleri yansıttığına dair sonuçlarla uyumludur [39].

Özellikle, literatürde periodontitisli bireylerin dişeti dokusunda galaktozdan yoksun IgG moleküllerinin biriktiği gösterilmiştir [38]. Çalışmamızda da, tükürük IgG'sindeki glikozilasyon değişimlerinin periodontal hastalıkla paralellik gösterdiği saptanmıştır.

Tükürük örnekleri, kolay ve invaziv olmayan bir biyolojik örnek sağlması nedeniyle klinik uygulamalarda avantaj sunmaktadır [40]. Tükürük IgG'sinin serum IgG'sine göre düşük galaktoz ve sialik asit içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir [7]. Ancak periodontal inflamasyon durumlarında bu glikozilasyon desenindeki değişimler daha da belirginleşmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalık varlığını ve şiddetini yansıtmakta etkili olabileceğini ve tükürük örneklerinin non-invaziv tanısal yaklaşımlar için uygun bir kaynak sunduğunu ortaya koymuştur.

5. YORUM

Bu tez çalışmasında, serum ve tükürük örneklerinden izole edilen IgG moleküllerinin N-bağlantılı (N-glikan) profilleri detaylı bir şekilde karakterize edilerek periodontal hastalıklarla ilişkili biyobelirteç potansiyelleri araştırılmıştır. Serum örnekleri HPLC-HILIC-FLD sistemi ile, tükürük örnekleri ise nLC-QTOF-MS/MS sistemi ile analiz edilmiş ve elde edilen glikan profilleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada, periodontitis ve gingivitis gibi farklı periodontal hastalık durumlarının IgG N-glikan yapılarında anlamlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Serum IgG N-glikan profillerinde, özellikle galaktoz içermeyen agalaktozile glikan formlarının periodontitis grubunda anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde tükürük örneklerinde de, hastalık ilerledikçe IgG glikan profillerinde belirgin değişimler gözlenmiştir. Yapılan Kruskal-Wallis ANOVA testleri, hem serum hem de tükürük glikanlarında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ayrıca ROC analizleri, belirli glikan yapıların periodontal hastalık tanısında orta-yüksek düzeyde ayırt edicilik sağladığını göstermiştir.

Temel bileşen analizi (PCA) sonuçları, glikan profilleri üzerinden sağlıklı bireyler ile gingivitis ve periodontitis hastalarının belirli düzeylerde ayrılabilmesini ortaya koymuştur. Serum ve tükürükten elde edilen IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalık varlığını ve şiddetini yansıttığı belirlenmiş, özellikle periodontitisin ilerlemesiyle glikan desenlerinde sistematik kaymalar meydana geldiği gösterilmiştir.

Literatür ile karşılaştırıldığında, bu çalışma sonuçları mevcut bilgilerle yüksek düzeyde uyum sağlamaktadır. Kronik inflamatuvar hastalıklarda IgG glikozilasyonundaki değişimler daha önce çeşitli hastalık modellerinde raporlanmıştır. Periodontitis özelinde, galaktoz eksikliği ve artan agalaktozile glikanların inflamatuvar yanıtla ilişkili olduğu ve hastalığın ilerlemesiyle bu değişimlerin daha belirgin hale geldiği bilinmektedir. Özellikle tükürük IgG glikopeptitlerinin değerlendirilmesi, literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmakta ve periodontal hastalıkların kolay, hızlı ve hasta dostu bir şekilde

izlenebilmesi açısından non-invaziv biyobelirteç arayışlarına önemli bir katkı sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, serum ve tükürük IgG N-glikan profillerinin periodontal hastalıkların tanı ve izlenmesinde potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Elde edilen veriler, periodontal hastalıkların erken teşhisi ve hastalık ilerleyişinin takibi için glikan bazlı yeni nesil tanı yaklaşımlarının geliştirilmesine ışık tutmaktadır. İlerleyen çalışmalarla, bu biyobelirteçlerin klinik uygulamalarda doğrulanması ve kullanıma sunulması mümkün olabilecektir.

Bu çalışma periodontal hastalıklarla ilişkili IgG N-glikan değişimlerini ortaya koymuş olsa da elde edilen bulguların daha geniş klinik uygulamalara aktarılabilmesi için aşağıdaki öneriler sunulabilir:

- Çalışmanın, daha büyük ve farklı yaş gruplarını içeren kohortlarda tekrarlanması, elde edilen bulguların genellenebilirliğini artıracaktır.
- IgG N-glikan profillerinin hastalık aktivitesi ve tedaviye yanıt süreçlerinde nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla longitudinal (takip) çalışmalar yapılmalıdır.
- Farklı periodontal hastalık evrelerini (başlangıç gingivitis, hafif, orta ve ileri periodontitis) daha ayrıntılı şekilde sınıflandırarak glikan profillerinin hastalık progresyonu üzerindeki dinamik değişimleri incelenmelidir.
- Tükürük örneklerinde IgG dışındaki diğer glikoproteinlerin (örneğin laktoferrin, sekretuar IgA) glikan profilleri de incelenerek, periodontal hastalıkların daha kapsamlı bir biyobelirteç paneli ile değerlendirilmesi sağlanabilir.
- Tükürük ve serum glikan profillerinin kombinasyonu ile tanısal doğruluk artırılabilir; bu nedenle çok parametrelili biyobelirteç modelleri üzerinde çalışılmalıdır.

Bu öneriler doğrultusunda yapılacak ileri araştırmalar, periodontal hastalıkların daha erken dönemde tanınması ve hastalık şiddetinin daha hassas bir şekilde izlenmesi için yeni nesil tanısal yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018 Jun 1;45:S44–67.
- [2] Tsitaishvili L, Kalandadze M, Margvelashvili V. Periodontal Diseases among the Adult Population of Georgia and the Impact of Socio-behavioral Factors on Their Prevalence [Internet]. Vol. 44, *Iran J Public Health*. 2015. Available from: <http://ijph.tums.ac.ir>
- [3] Albandar JM, Brown LJ, L e H. Clinical features of early-onset periodontitis. *Journal of the American Dental Association*. 1997;128(10):1393–9.
- [4] Papanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018 Jun 1;89:S173–82.
- [5] Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*. 2018 Jun 1;89:S159–72.
- [6] Zhao Z, Sun X, Cao L, Zhu C, He K, Hu X, et al. Salivary Proteome and Intact N-Glycopeptides Analysis Reveal Specific Signatures in Periodontitis. *Journal of Proteome Research*. 2024;23(1):25–39.
- [7] Plomp R, de Haan N, Bondt A, Murli J, Dotz V, Wuhrer M. Comparative glycomics of immunoglobulin A and G from saliva and plasma reveals biomarker potential. *Frontiers in Immunology*. 2018 Oct 23;9(OCT).
- [8] Kayili HM, Salih B. N-glycan profiling of glycoproteins by hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Journal of Visualized Experiments*. 2021 Sep 1;2021(175).
- [9] Qin Y, Zhong Y, Zhu M, Dang L, Yu H, Chen Z, et al. Age- and sex-associated differences in the glycopatterns of human salivary glycoproteins and their roles against influenza A virus. *Journal of Proteome Research*. 2013 Jun 7;12(6):2742–54.
- [10] Gebri E, Kovács Z, Mészáros B, Tóth F, Simon Á, Jankovics H, et al. N-glycosylation alteration of serum and salivary immunoglobulin a is a possible biomarker in oral mucositis. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Jun 1;9(6):1–14.
- [11] Gonçalves LDR, Soares MR, Nogueira FCS, Garcia CHS, Camisasca DR, Domont G, et al. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *Journal of Periodontal Research*. 2011 Oct;46(5):599–606.
- [12] Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004;9–21.
- [13] Bertoldi C, Lalla M, Pradelli JM, Cortellini P, Lucchi A, Zaffe D. Risk factors and socioeconomic condition effects on periodontal and dental health: A pilot study among adults over fifty years of age. *European Journal of Dentistry*. 2013;7(3):336–46.

- [14] Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 2003;31(s1):3–24.
- [15] Amato M, Lupi SM, Polizzi A, Santonocito S, Viglianisi G, Cicciù M, et al. New Trends in the Impact of Periodontal Treatment on Early Cardiovascular Diseases Outcomes: Insights and Future Perspectives. Vol. 24, *Reviews in Cardiovascular Medicine*. IMR Press Limited; 2023.
- [16] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. Vol. 44, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2005. p. 7342–72.
- [17] Stanley P. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011 Apr;3(4):1–13.
- [18] Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. Vol. 126, *Cell*. Elsevier B.V.; 2006. p. 855–67.
- [19] Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. Vol. 5, *Nature Reviews Cancer*. 2005. p. 526–42.
- [20] Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation - Potential for therapeutics and diagnostics. Vol. 4, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005. p. 477–88.
- [21] Kornfeld, R, Kornfeld, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*. 1985. 54(1), pp.631–664.
- [22] Keys TG, Aebi M. Engineering protein glycosylation in prokaryotes. Vol. 5, *Current Opinion in Systems Biology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 23–31.
- [23] Shivatare SS, Chang SH, Tsai TI, Ren CT, Chuang HY, Hsu L, et al. Efficient convergent synthesis of Bi-, Tri-, and tetra-antennary complex type N-glycans and their HIV-1 antigenicity. *Journal of the American Chemical Society*. 2013 Oct 16;135(41):15382–91.
- [24] Balzarini J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. Vol. 71, *Antiviral Research*. 2006. p. 237–47.
- [25] Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of Immunology*. 1985 Oct 1;135(4):2589–92.
- [26] Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2):41–52.
- [27] Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Design, Development and Therapy*. 2009. p 7-16.
- [28] Finlay W. Soliris (Eculizumab): Discovery and Development. *Royal Society of Chemistry*. 2014. p. 419–39.
- [29] Rispens T, Vidarsson G. Human IgG Subclasses. In: *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*. Elsevier Inc.; 2013. p. 159–77.
- [30] Cummings RD, Pierce JM. The challenge and promise of glycomics. Vol. 21, *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd; 2014. p. 1–15.
- [31] Shriver Z, Raguram S, Sasisekharan R. Glycomics: A pathway to a class of new and improved therapeutics. Vol. 3, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004. p. 863–73.

- [32] Turnbull JE, Field RA. Emerging glycomics technologies. *Nature Chemical Biology*. 2007 Feb 1;3(2):74-7
- [33] Zaia J. *Mass Spectrometry and the Emerging Field of Glycomics*. Vol. 15, *Chemistry and Biology*. 2008. p. 881–92.
- [34] Freeze HH, Kranz C. Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current Protocols in Immunology*. 2008;83(1):8.15.1-8.15.26.
- [35] Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. Vol. 89, *Journal of periodontology*. NLM (Medline); 2018. p. S9–16.
- [36] Önder C, Akdoğan N, Kurgan Ş, Balci N, Serdar CC, Serdar MA, et al. Does smoking influence tryptophan metabolism in periodontal inflammation? A cross-sectional study. *Journal of Periodontal Research*. 2023 Oct 1;58(5):1041–51.
- [37] Haslund-Gourley BS, Wigdahl B, Comunale MA. IgG N-glycan Signatures as Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers. Vol. 13, *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
- [38] Novak J, Tomana M, Shah GR, Brown R, Mestecky J. Heterogeneity of IgG Glycosylation in Adult Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*. 2005;84(10):897–901.
- [39] Stefanovic G, Ciric D, Ilic V, Brajovic G, Petrovic S, Milosevic D, et al. Hypogalactosylation of immunoglobulin G (IgG) of gingival fluid and saliva at the patient with periodontal disease. *Stomatoloski glasnik Srbije*. 2006;53(1):7–16.
- [40] Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. Vol. 6, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. Elsevier B.V.; 2016. p. 67–76.

EKLER

EK 1 - Gingivitis, periodontitis ve sağlıklı grupları arasında serum IgG N-glikanlarının göreceli alan yüzdelere ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir).

		Min	Q1	Median	Q3	Max	Mean Rank	Sum Rank		Mean Rank Diff	Z	Prob	Sig
H3N4	gingivitis	0.00	0.13	0.30	0.44	1.28	27.50	522.50	gingivitis healthy	-1.70455	-0.31689	1	0
H3N4	healthy	0.07	0.20	0.31	0.41	1.19	29.20	642.50	gingivitis periodontitis	-6.11111	-1.08178	0.83805	0
H3N4	periodontitis	0.02	0.14	0.39	0.65	1.22	33.61	605.00	healthy periodontitis	-4.40657	-0.80728	1	0
H3N4F1	gingivitis	12.80	16.87	20.02	25.64	42.19	31.89	606.00	gingivitis healthy	10.89474	2.02536	0.12849	0
H3N4F1	healthy	11.78	14.57	17.20	21.53	25.39	21.00	462.00	gingivitis periodontitis	-7.10526	-1.25771	0.62549	0
H3N4F1	periodontitis	13.03	18.64	25.15	29.53	33.59	39.00	702.00	healthy periodontitis	-18	-3.29746	0.00293	1
H5N2	gingivitis	0.01	0.28	0.46	0.78	1.71	30.61	581.50	gingivitis healthy	-1.91746	-0.35648	1	0
H5N2	healthy	0.16	0.35	0.55	0.68	1.42	32.52	715.50	gingivitis periodontitis	4.32749	0.76606	1	0
H5N2	periodontitis	0.06	0.21	0.37	0.74	0.89	26.28	473.00	healthy periodontitis	6.24495	1.14409	0.75776	0
H3N5F1	gingivitis	1.42	2.92	3.21	4.38	10.19	23.95	455.00	gingivitis healthy	-1.32536	-0.24639	1	0
H3N5F1	healthy	2.45	2.99	3.74	4.42	6.31	25.27	556.00	gingivitis periodontitis	-18.2193	-3.22502	0.00378	1
H3N5F1	periodontitis	2.98	4.60	5.34	6.78	8.83	42.17	759.00	healthy periodontitis	-16.89394	-3.09484	0.00591	1
H4N4	gingivitis	0.01	0.04	0.15	0.22	0.63	23.79	452.00	gingivitis healthy	-6.16507	-1.14624	0.75509	0
H4N4	healthy	0.05	0.11	0.18	0.28	0.48	29.95	659.00	gingivitis periodontitis	-12.82164	-2.26984	0.06965	0
H4N4	periodontitis	0.00	0.10	0.26	0.41	0.69	36.61	659.00	healthy periodontitis	-6.65657	-1.21957	0.66788	0
H4N4F1a	gingivitis	14.87	18.67	20.43	22.06	25.30	34.39	653.50	gingivitis healthy	7.69019	1.42965	0.45846	0
H4N4F1a	healthy	14.74	17.76	19.34	20.53	24.08	26.70	587.50	gingivitis periodontitis	5.00585	0.8861	1	0
H4N4F1a	periodontitis	16.11	18.42	19.34	21.06	22.90	29.39	529.00	healthy periodontitis	-2.68434	-0.49176	1	0
H4N4F1b	gingivitis	8.03	8.37	9.36	9.95	11.81	28.42	540.00	gingivitis healthy	-4.26077	-0.7921	1	0
H4N4F1b	healthy	6.67	8.36	9.76	10.60	12.07	32.68	719.00	gingivitis periodontitis	0.03216	0.00569	1	0

H4N4F1b	periodontitis	6.90	8.23	9.51	10.25	11.37	28.39	511.00	healthy periodontitis	4.29293	0.78644	1	0
H4N5F1a	gingivitis	1.31	2.90	3.77	4.68	6.05	25.47	484.00	gingivitis healthy	-3.75359	-0.6978	1	0
H4N5F1a	healthy	2.05	3.03	4.21	4.63	6.20	29.23	643.00	gingivitis periodontitis	-10.24854	-1.81411	0.20898	0
H4N5F1a	periodontitis	2.71	3.85	4.33	5.51	6.59	35.72	643.00	healthy periodontitis	-6.49495	-1.18982	0.70235	0
H4N5F1b	gingivitis	0.00	0.24	0.33	0.53	0.71	26.08	495.50	gingivitis healthy	-7.94378	-1.47683	0.41916	0
H4N5F1b	healthy	0.11	0.33	0.48	0.61	0.85	34.02	748.50	gingivitis periodontitis	-3.14327	-0.55642	1	0
H4N5F1b	periodontitis	0.12	0.30	0.40	0.51	0.68	29.22	526.00	healthy periodontitis	4.80051	0.87945	1	0
H5N4	gingivitis	0.16	0.30	0.61	0.99	1.96	25.21	479.00	gingivitis healthy	-13.69856	-2.54663	0.03263	1
H5N4	healthy	0.31	0.65	1.09	1.44	2.18	38.91	856.00	gingivitis periodontitis	1.04386	0.18478	1	0
H5N4	periodontitis	0.17	0.33	0.60	0.81	1.75	24.17	435.00	healthy periodontitis	14.74242	2.70073	0.02076	1
H5N4F1	gingivitis	7.10	12.82	17.43	18.06	20.83	28.53	542.00	gingivitis healthy	-8.88278	-1.65133	0.29601	0
H5N4F1	healthy	12.99	15.89	17.79	20.20	24.79	37.41	823.00	gingivitis periodontitis	6.02632	1.06673	0.85829	0
H5N4F1	periodontitis	9.56	10.96	14.27	17.24	21.36	22.50	405.00	healthy periodontitis	14.90909	2.73123	0.01893	1
H5N5F1	gingivitis	0.95	1.45	1.62	2.12	3.45	25.63	487.00	gingivitis healthy	-10.57297	-1.96566	0.14802	0
H5N5F1	healthy	1.54	1.67	1.94	2.32	3.59	36.20	796.50	gingivitis periodontitis	-1.3962	-0.24716	1	0
H5N5F1	periodontitis	0.11	1.18	1.83	2.22	2.51	27.03	486.50	healthy periodontitis	9.17677	1.68121	0.27817	0
H4N4F1S1	gingivitis	1.32	1.80	2.26	2.57	2.97	28.42	540.00	gingivitis healthy	-3.16986	-0.5893	1	0
H4N4F1S1	healthy	1.71	1.98	2.27	2.85	3.28	31.59	695.00	gingivitis periodontitis	-1.30117	-0.23033	1	0
H4N4F1S1	periodontitis	0.39	1.88	2.27	2.61	3.96	29.72	535.00	healthy periodontitis	1.86869	0.34234	1	0
H5N4S1	gingivitis	0.12	0.33	0.74	1.93	6.33	28.29	537.50	gingivitis healthy	-5.55144	-1.03204	0.90616	0
H5N4S1	healthy	0.25	0.63	1.08	2.40	4.61	33.84	744.50	gingivitis periodontitis	1.17836	0.20859	1	0
H5N4S1	periodontitis	0.14	0.38	0.79	1.35	2.06	27.11	488.00	healthy periodontitis	6.7298	1.23286	0.65288	0
H5N4F1S1	gingivitis	3.67	8.16	9.62	12.46	13.64	26.68	507.00	gingivitis healthy	-9.81579	-1.82478	0.2041	0
H5N4F1S1	healthy	5.84	10.13	10.98	13.15	15.21	36.50	803.00	gingivitis periodontitis	1.12865	0.19978	1	0
H5N4F1S1	periodontitis	4.78	6.71	9.38	12.10	16.15	25.56	460.00	healthy periodontitis	10.94444	2.00494	0.13491	0
H5N5F1S1	gingivitis	0.62	0.83	1.75	2.17	3.23	29.66	563.50	gingivitis healthy	-2.86483	-0.5326	1	0
H5N5F1S1	healthy	0.78	1.35	1.65	2.25	3.30	32.52	715.50	gingivitis periodontitis	2.38012	0.42132	1	0

H5N5F1S1	periodontitis	0.26	0.88	1.39	2.62	4.22	27.28	491.00	healthy periodontitis	5.24495	0.96086	1	0
H5N4S2	gingivitis	0.03	0.39	1.81	4.30	13.88	32.55	618.50	gingivitis healthy	1.25718	0.23372	1	0
H5N4S2	healthy	0.18	0.65	1.00	4.30	10.89	31.30	688.50	gingivitis periodontitis	6.83041	1.20908	0.6799	0
H5N4S2	periodontitis	0.25	0.57	0.84	1.64	5.43	25.72	463.00	healthy periodontitis	5.57323	1.02099	0.92178	0
H5N4F1S2	gingivitis	0.32	1.10	1.51	1.97	2.90	31.18	592.50	gingivitis healthy	-2.33852	-0.43474	1	0
H5N4F1S2	healthy	0.53	1.17	1.54	2.25	4.04	33.52	737.50	gingivitis periodontitis	6.73977	1.19303	0.69857	0
H5N4F1S2	periodontitis	0.05	0.52	1.07	1.78	2.41	24.44	440.00	healthy periodontitis	9.07828	1.66309	0.28888	0
H5N5F1S2	gingivitis	0.28	0.69	0.92	1.14	1.54	27.08	514.50	gingivitis healthy	-6.17105	-1.14726	0.75382	0
H5N5F1S2	healthy	0.35	0.80	0.96	1.24	2.19	33.25	731.50	gingivitis periodontitis	-2.03216	-0.35973	1	0
H5N5F1S2	periodontitis	0.25	0.65	0.87	1.69	1.83	29.11	524.00	healthy periodontitis	4.13889	0.75824	1	0

EK 2 - Gingivitis, periodontitis ve sağlıklı grupları arasında tükürük IgG N-glikanlarının göreceli alan yüzdelere ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir).

		Min	Q1	Median	Q3	Max		Mean Rank Diff	Z	Prob	Sign
IgG11H3N4F1	gingivitis	4.81	5.48	6.34	7.76	8.75	gingivitis healthy	-7.87143	-1.54969	0.36365	0
IgG11H3N4F1	healthy	5.15	6.40	7.63	9.00	11.05	gingivitis periodontitis	-9.74444	-2.01394	0.13205	0
IgG11H3N4F1	periodontitis	5.45	6.65	7.53	9.72	12.93	healthy periodontitis	-1.87302	-0.42845	1	0
IgG11H3N5F1	gingivitis	4.87	7.07	8.74	9.46	10.83	gingivitis healthy	17.31429	3.40875	0.00196	1
IgG11H3N5F1	healthy	4.76	5.05	5.69	6.04	7.21	gingivitis periodontitis	8.93333	1.8463	0.19455	0
IgG11H3N5F1	periodontitis	5.27	5.58	6.47	7.26	8.74	healthy periodontitis	-8.38095	-1.91712	0.16567	0
IgG11H4N3F1	gingivitis	4.23	4.48	4.90	5.18	6.28	gingivitis healthy	-15.1	-2.97281	0.00885	1
IgG11H4N3F1	healthy	4.63	5.27	5.95	6.48	7.05	gingivitis periodontitis	-7.15556	-1.47888	0.41752	0
IgG11H4N3F1	periodontitis	4.53	4.76	5.31	5.90	25.73	healthy periodontitis	7.94444	1.81727	0.20753	0
IgG11H4N4	gingivitis	4.38	4.70	5.10	5.71	5.75	gingivitis healthy	-11.6286	-2.28937	0.06617	0
IgG11H4N4	healthy	4.86	5.18	5.57	6.54	7.59	gingivitis periodontitis	-8.92222	-1.844	0.19555	0
IgG11H4N4	periodontitis	4.91	5.21	5.50	5.88	6.80	healthy periodontitis	2.70635	0.61907	1	0
IgG11H4N4F1	gingivitis	4.53	4.70	6.03	6.79	8.62	gingivitis healthy	-7.14286	-1.40625	0.47895	0
IgG11H4N4F1	healthy	5.10	5.64	6.51	8.46	12.89	gingivitis periodontitis	-6.11111	-1.26302	0.61975	0

IgG11H4N4F1	periodontitis	4.73	5.92	6.17	7.90	11.65	healthy periodontitis	1.03175	0.23601	1	0
IgG11H4N4F1S 1	gingivitis	4.05	4.17	4.39	4.63	5.08	gingivitis healthy	4.55714	0.89719	1	0
IgG11H4N4F1S 1	healthy	3.23	3.84	4.18	4.99	6.56	gingivitis periodontitis	1.58889	0.32838	1	0
IgG11H4N4F1S 1	periodontitis	3.84	4.07	4.25	5.10	13.62	healthy periodontitis	-2.96825	-0.67898	1	0
IgG11H4N5	gingivitis	14.23	14.99	15.88	18.04	20.13	gingivitis healthy	-2.92857	-0.57656	1	0
IgG11H4N5	healthy	11.54	14.75	16.73	19.06	22.67	gingivitis periodontitis	3.44444	0.71188	1	0
IgG11H4N5	periodontitis	4.14	11.12	15.13	19.03	20.58	healthy periodontitis	6.37302	1.45781	0.43468	0
IgG11H4N5F1	gingivitis	4.29	4.41	4.50	4.76	5.52	gingivitis healthy	-8.15714	-1.60594	0.32486	0
IgG11H4N5F1	healthy	4.21	4.46	4.90	5.68	7.09	gingivitis periodontitis	-13.0222	-2.69137	0.02135	1
IgG11H4N5F1	periodontitis	4.36	4.70	5.01	5.63	8.05	healthy periodontitis	-4.86508	-1.11288	0.79728	0
IgG11H5N4	gingivitis	6.08	6.26	7.06	8.37	10.72	gingivitis healthy	-4.32857	-0.85219	1	0
IgG11H5N4	healthy	5.93	6.78	7.45	8.40	11.81	gingivitis periodontitis	3.6	0.74403	1	0
IgG11H5N4	periodontitis	5.61	6.09	6.67	7.65	8.54	healthy periodontitis	7.92857	1.81364	0.2092	0
IgG11H5N4F1	gingivitis	5.02	5.20	5.44	5.66	6.25	gingivitis healthy	-8.58571	-1.69031	0.27291	0
IgG11H5N4F1	healthy	5.15	5.42	5.63	6.09	8.35	gingivitis periodontitis	-4.52222	-0.93463	1	0
IgG11H5N4F1	periodontitis	5.25	5.38	5.47	5.74	6.59	healthy periodontitis	4.06349	0.92952	1	0
IgG11H5N4F1S 1	gingivitis	16.96	19.64	23.61	24.30	26.44	gingivitis healthy	11.1857 1	2.20219	0.08296	0
IgG11H5N4F1S 1	healthy	8.68	17.61	19.30	21.57	24.75	gingivitis periodontitis	8.56667	1.77052	0.22992	0

IgGI1H5N4F1S 1	periodontitis	11.97	15.99	21.12	23.08	29.83	healthy periodontitis	-2.61905	-0.5991	1	0
IgGI1H5N4F1S 2	gingivitis	3.87	4.02	4.24	4.37	4.40	gingivitis healthy	5	0.98437	0.97479	0
IgGI1H5N4F1S 2	healthy	3.49	3.97	4.07	4.27	4.37	gingivitis periodontitis	-6.22222	-1.28598	0.59535	0
IgGI1H5N4F1S 2	periodontitis	3.71	4.12	4.35	4.75	4.92	healthy periodontitis	-11.2222	-2.56706	0.03077	1
IgGI1H5N5F1	gingivitis	3.80	3.90	4.08	4.22	4.50	gingivitis healthy	-6.94286	-1.36687	0.51499	0
IgGI1H5N5F1	healthy	3.27	3.77	4.46	4.91	5.51	gingivitis periodontitis	-5.8	-1.19872	0.69191	0
IgGI1H5N5F1	periodontitis	3.81	4.02	4.23	4.60	6.02	healthy periodontitis	1.14286	0.26143	1	0

EK 3 - Gingivitis, sağlıklı bireyler ve periodontitis grupları arasında serum N-glikanlarının göreceli alan yüzdelere ilişkin Kruskal-Wallis ANOVA testi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren N-glikan yapıları koyu renk ile belirtilmiştir (p < 0.05 anlamlı kabul edilmiştir).

		Min	Q1	Median	Q3	Max		Sum Rank	Mean Rank Diff	Z	Prob	Sig
G1	gingivitis	0.94	1.53	3.55	8.31	15.71	gingivitis healthy	554.5	4.16919	0.75116	1	0
G1	healthy	0.51	1.26	1.96	6.91	10.12	gingivitis periodontitis	586	-3.66944	-0.64673	1	0
G1	periodontitis	0.87	3.35	4.66	7.25	9.82	healthy periodontitis	689.5	-7.83864	-1.4528	0.43884	0
G2	gingivitis	1.04	1.27	1.90	3.01	6.49	gingivitis healthy	548	4.46717	0.80495	1	0
G2	healthy	0.92	1.16	1.40	2.89	4.52	gingivitis periodontitis	571.5	-5.08056	-0.89554	1	0

G2	periodontitis	0.99	1.63	2.49	2.95	4.55	healthy periodontitis	710.5	-9.54773	-1.76978	0.23029	0
G3	gingivitis	0.89	1.62	3.48	6.03	8.23	gingivitis healthy	557	2.21717	0.39947	1	0
G3	healthy	0.82	1.50	2.25	6.30	7.09	gingivitis periodontitis	632	-1.10556	-0.19485	1	0
G3	periodontitis	1.13	2.82	4.45	5.04	6.01	healthy periodontitis	641	-3.32273	-0.61584	1	0
G4	gingivitis	0.34	0.63	1.64	3.29	4.08	gingivitis healthy	513.5	-1.51768	-0.27344	1	0
G4	healthy	0.30	0.74	1.23	3.79	5.68	gingivitis periodontitis	661	-4.24722	-0.74857	1	0
G4	periodontitis	0.30	1.46	2.34	2.78	3.81	healthy periodontitis	655.5	-2.72955	-0.50589	1	0
G5	gingivitis	0.19	0.45	1.07	2.23	2.99	gingivitis healthy	483.5	-1.79798	-0.32396	1	0
G5	healthy	0.30	0.52	0.84	2.34	3.08	gingivitis periodontitis	630.5	-8.93889	-1.57554	0.3454	0
G5	periodontitis	0.55	1.16	1.63	2.13	3.35	healthy periodontitis	716	-7.14091	-1.32355	0.55695	0
G6	gingivitis	0.76	1.03	1.41	1.73	2.02	gingivitis healthy	423.5	-3.42677	-0.6175	1	0
G6	healthy	0.83	1.13	1.37	2.04	2.16	gingivitis periodontitis	593	-17.1472	-3.02265	0.00752	1
G6	periodontitis	0.83	1.57	1.88	2.25	3.47	healthy periodontitis	813.5	-13.7205	-2.54334	0.03294	1
G7	gingivitis	0.91	1.22	1.27	1.52	2.81	gingivitis healthy	461.5	-0.31566	-0.05688	1	0
G7	healthy	0.96	1.11	1.38	1.60	1.82	gingivitis periodontitis	571	-14.2361	-2.50959	0.03626	1
G7	periodontitis	0.85	1.47	1.61	1.79	4.40	healthy periodontitis	797.5	-13.9205	-2.58052	0.0296	1

G8	gingivitis	0.05	0.19	0.24	0.39	0.47	gingivitis healthy	377	-9.21465	-1.66144	0.28988	0
G8	healthy	0.12	0.23	0.30	0.49	0.75	gingivitis periodontitis	663.5	-18.5306	-3.26841	0.00324	1
G8	periodontitis	0.14	0.30	0.47	0.54	1.74	healthy periodontitis	789.5	-9.31591	-1.72789	0.25203	0
G9	gingivitis	1.46	2.05	3.14	4.95	8.10	gingivitis healthy	500	-2.76768	-0.49866	1	0
G9	healthy	1.35	2.27	3.30	6.03	7.38	gingivitis periodontitis	672	-5.12222	-0.90279	1	0
G9	periodontitis	2.04	2.61	4.46	5.19	5.96	healthy periodontitis	658	-2.35455	-0.43639	1	0
G10	gingivitis	0.53	0.79	0.95	1.51	2.24	gingivitis healthy	419.5	-6.92172	-1.24723	0.63694	0
G10	healthy	0.69	0.92	1.21	1.71	2.85	gingivitis periodontitis	665	-13.9694	-2.46238	0.04141	1
G10	periodontitis	0.52	1.25	1.41	2.03	2.98	healthy periodontitis	745.5	-7.04773	-1.30637	0.57428	0
G11	gingivitis	0.60	0.83	1.01	1.13	1.85	gingivitis healthy	455.5	1.73737	0.31322	1	0
G11	healthy	0.69	0.84	0.94	1.13	1.83	gingivitis periodontitis	518.5	-17.4944	-3.08531	0.0061	1
G11	periodontitis	0.84	1.05	1.42	1.59	2.56	healthy periodontitis	856	-19.2318	-3.56666	0.00108	1
G12	gingivitis	0.00	0.16	0.28	0.31	0.45	gingivitis healthy	362	-7.34343	-1.32363	0.55688	0
G12	healthy	0.03	0.15	0.32	0.42	0.52	gingivitis periodontitis	604	-23.0889	-4.0711	1.40E-04	1
G12	periodontitis	0.10	0.35	0.49	0.58	2.39	healthy periodontitis	864	-15.7455	-2.91948	0.01052	1
G13	gingivitis	9.32	12.84	16.06	18.57	19.01	gingivitis healthy	615.5	4.67172	0.84169	1	0

G13	healthy	9.25	13.06	15.48	16.67	18.73	gingivitis periodontitis	649.5	5.94444	1.04768	0.88436	0
G13	periodontitis	10.40	12.71	14.83	16.62	21.33	healthy periodontitis	565	1.27273	0.23588	1	0
G14	gingivitis	0.04	0.18	0.29	0.44	0.95	gingivitis healthy	469	0.57828	0.10425	1	0
G14	healthy	0.00	0.24	0.30	0.38	0.71	gingivitis periodontitis	560.5	-13.9694	-2.46341	0.04129	1
G14	periodontitis	0.09	0.31	0.42	0.83	1.52	healthy periodontitis	800.5	-14.5477	-2.6977	0.02095	1
G15	gingivitis	4.25	4.55	5.78	7.54	9.14	gingivitis healthy	455	-7.24495	-1.30541	0.57526	0
G15	healthy	3.88	5.36	6.67	7.74	10.65	gingivitis periodontitis	715.5	-7.69722	-1.35671	0.52462	0
G15	periodontitis	4.68	5.57	6.47	7.72	9.52	healthy periodontitis	659.5	-0.45227	-0.08383	1	0
G16	gingivitis	2.15	3.32	5.15	6.25	7.35	gingivitis healthy	526.5	-4.79545	-0.86399	1	0
G16	healthy	3.23	3.68	5.55	6.40	7.69	gingivitis periodontitis	749	1.525	0.26878	1	0
G16	periodontitis	2.07	3.59	4.19	6.20	7.45	healthy periodontitis	554.5	6.32045	1.17142	0.72429	0
G17	gingivitis	0.13	0.49	0.98	2.19	3.06	gingivitis healthy	456	-0.57576	-0.10373	1	0
G17	healthy	0.35	0.47	0.64	2.34	3.52	gingivitis periodontitis	570	-14.8667	-2.6202	0.02636	1
G17	periodontitis	0.39	1.58	2.59	3.30	5.57	healthy periodontitis	804	-14.2909	-2.64864	0.02424	1
G18	gingivitis	19.93	23.26	32.37	40.33	43.83	gingivitis healthy	616	1.97222	0.35533	1	0
G18	healthy	16.21	22.00	34.56	39.42	44.16	gingivitis periodontitis	709.5	8.99722	1.58571	0.33841	0
G18	periodontitis	13.65	23.83	26.25	30.06	39.36	healthy periodontitis	504.5	7.025	1.30198	0.57877	0
G19	gingivitis	1.17	1.32	1.51	1.70	1.82	gingivitis healthy	471	-1.69697	-0.30587	1	0
G19	healthy	1.11	1.34	1.46	1.77	2.05	gingivitis periodontitis	613	-11.1333	-1.96306	0.14892	0

G19	periodontitis	1.32	1.44	1.60	1.90	4.40	healthy periodontitis	746	-9.43636	-1.74967	0.24053	0
G20	gingivitis	2.74	4.49	5.48	6.80	10.37	gingivitis healthy	388.5	-7.15909	-1.28404	0.59738	0
G20	healthy	4.23	5.07	6.24	7.49	10.30	gingivitis periodontitis	768	5.775	1.01622	0.92857	0
G20	periodontitis	3.69	4.34	4.95	5.84	13.67	healthy periodontitis	439.5	12.93409	2.56705	0.03077	1
G21	gingivitis	0.90	1.29	1.92	4.36	5.86	gingivitis healthy	576.5	3.61869	0.65205	1	0
G21	healthy	1.10	1.29	1.83	2.23	3.30	gingivitis periodontitis	625	0.60278	0.10625	1	0
G21	periodontitis	1.30	1.55	1.98	2.09	2.59	healthy periodontitis	628.5	-3.01591	-0.55902	1	0
G22	gingivitis	0.63	1.43	1.87	2.15	2.56	gingivitis healthy	488	-4.86616	-0.87686	1	0
G22	healthy	1.20	1.43	1.99	2.46	3.34	gingivitis periodontitis	703.5	-4.81389	-0.84856	1	0
G22	periodontitis	0.93	1.63	1.94	2.15	3.06	healthy periodontitis	638.5	0.05227	0.00969	1	0
G23	gingivitis	0.09	0.11	0.21	0.32	0.41	gingivitis healthy	439.5	-4.81061	-0.868	1	0
G23	healthy	0.05	0.21	0.27	0.31	0.46	gingivitis periodontitis	643	-12.9583	-2.28724	0.06655	0
G23	periodontitis	0.11	0.24	0.30	0.40	0.83	healthy periodontitis	747.5	-8.14773	-1.51231	0.39136	0
G24	gingivitis	0.91	1.27	1.54	1.69	1.86	gingivitis healthy	477	-5.43182	-0.97874	0.98313	0
G24	healthy	0.54	1.22	1.57	1.96	2.87	gingivitis periodontitis	702.5	-6.025	-1.06199	0.86472	0
G24	periodontitis	0.62	1.40	1.58	1.83	2.29	healthy periodontitis	650.5	-0.59318	-0.10995	1	0
G25	gingivitis	0.73	0.79	1.01	1.19	1.52	gingivitis healthy	570	5.98485	1.07866	0.84222	0
G25	healthy	0.50	0.75	0.90	1.13	1.43	gingivitis periodontitis	565	-3.08333	-0.54362	1	0

G25	periodontitis	0.62	0.82	1.08	1.32	2.11	healthy periodontitis	695	-9.06818	- 1.68126	0.27814	0
G26	gingivitis	0.17	0.27	0.72	1.10	1.64	gingivitis healthy	518.5	5.71465	1.0298	0.90931	0
G26	healthy	0.05	0.34	0.40	0.86	1.57	gingivitis periodontitis	508	-11.3694	- 2.00422	0.13514	0
G26	periodontitis	0.25	0.75	1.02	1.44	2.34	healthy periodontitis	803.5	-17.0841	- 3.16694	0.00462	1
G27	gingivitis	0.05	0.13	0.88	1.42	2.05	gingivitis healthy	569.5	-4.24747	- 0.76583	1	0
G27	healthy	0.04	0.20	1.18	1.58	2.47	gingivitis periodontitis	789.5	8.08889	1.42669	0.46101	0
G27	periodontitis	0.05	0.16	0.21	0.32	1.83	healthy periodontitis	471	12.33636	2.28808	0.0664	0
G28	gingivitis	0.22	0.34	0.42	0.50	0.83	gingivitis healthy	603	2.27273	0.4097	1	0
G28	healthy	0.11	0.27	0.38	0.54	1.15	gingivitis periodontitis	687	6.5	1.14624	0.75508	0
G28	periodontitis	0.19	0.27	0.33	0.50	0.95	healthy periodontitis	540	4.22727	0.78391	1	0
G29	gingivitis	0.17	0.46	0.74	0.98	1.29	gingivitis healthy	646	5.18434	0.93421	1	0
G29	healthy	0.16	0.39	0.62	0.77	1.96	gingivitis periodontitis	675.5	10.46389	1.84454	0.19532	0
G29	periodontitis	0.17	0.32	0.45	0.75	1.66	healthy periodontitis	508.5	5.27955	0.97866	0.98324	0