



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERGLİSEMİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ ZEBRA
BALIKLARINDA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*'İN VİRULANS
FAKTÖRLERİNİN İNFLAMATUAR YANIT ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

GİZEM GÜNDÜZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ KEMAL NACİ KÖSE
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
PROF. DR. EBRU IŞIK ALTURFAN

İSTANBUL- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERGLİSEMİ MODELİ OLUŞTURULMUŞ ZEBRA
BALIKLARINDA *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*'İN VİRULANS
FAKTÖRLERİNİN İNFLAMATUAR YANIT ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

GİZEM GÜNDÜZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ KEMAL NACİ KÖSE
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

EŞ-DANIŞMAN
PROF. DR. EBRU IŞIK ALTURFAN

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gizem GÜNDÜZ



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, mesleki ve akademik gelişimime katkı sağlayan danışmanım sayın *Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci KÖSE*'ye, Tez sürecim boyunca akademik bilgi ve tecrübelerini özveriyle paylaşan, laboratuvarının kapılarını açarak değerli ekibiyle beni tanıştıran ve desteğini her zaman hissettiren kıymetli eş danışmanım sayın *Prof. Dr. Ebru Işık ALTURFAN*'a,

Doktora eğitimim boyunca, akademik ve klinik alanlarda olduğu kadar hayatın her alanındaki engin bilgi ve deneyimini tüm samimiyetiyle bizimle paylaşan ve ihtiyacımız olduğunda her zaman yardım elini uzatan çok değerli hocam sayın *Prof. Dr. Leyla KURU*'ya,

Teorik ve pratik her türlü konuda yol göstermekten çekinmeyen değerli hocalarım sayın *Prof. Dr. Başak DOĞAN*, *Doç. Dr. Ömer Birkan AĞRALI*, *Dr. Öğr. Üyesi Selin YILDIRIM* ve *Dr. Öğr. Üyesi Hafize ÖZTÜRK ÖZENER*'e,

Doktora eğitimimde birlikte olmaktan mutluluk duyduğum sevgili yol arkadaşlarım *Aslı Aktan*, *Elif Var Odabaş*, *Ezgi Akçe*, *Selçuk Kırmacı* ve bu süreçte sosyal yaşamımızda da yollarımızın ayrılmadığı sevgili *Gülce Nil Varlıhan* ve *Gözdem Bayraktar*'a,

Aynı ortamı paylaşmaktan ve birlikte vakit geçirmekten mutluluk duyduğum eski ve yeni tüm asistan arkadaşlarıma ve *Periodontoloji Anabilim Dalı* personeline,

Birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım ve bilgi birikimlerine güvendiğim değerli laboratuvar arkadaşlarım *Dr. İsmail Ünal*, *Dr. Derya Cansız*, *Dr. Fümet Duygu Üstündağ*, *Dr. Ünsal Veli Üstündağ*'a ve deney aşamalarında olduğu kadar sosyal hayatta da hem bilgilerini hem de manevi desteğini koşulsuz hissettiren sevgili arkadaşım *Merih Beler*'e

Koşulsuz sevgileriyle bana her zaman destek olan ve bugünlere gelmemde çok emek veren canım ailem; sevgili babam *Coşkun Gündüz*, annem *Seval Gündüz* ve ablam *Gamze Gündüz*'e Artık başka ülkelerde yaşasak da liseden beri hiç ayrılmadığımız ve doktora serüvenimin her anına eşlik eden canım arkadaşım *Begüm Denizhan*'a

Tanıştığımız ilk günden beri hayatıma şans getirdiğine inandığım, sevgisini her zaman kalbimde hissettiğim ve bu süreçte de tüm ilgisi ve sabrıyla bana koşulsuz destek veren sevgili eşim *Emre Berk Sevinç*'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından **'Hiperglisemi Modeli Oluşturulmuş Zebra Balıklarında *Porphyromonas Gingivalis*'in Virulans Faktörlerinin İnflamatuvar Yanıt Üzerine Etkilerinin İncelenmesi'** başlıklı ve **TDK-2021-10420** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	8
4.1. Periodontal Hastalıklar	8
4.1.1 Periodontal hastalıkların patogenezi	9
4.1.2. Periodontal hastalık patogenezinde öne çıkan bakteriler	10
4.2. <i>Porphyromonas Gingivalis</i> ve Virulans Faktörleri.....	11
4.2.1. Lipopolisakkarit	12
4.2.2. Fimbria	13
4.2.3. Kapsül.....	14
4.2.4. Proteinazlar.....	14
4.2.4.1. Kolajenazlar.....	14
4.2.4.2. Gingipain	15
4.3. Periodontal Hastalıklar ve Sistemik Hastalıklar İlişkisi	18
4.4. Hiperglisemi.....	20
4.4.1. Hiperglisemi risk faktörleri	21
4.4.1.1. Diabetes mellitus	21
4.4.1.2. Obezite.....	26
4.4.1.3. Hiperlipidemi ve hipertansiyon	27
4.4.1.4. Polikistik over sendromu varlığı	29
4.5. Periodontal Hastalıklar ve Hiperglisemi İlişkisi	29
4.6. Periodontal Hastalıklarda İnflamasyon ve Akut Faz Yanıtı	30

4.6.1. C-reaktif Protein.....	32
4.6.2. YKL-40	33
4.6.3. İnterlökin-1beta	34
4.6.4. Tümör nekroz faktörü alfa.....	35
4.7. Oksidatif Stres ve Periodontal Hastalıklar	35
4.8. Asetilkolinesteraz Aktivitesi.....	38
4.9. Alkalen Fosfataz Aktivitesi	38
4.10. Deney Hayvan Modeli Olarak Zebra Balıkları.....	39
5. GEREÇ ve YÖNTEM	41
5.1. Zebra Balıklarının Bakım ve Beslenme Prosedürleri	41
5.2. Kullanılan Cihazlar	43
5.3. Kullanılan Kimyasallar	44
5.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	45
5.5. Gingipain Enjeksiyonlarının Uygulanması.....	46
5.6. Açlık Kan Şekeri Ölçümleri ve Oral Glukoz Tolerans Testi.....	48
5.7. Homojenatların Hazırlanması	49
5.8. Oksidan ve Antioksidan Parametreler	50
5.8.1. Total protein tayini	50
5.8.1.1. Çalışma prensibi	50
5.8.1.2. Gerekli çözeltiler	50
5.8.1.3. Deneyin yapılışı.....	51
5.8.2. Süperoksid dismutaz aktivitesi tayini.....	52
5.8.2.1. Çalışma prensibi	52
5.8.2.2. Gerekli çözeltiler	52
5.8.2.3. Deneyin yapılışı.....	52
5.8.3. Glutatyon s-transferaz aktivitesi tayini	53
5.8.3.1. Çalışma prensibi	53
5.8.3.2. Gerekli çözeltiler	53

5.8.3.3. Deneyin yapılışı.....	54
5.8.4. Total nitrik oksit tayini.....	54
5.8.4.1. Çalışma prensibi	54
5.8.4.2. Gerekli çözeltiler	54
5.8.4.3. Deneyin Yapılışı.....	55
5.8.5. Lipit peroksidasyon tayini.....	55
5.8.5.1. Çalışma prensibi	55
5.8.5.2. Gerekli çözeltiler	56
5.8.5.3. Deneyin yapılışı.....	56
5.8.6. Total siyalik asit tayini	56
5.8.6.1. Çalışma prensibi	56
5.8.6.2. Çözeltiler	57
5.8.6.3. Deneyin yapılışı.....	57
5.8.7. Katalaz aktivitesi tayini.....	58
5.8.7.1. Çalışma prensibi	58
5.8.7.2. Gerekli çözeltiler	58
5.8.7.3. Deneyin Yapılışı.....	59
5.9. Alkalen Fosfataz Aktivitesi tayini	59
5.9.1. Çalışma prensibi.....	59
5.9.2. Gerekli çözeltiler	59
5.9.3. Deneyin yapılışı.....	60
5.10. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Tayini	60
5.10.1. Çalışma prensibi.....	60
5.10.2. Gerekli çözeltiler	60
5.10.3. Deneyin yapılışı.....	60
5.11. Gen İfadesi Analizi	61
5.11.1. RNA izolasyonu	61
5.11.2. cDNA eldesi	63

5.10.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması.....	63
5.11.3.1. Gen ifadelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analizleri ..	64
5.11.3.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri	65
5.11.3.4. Delta delta ct metodu ile veri analizi	65
5.12. İstatistiksel Analiz.....	66
6. BULGULAR	67
6.1. Grupların Vücut Ağırlık Ortalamalarının Karşılaştırılması.....	67
6.2. Grupların Açlık Kan Glukoz Değerlerinin Karşılaştırılması	68
6.3. Grupların Oral Glukoz Tolerans Testi Değerlerinin Karşılaştırılması.....	69
6.4. Gen İfadelerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analiz Sonuçları .	70
6.4.1. İnsülin mRNA ifade analizi sonuçları.....	70
6.4.2. İnflamatuvar genlerin mRNA ifade analizi sonuçları	71
6.4.3. Akut faz proteini ilişkili genlerin mRNA ifade analizi sonuçları	72
6.5. Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları	74
6.5.1. Grupların lipit peroksidasyon, nitrik oksit ve siyalik asit düzeyleri analiz sonuçları	74
6.5.2. Grupların katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon s-transferaz aktivitelerinin analiz sonuçları.....	75
6.5.3. Grupların alkalen fosfataz aktivitelerinin analiz sonuçları	76
6.5.4. Grupların asetilkolin esteraz aktivitelerinin analiz sonuçları	77
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	78
8. KAYNAKLAR.....	93
9. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
11. EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

KISALTMALAR LİSTESİ

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
α	:	Alfa
β	:	Beta
ACh	:	Asetilkolin
AChE	:	Asetilkolinesteraz
ADA	:	Amerikan Diyabet Derneği
AKŞ	:	Açlık kan şekeri
ALP	:	Alkalen fosfataz
CAT	:	Katalaz
CHI3L1	:	Kitinaz 3 Benzeri Protein 1
CRP	:	C-Reaktif protein
DM	:	Diabetes Mellitus
DZV	:	Dış zar vezikülü
G	:	Gingipain grubu
g	:	Gram
GSH	:	Glutasyon
GST	:	Glutasyon S-Transferaz
HbA1c	:	Hemoglobin A1c
H	:	Hiperglisemi
H+G	:	Hiperglisemi+ Gingipain grubu
IL	:	İnterlökin
İGSÜ	:	İleri glikasyon son ürünleri
İGSÜR	:	İleri glikasyon son ürünlerinin reseptörü
<i>ins</i>	:	İnsülin

K	:	Kontrol grubu
Kgp	:	Lizin spesifik gingipain
L	:	Litre
LPO	:	Lipit peroksidasyon
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malondialdehit
mg	:	Miligram
µl	:	Mikrolitre
mL	:	Mililitre
MMP	:	Matriks metalloproteinaz
NO	:	Nitrik oksit
OGTT	:	Oral glikoz tolerans testi
OPG	:	Osteoprotegerin
PBS	:	Fosfat tampon solüsyonu
PG	:	Prostaglandin
<i>P. gingivalis</i>	:	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PMNL	:	Polimorf nüveli lökosit
RANKL	:	Reseptör aktivator nükleer kappa B ligand
Rgp	:	Arginin spesifik gingipain
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SA	:	Siyalik asit
SOD	:	Süperoksit dismutaz
T2DM	:	Tip 2 Diabetes Mellitus
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TNF	:	Tümör nekroz faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Mikrobiyal komplekslerin şematik olarak gösterilmesi (Socransky ve ark., 1998' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	11
Şekil 2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> ve virulans faktörleri (Aleksijević ve ark., 2022' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	12
Şekil 3. Gingipaininin yapısal görünümü (Li & Collyer, 2011' den yararlanılarak hazırlanmıştır.).....	16
Şekil 4. Gingipainin konak cevabı üzerindeki proteolitik etkisinin periodontitis gelişimi ve ilerlemesindeki rolü (Fitzpatrick ve ark., 2009' dan yararlanılarak hazırlanmıştır.).....	17
Şekil 5. Gingipainlerin glikoz metabolizması üzerindeki etkileri (Seyama ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	18
Şekil 6. Gingipain ile modüle edilmiş IL-8 yanıtının şematik gösterimi (Dias ve ark., 2008' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	20
Şekil 7. Kontrolsüz diyabetin periodontitis üzerindeki negatif etki mekanizması (Polak & Shapira, 2018' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	24
Şekil 8. Periodontitisin diyabet kontrolünü zorlaştırmasındaki potansiyel mekanizmalar (Polak & Shapira, 2018' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)	26
Şekil 9. ZEBTEC mini akvaryum sistemi	42
Şekil 10. Deney grupları.....	45
Şekil 11. Deney akış şeması	46
Şekil 12. a. Zebra balığının standart besleme protokolü sonrası hassas terazi ile ağırlık ölçümü, b. Zebra balığının 2 hafta fazla besleme protokolü sonrası hassas terazi ile ağırlık ölçümü	47
Şekil 13. a. Zebra balığına intraperitoneal enjeksiyon uygulanması, b. İntraperitoneal enjeksiyon uygulanmasının yakından görünümü, c. Hamilton enjektörü (10µl)	48
Şekil 14. a. Zebra balıklarında dorsal aortadan kan alımı uygulaması, b. Zebra balıklarından enjektör yardımıyla kan alınması işleminin gösterilmesi.....	49
Şekil 15. a. OGTT için mikropipetin zebra balıklarının ağız içine yerleştirilmesi, b. Gavaj uygulaması, c. Gavaj uygulaması sonrası pipetin nazikçe çıkarılması.....	49
Şekil 16. a. Sakrifikasyon sonrası hazırlanacak homojenatlar için dokuların ayrılması, b. Hepatopankreas dokusunun çıkarılması, c. Dokunun ependorf tüplere aktarılması, d. TissueLyser LT cihazıyla homojenize edilmesi	50
Şekil 17. Spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-120-02)	61

Şekil 18. a. QIAcube (QIAGEN) izolasyon robotu, b. mRNA eldesi için hazırlanmış şekilde robotun içeriden görünümü	62
Şekil 19. a. RT-PCR uygulaması için ortamın hazırlanması, b. Rotor Gene-Q (Qiagen) cihazı.....	64
Şekil 20. Grupların 15.gün vücut ağırlık ortalamalarının karşılaştırılması grafiği	67
Şekil 21. Grupların 15.gün açlık glukoz değerlerinin karşılaştırılması grafiği	68
Şekil 22. Grupların 15.gün OGTT değerlerinin karşılaştırılması grafiği	69
Şekil 23. Grupların RT-PCR ile ölçülen <i>ins</i> ifade değişiklikleri grafiği	70
Şekil 24. Grupların RT-PCR ile ölçülen inflamatuvar genlerin A: <i>il-1β</i> ; B: <i>tnf-α</i> mRNA ifade değişiklikleri grafikleri	71
Şekil 25. Grupların RT-PCR ile ölçülen akut faz proteini ilişkili genlerin A: <i>chia.5</i> ; B: <i>chia.6</i> ; C: <i>crp</i> mRNA ifade değişiklikleri grafikleri	73
Şekil 26. Grupların A: LPO; B: NO; C: SA düzeyleri karşılaştırılması grafikleri.....	74
Şekil 27. Gruplar arası A: CAT; B: SOD; C: GST aktiviteleri karşılaştırması grafiği	75
Şekil 28. Gruplar arası ALP aktiviteleri karşılaştırması grafiği.....	76
Şekil 29. Gruplar arası AChE aktiviteleri karşılaştırması grafiği	77

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Kullanılan cihazlar.....	43
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar.....	44
Tablo 3. Total protein tayini	51
Tablo 4. Süperoksid dismutaz aktivitesi tayini	53
Tablo 5. Glutasyon s-transferaz aktivitesi tayini.....	54
Tablo 6. Total nitrik oksit tayini	55
Tablo 7. Lipit peroksidasyonu tayini	56
Tablo 8. Total siyalik asit tayini	58
Tablo 9. Katalaz aktivitesi tayini	59
Tablo 10. Alkalen fosfataz aktivitesi tayini	60
Tablo 11. Asetilkolinesteraz aktivitesi tayini	61
Tablo 12. RNA izolasyon basamakları	62
Tablo 13. cDNA sentezinde birinci basamak	63
Tablo 14. cDNA sentezinde ikinci basamak.....	63
Tablo 15. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri.....	64
Tablo 16. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri	65

1. ÖZET

Tezin başlığı : Hiperglisemi Modeli Oluşturulmuş Zebra Balıklarında *Porphyromonas Gingivalis*'in Virulans Faktörlerinin İnflamatuvar Yanıt Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı Soyadı : Gizem Gündüz

Danışmanın Adı Soyadı : Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci Köse

Eş-Danışmanın Adı Soyadı: Ebru Işık Alturfan

Programın Adı : Periodontoloji Doktora Programı

Amaç: *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), periodontal hastalıklarda kilit patojenlerden biridir ve diyabet gibi hiperglisemiyle karakterize sistemik hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir. *P. gingivalis*'in virulans faktörlerinden en önemli endotoksin ise gingipainlerdir. Model organizmalar içinde zebra balığı (*Danio rerio*) insanlarla yüksek fizyolojik ve genetik homolojiye sahip olması nedeniyle *in vivo* çalışmalarda tercih edilir. Bu çalışmadaki amaç, hiperglisemi modeli oluşturulmuş zebra balıklarında gingipaine bağlı gelişen inflamatuvar yanıtın değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yetişkin zebra balıkları Kontrol (K), Hiperglisemi (H), Gingipain (G), Hiperglisemi+Gingipain (H+G) şeklinde gruplara ayrıldı (n=15). İki haftanın sonunda balıklara oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapıldı ve açlık kan şekeri (AKŞ) düzeyleri ölçüldü. Oksidan-antioksidan sistem parametreleri ile alkalen fosfataz (ALP) ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri hepatopankreas örneklerinde spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. *Tnf- α* , *il-1 β* , *ins*, *crp* ve YKL-40 analogları *chia.5* ve *chia.6* gen ifade düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle incelendi.

Bulgular: İki hafta fazla besleme sonrası H ve H+G gruplarındaki balık ağırlıkları, AKŞ ve OGTT değerlerindeki artış ile hiperglisemi durumu doğrulandı. Hem hiperglisemi hem de gingipain gruplarında AChE ve ALP aktivitelerindeki artış ile birlikte oksidatif stres belirteçlerinde ve pro-inflamatuvar belirteçlerde artış görüldü. Bu artışlar, H+G grubunda çok daha belirgin şekilde kaydedildi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar diyabet ve obezite gibi hiperglisemik durumlarda gözlenen periodontal dokulardaki şiddetlenmiş inflamatuvar yanıtta, tek başına gingipainlerin rolünü desteklemekte olup *P. gingivalis*'in bu patogenezdaki rolünü ortaya çıkarmaktadır. Bilgimiz dahilinde, hiperglisemi modeli oluşturulmuş zebra balıklarında gingipain ilk defa kullanılmış olup, çalışmamızın ilerideki araştırmalara rehber olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gingipain, hiperglisemi, inflamasyon, zebra balığı, RT-PCR

2. SUMMARY

Title of Thesis: Evaluation of the Effect of *Porphyromonas Gingivalis* Virulence Factors on Inflammatory Response in Hyperglycemia-Induced Zebrafish

Student Name, Surname: Gizem Gündüz

Supervisor Name : Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci Köse

Co-Supervisor Name: Ebru Işık Alturfan

Program Name : Periodontology PhD Program

Objective: *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a major pathogen in periodontal diseases, is linked to hyperglycemia-associated diseases, including diabetes mellitus. Gingipains, are the essential endotoxins of *P. gingivalis* and rarely studied *in vivo*. Zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate with strong physiological and genetic homology with humans, having co-orthologs for human genes. Therefore, they are the preferred model animals in *in vivo* studies. The aim of presented study is to determine the effects of gingipain in a hyperglycemia-induced zebrafish by evaluating inflammation, oxidant-antioxidant status, and the cholinergic system.

Materials and Methods: Adult zebrafish were distributed into 4 groups including Control(C), Hyperglycemia-induced(H), Gingipain-induced(G), and Hyperglycemia-induced+Gingipain-induced(H+G)(n=15). After 15-days of overfeeding of H and H+G groups, for all groups, oral glucose tolerance test(OGTT) was performed, and fasting blood glucose(FBG) levels were measured. Oxidant-antioxidant parameters comprising LPO, NO, glutathione, GST, catalase, SA, and ALP and AChE activities were determined spectrophotometrically in the hepatopancreas. *Tnf- α* , *il-1 β* , *ins*, *crp*, and the acute phase protein YKL-40 analogs *chia.5* and *chia.6* expressions were evaluated by RT-PCR.

Results: After two weeks of overfeeding, significantly increased weight gain, FBG, and OGTT confirmed that the zebrafish were hyperglycemic. Increased oxidative stress and inflammatory markers in addition to ALP and AChE activities were observed in both overfeeding and GP groups. Amplification of inflammation and oxidative stress was evident in the H+G group through increased expression of *crp*, *il-1 β* , *chia.5*, and *chia.6* and increased LPO and NO levels.

Conclusion: Our results demonstrate the role of gingipains in the increased inflammatory response in hyperglycemia-associated diseases.

Keywords: Gingipain, hyperglycemia, inflammation, zebrafish, RT-PCR

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Periodonsiyum dişi saran ve destekleyen dişeti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinden oluşan yapıya denir. Periodonsiyumu etkileyen periodontal hastalıklar sadece dişeti ile sınırlı kaldıysa gingivitis, alveol kemiği ve sement gibi diğer yapılara da yayıldıysa periodontitis adını alır (Newman ve ark., 2011). Diş kaybına neden olan ve bireyin hayat kalitesini etkileyen periodontal hastalıklar toplumda oldukça yaygın görülmektedir (Petersen & Baehni, 2012). Periodontal hastalıkların prevalansı ile ilgili 2005 yılında yapılan bir çalışmada periodontal hastalıkların dünya nüfusunun %90'ını etkilediği bildirilmiştir (Pihlstrom ve ark., 2005) Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009'da yayınlanan bir araştırmada ise 18 yaşının üzerindeki kişilerin yarısından fazlasında başlangıç safhasında periodontitis olduğu, 35 yaşın üzerindeki kişiler arasında ise bu oranın %75'lere ulaştığı bildirilmiştir (Friedewald ve ark., 2009). Periodontal hastalıklar kompleks inflamatuvar hastalıklar olup genel olarak bakteriyel, travmatik, gelişimsel, metabolik ya da genetik faktörlere bağlı olarak gelişir. Periodontal hastalıkların başlıca etkeni mikrobiyal dental plak içerisindeki patojen bakteriler ve onların ürünleri olarak kabul edilir. Mikrobiyal dental plak içerisinde 700'den fazla tanımlanmış mikroorganizma olduğu bilinmektedir (Deo ve ark., 2019). Bu mikroorganizmalar birbirleri arasında denge içinde yaşarlar. Bu denge yukarıdaki sayılan faktörlerin etkisiyle bozulduğunda periodontal hastalıklar ortaya çıkar (Kornman, 2008; Newman ve ark., 2011). Periodontal hastalıkların sistemik hastalıklarla olan ilişkisi ise son yıllarda dikkati çeken bir konu olmuştur. Bu hastalıkların diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sistemik hastalıkların patogenezi de negatif yönde etkilediği gösterilmiştir (Levine, 2013; Khumaedi ve ark., 2019; Sanz ve ark., 2020).

Hiperglisemi, kan glukoz seviyesinin aşırı derecede artmasıyla karakterize metabolik bir durumdur. Hiperglisemi tedavi edilmediğinde göz, böbrekler, sinirler, kalp ve periferik damar sisteminde hasar gibi yaşamı tehdit eden birçok ciddi komplikasyona yol açabilir. Hipergliseminin görüldüğü hastalıklar arasında başta diyabet ve obezite olmak üzere hipertansiyon, hiperlipidemi ve polikistik over sendromu önde gelir (Mouri & Badireddy, 2022)..

Hiperglisemi için risk faktörü teşkil eden ve bunun yanında artmış sistemik inflamasyon durumuyla da ilişkilendirilen diyabet ve obezite gibi büyük popülasyonları etkileyen sistemik hastalıklar periodontal hastalıklarla yakından ilişkilidir (Levine, 2013). Vücuttaki genel inflamasyon seviyesindeki artış ile birlikte sistemik dolaşımdaki pro-inflamatuvar mediyatörlerin seviyelerinde de artış görülür. Bu durumdaki kişilerde periodontal hastalığın

gelişmesi durumunda periodontal patojenler ile onların ürünlerine karşı ortaya çıkan sitokinler kan dolaşımı vasıtasıyla sistemik inflamasyon seviyesini daha da artırır. Böylelikle bir taraftan mevcut sistemik hastalığın kontrolü zorlaşırken diğer taraftan periodontal patojenlere karşı gelişen inflamatuvar cevapta da artış meydana gelerek periodontal hastalığın kontrolü zorlaşır, sistemik dolaşımdaki interleukin 1 beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin miktarları artarken hiperglisemik durum daha da kötüleşir (Khader ve ark., 2006). Örnek verilecek olursa, periodontitise sahip fakat diyabeti olmayan kişilerle periodontitisli ve diyabetli kişiler karşılaştırıldığında bu iki hastalığa da sahip bireylerde daha yüksek inflamatuvar ve immünolojik reaksiyonların görüldüğü bildirilmiştir (Polak & Shapira, 2018).

İnflamasyonun artmasında sitokinlerin yanı sıra akut faz proteinlerinin de önemli rol oynadığı bilinmektedir (Kushner & Mackiewicz, 2020). Akut faz proteinleri arasında en sık adı geçen C-reaktif protein (CRP) ve ona nazaran nispeten yeni olan YKL-40 (kitinaz-3 benzeri protein 1(CHI3L1)) diyabet ve obezite gibi hiperglisemiyle karakterize hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan periodontitis ile akut faz proteinleri arasındaki ilişkiyi ve akut faz proteinlerinin periodontal patogenezdaki rolünü açıklamaya çalışan araştırmalarda bu iki akut faz proteinlerinin seviyelerinde kayda değer yükselmeler olduğu belirtilmiştir (Baeza ve ark., 2020; Kido ve ark., 2015; Nielsen ve ark., 2008; Pereira ve ark., 2022; Rathcke ve ark., 2006). Hatta YKL-40'ın diyabetik hastalarda CRP'ye göre daha spesifik olduğu iddia edilmiştir. Bu çalışmada Tip 2 Diabetes Mellituslu (T2DM) bireylerdeki artmış plazma YKL-40 seviyesinin, açlık plazma glikozu ile ilişkili olduğu ancak vücut kitle indeksi ile ilişkili olmadığı ve dolayısıyla plazma YKL-40 seviyesinin obeziteden bağımsız diyabet spesifik bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Nielsen ve ark., 2008). Bir başka çalışmada ise gingivitisli ve periodontitisli kişilerden alınan serum ve dişeti oluğu sıvısı örneklerinde, sağlıklı insanlardan alınan örneklerden daha yüksek YKL-40 seviyelerinin tespit edildiği rapor edilmiştir (Keles ve ark., 2014; Kido ve ark., 2015). Bu araştırmacılar, yaptıkları takip çalışmalarında hastaların periodontal tedavisi sonrasında YKL-40 seviyelerinin sağlıklı hastalarinkilerle aynı seviyelere indiğini göstermiş olup YKL-40'ın periodontal hastalıklarda oluşan inflamasyon seviyesinin belirlenmesinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Keles-Yucel ve ark., 2020). Bir akut faz proteini olarak YKL-40'ın diyabet ve hiperglisemiyle ilişkilendirildiği çalışmalara duyulan ihtiyaç halen güncelliğini korumaktadır.

Geniş bir yelpazeye sahip olan oral mikrobiyota içerisinde periodontitiste etkili olan mikroorganizmaları Socransky ve ark. (1998) bulundukları bölgelere, hastalığın gelişim evrelerine ve patojenitelerine göre değişik renk gruplarına ayırarak sınıflamıştır. Bu

mikrobiyolojik sınıflandırma içerisinde patojenitesi en yüksek olan grup kırmızı kompleks adını almaktadır ve bu kompleks içerisinde *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* ve *Tannerella forsythia* gibi zorunlu anaerop bakteriler bulunmaktadır (Socransky ve ark., 1998).

Kırmızı kompleks bakteriler içerisinde öne çıkan *P. gingivalis*, periodontitiste kilit patojen olarak rol oynamakta olup sistemik hastalıklarla yakından ilişkilidir. Ayrıca vücutta dolaşım yoluyla hareket ederek beyin ve kalp gibi bazı hayati organlarda da saptandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiş bir patojen bakteridir (Bahar ve ark., 2021; Dominy ve ark., 2019; Hajishengallis, 2015). *P. gingivalis*'in kronik periodontitis hastalarının subgingival plaklarında %85,75 oranında bulunduğu tespit edilmiştir (How ve ark., 2016). Periodontiste kilit taşı patojen olarak kabul edilen bu bakterinin kommensal bakteri popülasyonunu yeniden düzenleyerek disbiyozise neden olduğu ayrıca virulans faktörleri aracılığıyla da immün yanıtı regüle ettiği gösterilmiştir (Hajishengallis, 2015; Olsen ve ark., 2017). Virulans faktörleri arasında membran lipopolisakkaridi, fimbria, kapsül ve bakteriye özgü proteinazlar olan gingipainler sayılmaktadır (Xu ve ark., 2020). Periodontal hastalıkta kilit patojen role sahip olan *P. gingivalis* bakterisi ile lipopolisakkaritler (LPS) ve gingipain gibi onun virulans faktörleri de sistemik dolaşıma geçerek vücutta inflamatuvar düzeyi arttırmaktadır. Beyin, kalp ve karaciğer gibi hayati dokularda varlığı tespit edilen bu bakteri ve onun çeşitli ürünleri Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi sistemik hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (Bachtar ve ark., 2022; Bahar ve ark., 2021; Dominy ve ark., 2019; Widziolek ve ark., 2016).

P. gingivalis'in virulans faktörleri arasında membran lipopolisakkaridi, fimbria, kapsül, gingipainler gibi proteazlar sayılabilir, bu yapılar aracılığıyla bakteri konak içerisinde kolonize olmaya başlar ve konak immün yanıtını tetikler (Xu ve ark., 2020). Son yıllarda *P. gingivalis*'in virulans faktörleri içerisinde özellikle gingipainlerin önemini vurgulayan çalışmaların sayısı artmaktadır. Gingipainler konağa ait proteinlerini denatüre ederler ve immün yanıtı değiştirme kabiliyetine sahiptirler. Gingipainler, argininin karbonil grubundaki peptit bağlarını hidroliz eden arginin-spesifik gingipainler (RgpA ve RgpB olmak üzere Rgp) ve lizin proteininin C-terminalindeki polipeptitleri parçalayan lizin-spesifik gingipainler (Kpg) olmak üzere 2 esas grupta toplanır (Guo ve ark., 2010). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde *P. gingivalis* ile ilgili çalışmalar genelde canlı bakteri kullanılarak yapılan ve mikrobiyolojik laboratuvar koşulları gerektiren çalışmalardır. Bu şartlar altında bakterinin gingipain gibi virulans faktörleri ile ilgili olan çalışmalarda ise genelde bakterinin bu faktörlerini bloke eden nötralize edici ajanlar kullanılmakta ve buradan çıkarımlar yapılmaktadır (Farrugia ve ark., 2021; Widziolek

ve ark., 2016). Bu alanda *P. gingivalis* 'e karşı gelişen immün yanıtı değerlendirmede gingipain gibi endotoksinlerinin doğrudan kullanıldığı çalışmalar nispeten daha azdır (Gibson III & Genco, 2001; Wilensky ve ark., 2017). Fare modeli kullanılarak aşı çalışması yapılan bir araştırmada *P. gingivalis* nedenli kemik kaybına karşı koruma sağlanıp sağlanamayacağı araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonunda, *P. gingivalis* veya RgpA ile aşılanan hayvanların maksiller kemik kaybından korunduğu gösterilmiştir (Gibson III & Genco, 2001) Yine farelerde yapılan bir başka aşı çalışmasında gingipainler içerisinde RgpA'nın immün yanıtta değişikliğe yol açtığını öne çıkararak gingipainlerin önemini vurgulamaktadır (Wilensky ve ark., 2017). Bu çalışmaların yanında gingipainlerin aynı zamanda sistemik hastalıklarda da ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır. (Dominy ve ark., 2019; Widziolek ve ark., 2016). Dominy ve ark. (2019), *P. gingivalis*'in ve daha spesifik olarak gingipainlerin Alzheimer hastalığının gelişiminde rol oynayabileceğini bu hastalarının beyin lezyonlarında gingipainlerin varlığını göstermişlerdir (Dominy ve ark., 2019).

Zebra balıkları genetik, biyotıp, nörobiyoloji, toksikoloji, farmakoloji ve insanlarda görülen hastalıkların modellenmesi de dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Howe ve ark., 2013; Karaman ve ark., 2020). Bu balıklar, insanla yüksek fizyolojik ve genetik homolojiye sahip bir omurgalı olmasının yanı sıra inflamasyonla ilişkili proteinler de dahil olmak üzere insanlarla oldukça benzer genlere sahiplerdir (Lepiller ve ark., 2009; Koch ve ark., 2015; Ünal & Emekli-Alturfan, 2019; Stream & Madigan, 2022). Model hayvan olarak kullanım alanlarına bakıldığında obezite ve diyabet gibi hiperglisemiye bağlı hastalıkların modellenmesinde de kullanıldığı görülmektedir (Zang ve ark., 2013; Faillaci ve ark., 2018; Zang ve ark., 2018).

Zebra balıkları bakteri kaynaklı meydana gelen konaktaki inflamatuvar durumların ve patogenezlerin araştırılmasında da son yıllarda tercih edilen bir model hayvan olarak karşımıza çıkmaktadır (Miller & Neely, 2004; Widziolek ve ark., 2016; Sullivan ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018). Bu alanda özellikle konak ve patojen arasındaki ilişkilerin kolaylıkla incelenmesine olanak sunmaktadır (Sullivan ve ark., 2017).

Zebra balıkları insanlarla benzer glukoz metabolizmasına, reaktif metabolit üretme sistemlerine ve fizyolojik / patofizyolojik yollara sahiptir. Hipergliseminin esas olarak öne çıktığı diyabet ve obezite gibi metabolik durumlar ve bunların meydana getirdiği patolojik değişimler zebra balıklarında da izlenmektedir. Bir başka model hayvan olarak kullanılan farelerde yapılan diyabet ile ilgili çalışmalarda hiperglisemik durum ve buna bağlı komplikasyonların gelişme süresi 6 ay gibi uzun bir zamana ihtiyaç duymaktadır (Heckler & Kroll, 2017). Zebra

balıklarında ise yüksek yağlı diyet uygulamasıyla bu süreç 2 hafta gibi çok daha kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir (Zang ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018). Dandin ve ark. (2022) yayınladıkları çalışmada, zebra balıklarında 2 hafta besleme protokolü sonrası glukoz intoleransı ve hiperglisemi geliştiği gösterilmiş, aynı zamanda oksidatif stres ürünleri ve sitokinler gibi inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkileri de rapor edilmiştir (Dandin ve ark., 2022).

Son yıllarda zebra balıklarının model hayvan olarak kullanıldığı, periodontitiste anahtar rol oynayan mikroorganizma olan *P. gingivalis* ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar literatürde sıklıkla görülmeye başlanmıştır. Bu çalışmalar *P. gingivalis* ve onun virulans faktörlerinden gingipain üzerine yoğunlaşmaktadır. *P. gingivalis* varlığında gingipain blokerleri kullanarak ya da gingipain salgılayamayan mutant *P. gingivalis* kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar gingipain gibi virulans faktörlerinin bireysel etkilerini incelemekte yetersiz kalmaktadır (Widziolek ve ark., 2016; Farrugia ve ark., 2021). Bu çalışmada *P. gingivalis*'in doğrudan kullanımı yerine, bakterinin en önemli virulans faktörlerinden olan gingipain kullanımı ile, doğrudan ilgili etkene özgü etkilerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Diğer yönden inflamatuvar düzeyde hiperglisemi ve periodontal hastalıklar arasındaki çift yönlü etkinin karmaşık patogenezi düşünüldüğünde, zebra balığında hiperglisemi modeli yaratılarak periodontal patojenlere ait virulans faktörlerinin tek başına bu balıklar üzerinde kullanılmasıyla yaratılan etkinin, bu iki hastalığın etkileşimlerindeki özellikle gingipainlere özgü alanlara ışık tutacağı ve bu alanda daha ileri çalışmaların önünü açacağı düşünülmektedir.

Sunulan bu çalışmada, bakteri ve onun diğer bileşenleri olmaksızın *in vivo* şartlarda doğrudan gingipaine özgü etkiler ilk kez hiperglisemik zebra balığı modelinde kullanılmıştır ve gingipainin hiperglisemiyle karakterize hastalıklardaki inflamatuvar yanıt üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda hiperglisemik zebra balıklarında *P. gingivalis*'e ait gingipain uyarımına karşı meydana gelen inflamatuvar yanıt, oksidan-antioksidan parametreler ile asetilkolinesteraz (AChE) ve alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri biyokimyasal yöntemlerle, buna ek olarak proinflamatuvar sitokinler *il-1 β* ve *tnf- α* ekspresyonları ve de akut faz proteinleri *crp* ve YKL-40 analogları olan *chia.5* ve *chia.6* ekspresyonları mRNA düzeyinde RT-PCR ile değerlendirildi.

Elde edilen sonuçların, birçok hastalığın temelinde yatan inflamasyon ve periodontal hastalıklar gibi kronik inflamatuvar hastalıklar arasındaki ilişkiler ile ilgili daha ileri araştırmalara rehberlik edeceği düşünülmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Periodontal Hastalıklar

Periodonsiyum dişeti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiği bileşenlerinden oluşan yapı olarak tanımlanır. Dişlerin etrafını saran bu dokuların görevi onları destekleyerek korumaktır (Newman ve ark., 2011). Periodontal sağlık durumu periodonsiyumu oluşturan bu dokuların fonksiyonel olarak normal işlevlerini yerine getirebildikleri, inflamatuvar bulgulara rastlanılmadığı ve bireyin bunlara bağlı şikayetinin olmadığı durum şeklinde tanımlanabilmektedir (Lang & Bartold, 2018). Diş kaybına neden olan ve bireyin hayat kalitesini etkileyen periodontal hastalıklar toplumda oldukça yaygın olarak görülmektedir (Petersen & Baehni, 2012). Örneğin, 2005 yılında yapılan bir çalışmada periodontal hastalıkların dünya nüfusunun %90'ını etkilediği bildirilmiştir (Pihlstrom ve ark., 2005) Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009'da yayınlanan bir araştırmada ise 18 yaşının üzerindeki yarısından fazlasında başlangıç safhasında periodontitis olduğu, 35 yaşın üzerindeki kişiler arasında ise bu oranın %75'lere ulaştığı bildirilmiştir (Friedewald ve ark., 2009).

Periodontal hastalıklar genel olarak bakteriyel, travmatik, gelişimsel, metabolik ya da genetik nedenlere bağlı kompleks inflamatuvar hastalıklardır. Periodontal hastalıklarda, mikrobiyal dental plak içerisindeki patojen bakteriler ve onların ürünleri başlatıcı rol oynarken, konak ile inflamatuvar yanıt arasındaki dengenin bozulması ve bu dengenin yıkıcı doku cevabı yönüne kayması hastalık süresince meydana gelen yıkımdan sorumlu tutulabilir (Kornman, 2008; Newman ve ark., 2011).

Periodontal hastalıklar gingivitis ve periodontitis olmak üzere iki ana alt grupta toplanmaktadır. Hastalık sadece dişeti ile sınırlı ise gingivitis olarak adlandırılırken ilerleyerek periodonsiyumdaki diğer yapıları da etkilediği ve alveol kemik kaybının görüldüğü durum ise periodontitis olarak adlandırılmaktadır (Pihlstrom ve ark., 2005). Periodontal hastalıklar nedeniyle ağızda meydana gelen lokal inflamatuvar durum hastanın genel sağlığını da etkileyebilir. Bu durum, toplumda yine yaygın olarak görülen diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sistemik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Buna yönelik çalışmaların sonuçları, bir taraftan periodontal hastalıkların sistemik hastalıkların seyrini negatif yönde etkileyebildiğini gösterirken diğer taraftan da sistemik hastalıkların periodontal hastalıkları negatif yönde etkilediklerini ve sonuç olarak aralarında çift yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (Khumaedi ve ark., 2019; Levine, 2013; Sanz ve ark., 2020).

4.1.1 Periodontal hastalıkların patogenezi

Periodontal hastalıkların patogenezinde primer etiyolojik faktör olarak mikrobiyal dental plak kabul edilmektedir. Mikrobiyal dental plak içerisinde tanımlanmış birçok patojen bakteriler yer alır. Periodontitisin, ağırlıklı olarak subgingival alanda kolonize olan *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* ve *Tannerella forsythia* gibi gram negatif, anaerobik patojen bakterilerden oluşan bir grup tarafından başlatıldığı görüşü yaygındır (Page & Kornman, 1997). Periodontitis gelişiminde, meydana getirdiği yıkımda bakterilerin doğrudan varlığının yanında konak savunması da son derece önemli yer tutar. Bakteriler dokularda görülen tahribatlarını doğrudan ürettikleri enzimler, toksinler ve virulans faktörleri aracılığıyla meydana getirebildikleri gibi dolaylı olarak konak savunması ve onun çeşitli bileşenlerini aktifleştirerek de oluşturabilmektedirler. Son yıllarda yapılan araştırmalar periodontitiste meydana gelen doku yıkımında inflamatuvar yanıtın daha ağır bastığını göstermektedir (Kornman, 2008).

Periodontal hastalıklarda mikrobiyal dental plak içerisindeki patojen bakteriler tarafından salgılanan enzimler, LPS ve diğer virülans faktörleri konak yanıtını uyararak inflamasyon sürecini başlatırlar. Mikroorganizmalardan salınan ürünler ve antijenler konak hücrelerin yüzeyindeki *toll like* reseptörleri (TLR) tarafından saptanırlar. Bu maddeler konak hücrelerinde çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımını uyarır ve böylece kan damarları genişler ve geçirgenlikleri artar. Buna bağlı olarak bağ dokusunda eksüdatif sıvı artışı ve akut faz proteinlerinin birikimi görülür. Akut faz proteinlerinin inflamasyona dahil olması burada gerçekleşir. Ortamdaki antijenleri elimine etmek ve zarar gören, parçalanan dokuları ortamdan temizlemek için konak savunması antikör üretir ve beraberinde ortama polimorf nüveli lökositler (PMNL) ve nötrofiller göç eder. Konak savunmasında doğal bağışıklıkta öncelikle cevap veren bu hücreler kan damarlarından çıkarak iltihabi hücre infiltratını oluştururlar, PMNL birikimi enzim salınımına yol açarak sitokinler, büyüme faktörleri, prostoglandin (PG) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) üretiminde rol oynar, monositler ve lenfositler de bunları takip eder (Kornman, 2008; Ohlrich ve ark., 2009).

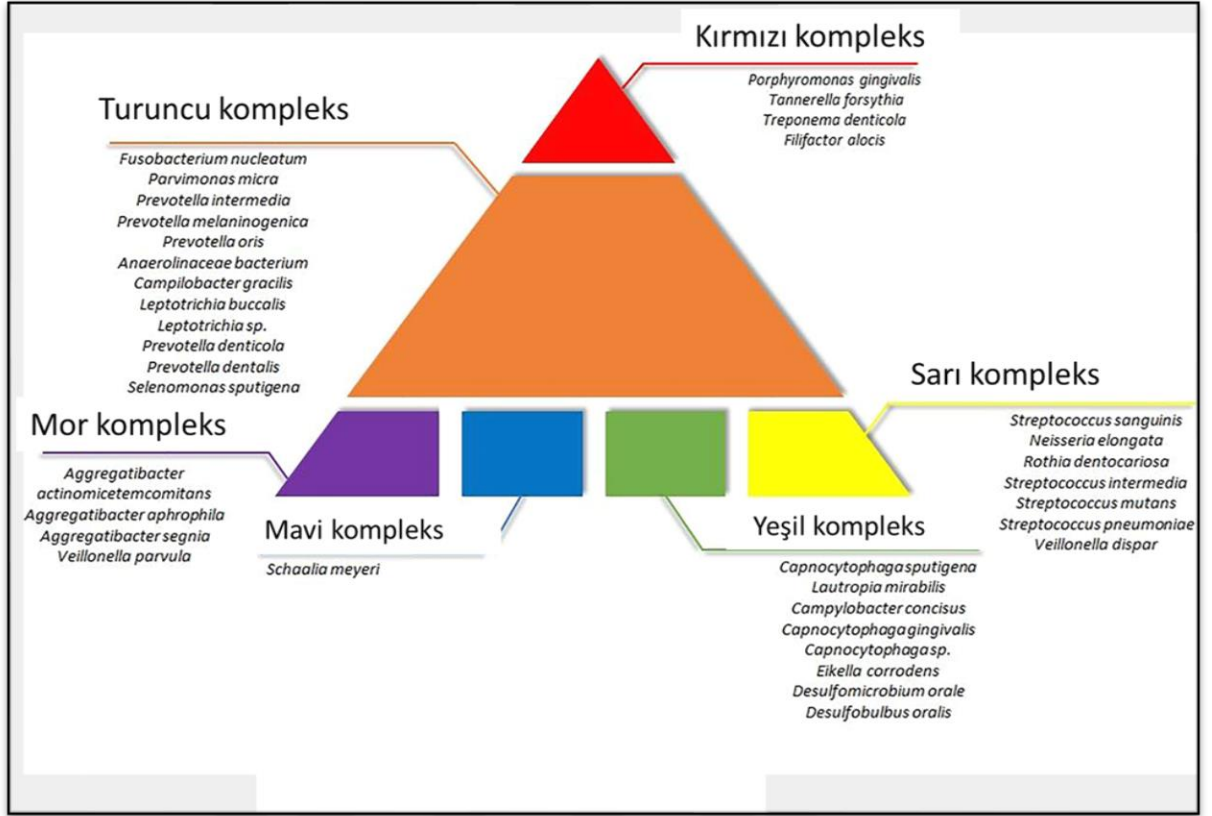
İnflamatuvar yanıt bir başka açıdan bakıldığında kompleman sistemi aracılığıyla üretilen mediyatörler tarafından düzenlenir. Kompleman sisteminin birer ürünü olan C3a ve C5a, lökositler ve mast hücrelerini etkileyerek histamin salınımına ve takip eden vasküler değişiklikler meydana gelmesine sebep olur. İlerleyen inflamasyonla mast hücrelerinin sayısı artar. Mast hücrelerinden akut ve kronik inflamatuvar cevabı düzenleyen IL-1 β , TNF- α , interlökin-6 (IL-6), interferon gama (IF- γ) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediyatörler salgılanır. Bu proinflamatuvar mediyatörler

karaciğerde hepatositleri uyarır ve akut faz proteinleri üretilir. Akut faz proteinleri mikroorganizmaları etkisiz hale getirerek konak immün cevabına katılır. PMNL birikimiyle birlikte MMP'lerin ortama salınması ekstrasellüler matriks yıkımına sebep olur. Ekstrasellüler matriksin yıkımının görüldüğü evrede hastalığıdaki yıkım epitel ve yumuşak dokusu ile sınırlıdır. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte aktive olan makrofajlar ve fibroblastlardan salınan MMP, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi moleküller iltihabi yanıtı güçlendirirler. PGE2 ve reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) gibi osteoklastogenezi düzenlenmede görevli moleküllerin de üretilmesiyle alveol kemiği yıkımına yol açarlar. Bu aşamada doku harabiyeti yumuşak dokulardan kalsifiye dokulara doğru ilerler ve periodontitis gelişmeye başlar (Page & Kornman, 1997; Cekici ve ark., 2014).

4.1.2. Periodontal hastalık patogeneğinde öne çıkan bakteriler

Periodontal hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde etkili olan mikrobiyal dental plak içerisinde 700'den fazla mikroorganizma olduğu bilinmektedir (Deo ve ark., 2019). Bu mikroorganizmalar periodontitisin gelişimine çeşitli derecelerde katkıda bulunurlar. Socransky ve ark. (1998) periodontitis mikrobiyolojisinde rol oynayan bakterileri bulundukları bölgelere, hastalığın gelişim evrelerine ve patojenitelerine göre değişik renk gruplarına ayırarak sınıflamıştır. Plak oluşum evresinde erken dönemde bulunan ve genelde sağlıklı dişeti bölgesinde görülen aerob oral streptokoklar ve birkaç fakültatif gram (-) rod türlerini içeren mikroorganizma topluluğu sarı ve yeşil kompleks olarak adlandırılmaktadır. İkinci seviye periodontal patojenler olarak kabul edilen turuncu kompleks içerisinde yer alan *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter* ve *Prevotella* gibi anaerob türler bulunur. Bu patojenlerin varlığı sarı ve yeşil kompleksteki türlerin ortamda olmasına bağlıdır. Mor kompleks içerisinde ise *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bulunur. Patojenitesi en yüksek olan grup ise kırmızı kompleks adını almaktadır. Bu kompleks içerisinde *P.gingivalis*, *Treponema denticola* ve *Tannerella forsythia* gibi zorunlu anaerob bakteriler bulunur (Şekil 1) (Socransky ve ark., 1998).

Kırmızı kompleks bakteri grubu içerisindeki *P. gingivalis*, periodontitiste anahtar patojen olarak rol oynaması ile ön plana çıkmakta ve yıkımdan sorumlu esas patojen olarak gösterilmektedir (Hajishengallis, 2015). Ayrıca gerek kendisi gerekse ürünlerinin vücutta dolaşım yoluyla beyin ve kalp gibi hayati organlarda da saptandığı gösterilmiştir (Dominy ve ark., 2019; Bahar ve ark., 2021). Bu yönüyle *P. gingivalis* periodontal hastalıkların sistemik hastalıklarla ilişkilendirilmesi açısından öne çıkan bakterilerdendir.



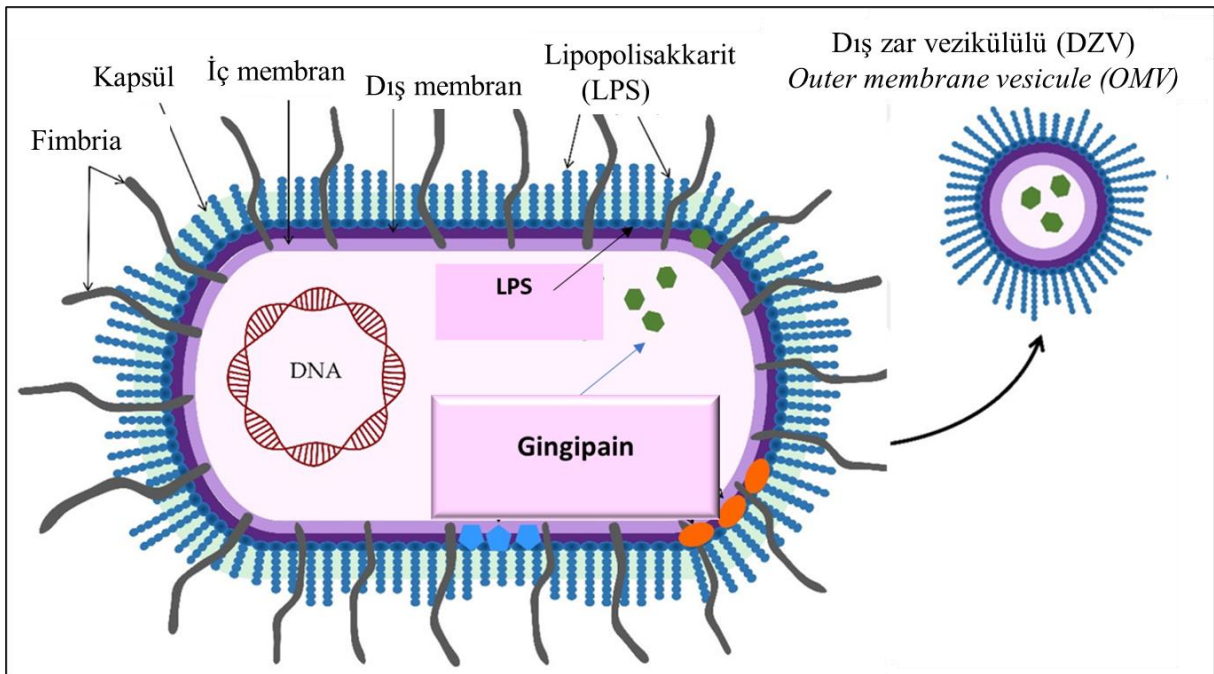
Şekil 1. Mikrobiyal komplekslerin şematik olarak gösterilmesi (Socransky ve ark., 1998' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.2. *Porphyromonas Gingivalis* ve Virulans Faktörleri

P. gingivalis kanlı agarda siyah koloniler oluşturan Gram-negatif, anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir (Xu ve ark., 2020). Subgingival alanda başarılı şekilde kolonize olan ve kırmızı kompleks içerisinde yer alan bu bakteri, kronik periodontitis hastalarından alınan subgingival örneklerde %85,75 oranında tespit edilmiştir (How ve ark., 2016). Periodontitiste kilit taşı patojen olarak kabul edilen *P. gingivalis*, virulans faktörleri aracılığıyla kommensal bakteri popülasyonunu yeniden düzenleyerek disbiyozise neden olmasının yanı sıra immün yanıt üzerinde de regüle edici etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Hajishengallis, 2015; Olsen ve ark., 2017).

Bakteriler evrimleri boyunca yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli konak reseptörleriyle etkileşime girerek inflamatuvar sinyal yollarını, kompleman sistemini, hücre döngüsünü ve apoptozu değiştirmek gibi çeşitli ve karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar, tüm ekosistemi düzenlemek ve dokularda kalıcı olmak için bakterinin konak immün yanıtını değiştirmesine veya bakterinin çevresini organize etmesine yardım eder. *P. gingivalis*'in hayatta kalma taktikleri ve patojenitesi, hem yapısal (lipopolisakkarit, fimbria) hem de salgı elementlerini (gingipainler ve diğer enzimler) içeren çok sayıda virulans faktörüne

bağlıdır. Genel anlamda virulans faktörleri belirli organizmalar (bakteri, virüs, mantar ve protozoa gibi) tarafından yaşam döngülerinin farklı aşamalarında konağa zarar verebilmesi için üretilen molekülleri ifade eder. Bu faktörler bir taraftan mikroorganizmaların patojenitesini artırır ve kolonizasyonlarını kolaylaştırırken diğer taraftan da bağışıklık sisteminden kaçması ya da onu baskılaması, konak yoluyla besin elde edebilmesi ve diğer virulans faktörlerinin de salınması gibi çeşitli işlevlerde rol oynarlar (Jia ve ark., 2019; Xu ve ark., 2020). *P. gingivalis* virulans faktörleri arasında membran lipopolisakkaridi, fimbria, kapsül, dış zar vezikülü (DZV), kolejenazlar, proteinazlar ve bunların içinde öne çıkan gingipainler sayılmaktadır (Şekil 2) (Aleksijević ve ark., 2022).



Şekil 2. *Porphyromonas gingivalis* ve virulans faktörleri (Aleksijević ve ark., 2022' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.2.1. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit (LPS), Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan ve kimyasal olarak O-spesifik bir zincir, bir çekirdek oligosakkarit ve lipid A olarak adlandırılan bir lipid bileşeninden oluşan moleküllerdir (Schromm ve ark., 2000). Bu endotoksinler, TLR tarafından tanınarak inflammatuar yanıtın başlamasında rol oynarlar (Kawai & Akira). LPS'in iskeletini oluşturan lipid A kısmı toksisite oluşturmada önemlidir ve farklı formlara sahip olup, LPS'in virulans özellikleri Lipid A bileşeni tarafından belirlenir (Darveau ve ark., 2004). Periodontitiste konak hücre elemanlarının *P. gingivalis*'e yanıtı, ona ait LPS içerisindeki lipid A'ya karşı gelişen

reaksiyon ile başlatılır. Daha sonra diğer patojenlerle birlikte kolonize olarak periodontal hastalığın ilerlemesine uygun bir ortam yaratılır (Herath ve ark., 2011).

P. gingivalis LPS'i ile indüklenen TLR aracılığıyla gelişen immün ve inflamatuvar yanıt çalışmalarda kapsamlı bir şekilde araştırılmakla birlikte aktive edici sinyalizasyon mekanizması hala tartışmalıdır. Bazı raporlar, TLR4'ün öne çıkan bir işlevi olduğunu gösterirken, diğerleri TLR2'nin ana reseptör olduğunu belirtmişlerdir (Wang & Ohura, 2002). Yapılan araştırmalar spesifik TLR'in LPS tarafından bağlanması ve aktivasyonunun, LPS molekülünün çekirdek bileşeni olan farklı lipid A türlerinin yapısı tarafından belirlendiğini ortaya koymuştur. Lipid A yapısındaki küçük değişiklikler bile bağışıklık yanıtlarını etkileyebilmektedir (Dixon & Darveau, 2005). *P. gingivalis* LPS'in lipid A heterojenliği, bakterinin konak yanıtından kaçabilmesinde, bakteri kolonizasyonunda ve oral mikrobiyomun oluşmasında önemli role sahiptir (Zenobia ve ark., 2014). Bu bahsedilen nedenlerden dolayı *P. gingivalis*'in en önemli endotoksinlerinden birisi diğer mikroorganizmalarda olduğu gibi LPS olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.2.2. Fimbria

P. gingivalis fimbriaları bakterilerin hücre zarından uzanan ince, filamentli yapılardır. Bu yapılar bakterilerin hareketliliğine, konak hücrelerine adezyonuna, biyofilm oluşumuna ve konakta yayılmasına katkıda bulunurlar. *P. gingivalis* tarafından majör ve minör fimbria olmak üzere iki tip fimbria üretilir. Farklı amino asit bileşimlerine ve antijenik özelliklere sahiptirler ve periodontitiste *P. gingivalis* patojenitesinde ve ona karşı gelişen immün yanıtta önemli rol oynamaktadır. Fimbriaların görünüme ve konak hücrelerine yapışma yeteneklerine göre farklı *P. gingivalis* suşları gelişebilmektedir (Amano, 2010).

P. gingivalis fimbriaları bakterinin konak hücrelerine ve oral dokulara adezyon kabiliyetindeki rolünün yanı sıra diğer oral bakterilerle etkileşimlerinde de rol oynar ve birden fazla bakteri türünün yer aldığı biyofilmlerin oluşumunda etkindir. Çalışmalarda, *P. gingivalis*'in fimbrialarının *Actinomyces viscosus*, *Treponoma denticola*, *Streptococcus gordonii* ve *Streptococcus oralis* gibi diğer oral bakterilerle birlikte kolonizasyonu kolaylaştırabildiği gösterilmiştir. Fimbriae, epitel, endotel ve immün hücrelerdeki sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini, bu hücrelerdeki reseptörleri aktive ederek uyatabilmektedir. Spesifik olarak, majör fimbriaların transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B) TLR2 yoluyla aktive ettiği ve TNF- α , IL-1 β , IL-8 ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini uyardığı gösterilmiştir. Salgılanan bu sitokinler osteoklast öncü hücrelerinin osteoklastlara

farklılaşmasını da teşvik etmektedir ve bu da kemik rezorpsiyonu sürecini hızlandırır (Xu ve ark., 2020).

4.2.3. Kapsül

Kapsül, bakterilerin konağın bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını önleyen bir bariyer görevi görerek bakterileri çevreleyen ve koruyan kalın bir polisakkarit tabakasıdır. *P. gingivalis* kapsülü bakteriyi antibiyotiklerin, bakteriyosinler ve lizozimler gibi diğer konak savunma mekanizmalarının etkisinden korur. Ayrıca kapsülün biyofilm oluşumunda rol oynadığı da bilinmektedir. *P. gingivalis*' in konak hücrelerine adezyonuna katkı sağladığı, ağız boşluğunda kolonizasyonun ve kalıcılığının artmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Konağın fagositoz çabasını inhibe etme yeteneği ile bakterinin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardım eder ve dişeti dokusuna invaze olarak iltihaplanma ve doku yıkımında rol oynar. Sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı daha da şiddetlendirebilir (Amano, 2010; Xu ve ark., 2020). Hayvan modeli deneyleri, kapsüle sahip *P. gingivalis* suşlarının kapsülsüz olanlardan önemli ölçüde daha az virulans özellikte olduğunu göstermiştir (Katz ve ark., 1996; Xu ve ark., 2020)

4.2.4. Proteinazlar

P. gingivalis, konak savunmasından korunmak için kolajenaz, hiyaluronidaz, mukopeptidaz, deoksiribonükleaz (DNaz), ribonükleaz (RNaz) gibi bir dizi proteinaz enzimi üretir. Bunlar içerisinde en kuvvetli antijen etkiyi gösteren enzim sistein proteaz yapısında olan ve gingipain adı verilen ekstraselüller proteinazlardır (Jia ve ark., 2019).

4.2.4.1. Kolajenazlar

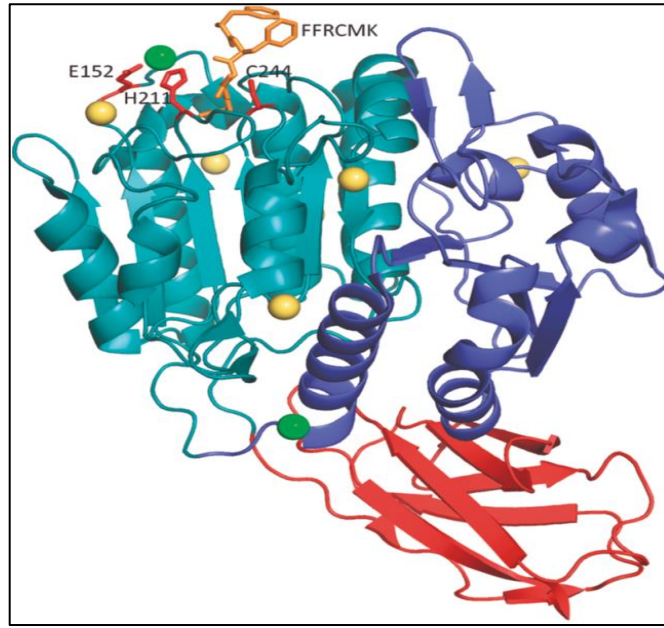
Kolajenazlar kolajendeki peptit bağlarını parçalayan enzimlerdir. Bakterilerin patogeneğinde hücre dışı yapıları yok etmede rol oynarlar. Periodontal dokularda esas baskın olan kolajen tipi Tip I kolajendir. Bu kollajen X ve Y'nin sırasıyla prolin ve hidroksiprolin olduğu Gly-X-Y üçlü dizisinden zengin üç adet sarmal polipeptit zincirinden oluşur. Hidrojen bağı ve moleküller arası disülfid bağları ile stabilize edilen bu üçlü sarmal yapı molekülü proteolitik enzimlere karşı oldukça dirençli hale getirir. Periodontal hastalıklarda, inflamatuvar durumdaki artışla birlikte hem bakteriye ait kolajenazlar hem de konak savunmasına ait enzimler birlikte hareket ederek bağ dokusu ve kemikteki kollajeni parçalarlar ve periodontal dokuları yıkıma uğrattırlar (Houle ve ark., 2003).

4.2.4.2. Gingipain

P. gingivalis, virulans faktörlerinden hücre duvarının yapısal antijenleri ve kapsül polisakkaritlerinin yanı sıra, serumun yıkıcı etkisinden korunmak için kollajenazlar ve proteaz enzimleri salgılar. En kuvvetli patojenik etkiyi gösteren enzim ise *P. gingivalis* proteazlarından sistein proteaz yapısında olan ve gingipain adı verilen ekstraselüller enzimlerdir (Jia ve ark., 2019).

Gingipainler konağa ait proteinleri denatüre ederler ve immun yanıtı değiştirme kabiliyetine sahiptirler. Gingipainler, argininin karbonil grubundaki peptit bağlarını hidroliz eden arginin-spesifik gingipainler (RgpA ve RgpB) ve lizin proteininin C-terminalindeki polipeptitleri parçalayan lizin-spesifik gingipainler (Kpg) olmak üzere 2 esas grupta toplanır (Şekil 3) (Li & Collyer, 2011). RgpA, RgpB'e göre ek bir hemaglutinin alanına sahiptir (Gibson III & Genco, 2001). Gingipainler *P. gingivalis*'in ekstraselüler proteolitik aktivitesinin büyük bir kısmından sorumludurlar. Bir yandan konağa ve biyofilm içerisindeki diğer bakterilere adezyonunda ve koagregasyonda rol oynar, diğer yandan parçalayıcı etkisi sonucu ortaya çıkan artık moleküllerle diğer bakterilerin besin ihtiyaçlarını karşılamış olurlar. Fibrinojen/fibrini parçalayarak pıhtılaşmada bozulmalara, kanamada artışa ve dişeti dokusunun harabiyetine neden olur. Bu şekilde açığa çıkan hemoglobin ve haptoglobin gibi konak demir taşıyıcı proteinleri bakteri için önemli bir besin kaynağı olup, büyüme ve çoğalmasında önemlidir (Xu ve ark., 2020).

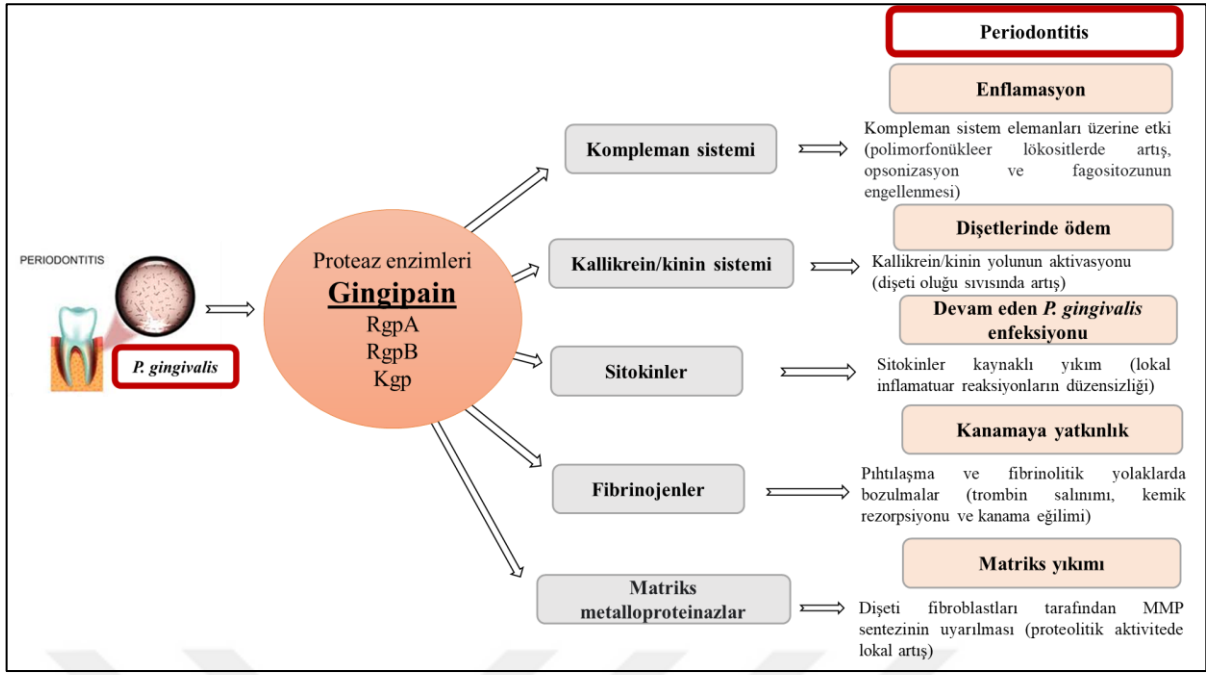
Gingipainler, C3, C4 ve C5 proteinlerini parçalayarak kompleman kaskadını da bloke ederler. Sonrasında inflamasyonu arttırıcı etkiye sahip C3a, C4a ve C5a üretilir. Bir taraftan da C3b'i parçalayan gingipain, bakterinin opsonizasyonu ve fagositozunu önler. C5b üzerinde de parçalayıcı etkisi olan gingipainler konak hücresinde oluşacak olan membran saldırı kompleksi oluşumunu da önleyerek bakterinin konak savunmasından korunmasında etkili olur. Böylelikle ortamda daha genel bir inflamasyon oluşumunda etkin olan C3a, C4a ve C5a baskın hale gelir (Jia ve ark., 2019; Xu ve ark., 2020).



Şekil 3. Gingipainin yapısal görünümü (Li & Collyer, 2011' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Gingipainin konak cevabı üzerindeki proteolitik etkisi, inflamasyonun şiddetlenmesine sebep olarak periodontitisin gelişmesinde ve ilerlemesinde önem taşımaktadır. Konak cevabında etkili olan mekanizmalardan kompleman sistemini etkilediği gibi kallikrein/kinin sistemini de etkiler. Dişeti oluğu sıvısında artışa ve dişetlerinde ödeme sebep olurlar. Devam eden enfeksiyon sonucu gingipainler inflamatuvar yanıtta aşırı sitokin salımına sebep olarak periodontal dokularda harabiyete neden olurlar. Bir yandan da fibrinojenler üzerinde etki ederek pıhtılaşma ve fibronolitik yollarda bozulmalarla birlikte dişetlerinde kanamaya yatkınlık ve sonuç olarak kemik rezorpsiyonuna katkıda bulunur. Gingipainler dişeti fibroblastları tarafından MMP'in salgılanmasını uyararak lokal proteolitik aktivitede artışa neden olurlar ve kollajen yıkımı uyarılır. Buna bağlı olarak ekstrasellüler matriste ve periodontal ligamentlerde yıkım meydana gelmektedir (Şekil 4) (Fitzpatrick ve ark., 2009).

Son yıllarda *P. gingivalis*'in virulans faktörleri içerisinde özellikle gingipainlerin önemini vurgulayan çalışmaların sayısı artmaktadır. Gingipaini öne çıkaran bu çalışmalar genellikle ya canlı *P. gingivalis* kullanıp gingipain blokerleri kullanılan ya da gingipain salgılayamayan mutant *P. gingivalis* kullanılan çalışmalardır (Farrugia ve ark., 2021; Widziolek ve ark., 2016). Doğrudan gingipainin etkisini in vivo şartlarda araştıran çalışmalar ise sayıca daha azdır (Gibson III & Genco, 2001; Wilensky ve ark., 2017). Fare modeli kullanılarak aşı çalışması yapılan bir araştırmada *P. gingivalis* nedenli kemik kaybına karşı koruma sağlanıp sağlanamayacağı araştırılmıştır.



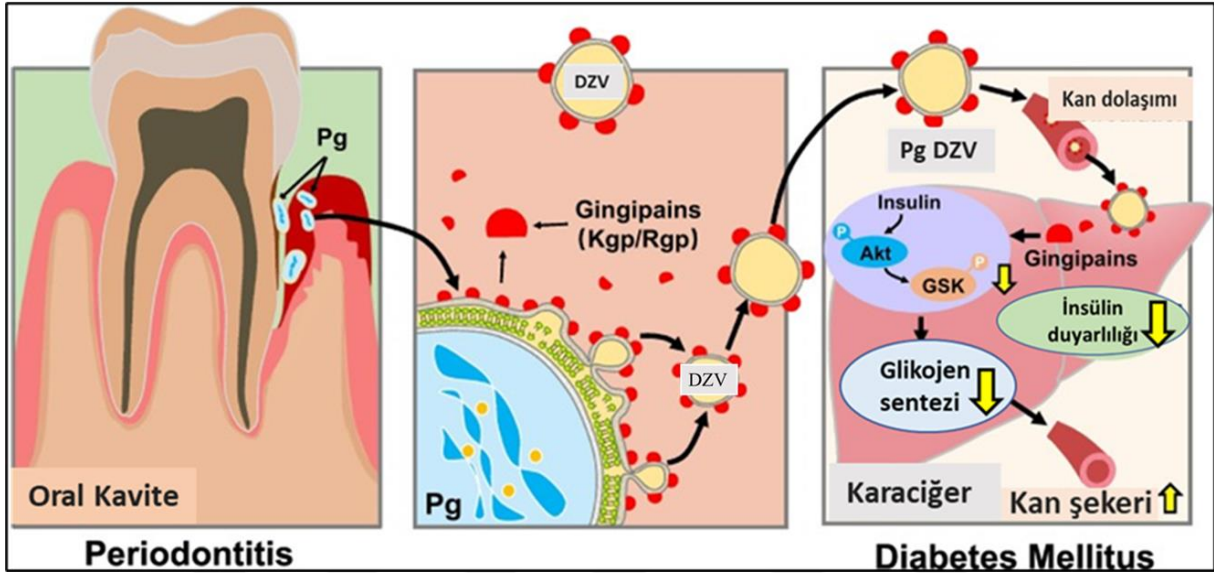
Şekil 4. Gingipainin konak cevabı üzerindeki proteolitik etkisinin periodontitis gelişimi ve ilerlemesindeki rolü (Fitzpatrick ve ark., 2009’ dan yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Sonuç olarak sadece doğal *P. gingivalis* veya RgpA ile aşılana hayvanların maksiller kemik kaybından korunduğu gösterilmiştir (Gibson III & Genco, 2001) Yine farelerde yapılan bir başka aşı çalışmasında ise, gingipainler içerisinde RgpA’nın immun yanıtta değişikliğe yol açtığı öne çıkarılmış ve gingipainlerin önemi vurgulanmıştır (Wilensky ve ark., 2017).

Bu çalışmaların yanında gingipainlerin aynı zamanda sistemik hastalıklarda da ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Widziolek ve ark., 2016; Dominy ve ark., 2019). *P. gingivalis*’in ve daha spesifik olarak gingipainlerin, Alzheimer hastalarının beyin lezyonlarında tespit edilmesiyle bu hastalığın gelişiminde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Dominy ve ark., 2019). Bir başka çalışmada ise karaciğer dokularında tespit edilen gingipain diyabet ve yüksek kan şekeri ile ilişkilendirilmiştir (Seyama ve ark., 2020).

P. gingivalis ile enfekte farelerde yapılan bir araştırmada hepatik glikojen sentezinin azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, ağız boşluğunda bulunan *P. gingivalis*’in karaciğer hücrelerinde insülin duyarlılığını azaltarak hepatik glikoz metabolizmasını etkilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, PCR ile hepatik dokuda *P. gingivalis*’e ait DNA saptanmasına rağmen, elektron mikroskobu altında bütün bakteri gözlenememiştir. Bu çalışmaya dayanarak *P. gingivalis*’in karaciğer hücrelerinin insülin duyarlılığını nasıl bozduğuna ve DM durumunu nasıl kötüleştirdiğine dair tanımlanamayan bir mekanizma olduğu fikriyle ve bakterinin endotoksinlerinin bunda payı olabileceği düşüncesini ortaya koymuşlardır (Ishikawa ve ark., 2013). Seyama ve ark., (2020) gerçekleştirdikleri araştırmada, *P.*

gingivalis'in dış zarının tomurcuklanması ile Kgp/Rgp gingipainler gibi patojenik proteazların paketlenmesi yoluyla DZV'yi ortama saldıgını gösterdiler. DZV'ler, gingipainleri karaciğere iletir ve insülin sinyali gingipaine bağımlı bir şekilde zayıflatılarak hepatik glikojen sentezi azalır. Böylelikle, karaciğerdeki insülin duyarlılığı zayıflar ve kan şekeri düzeylerinde artış meydana gelir (Şekil 5) (Seyama ve ark., 2020). Bu araştırma, gingipainlerin DM patogenezindeki rolünü açıkça ortaya koymuştur.



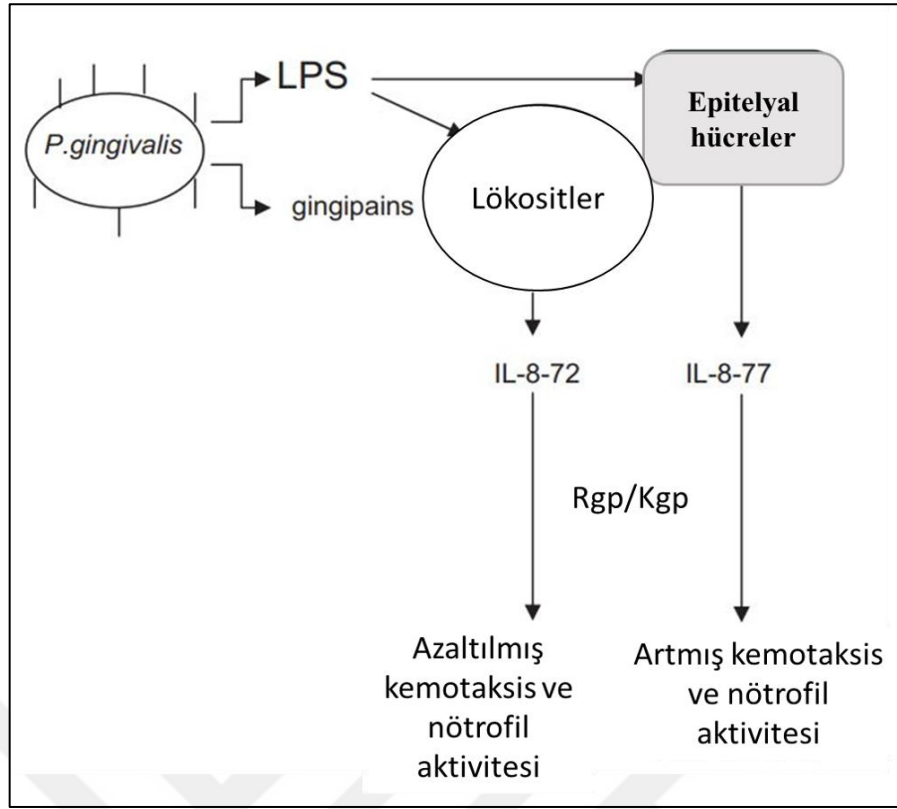
Şekil 5. Gingipainlerin glikoz metabolizması üzerindeki etkileri (Seyama ve ark., 2020' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.3. Periodontal Hastalıklar ve Sistemik Hastalıklar İlişkisi

Periodontal hastalıklar ve bazı sistemik hastalıklar, kronik inflamatuvar özellikleri yönüyle birçok noktada birbirleriyle çakışırlar. Bu ilişki incelendiğinde, periodontal enfeksiyona bağlı meydana gelen inflamatuvar yanıt, sistemik hastalıklarda meydana gelen inflamatuvar yanıtı arttırıcı etki gösterir ve sistemik hastalığın kontrolü zorlaşır. Diğer yönden mevcut sistemik hastalıklar nedenli yüksek inflamatuvar durum, periodontal enfeksiyonun gelişmesi ile birlikte periodontal dokularda meydana gelecek olan yıkıcı inflamatuvar yanıtı şiddetlendirir ve doku harabiyeti daha şiddetli gözlenir. Periodontal patogeneizde rol oynayan bakteriler ve ürünleri, dolaşım aracılığı ile sistemik inflamasyon kaskadında meydana getirebileceği değişikliklerle vücudun diğer bölgelerini etkileyebilir (Bui ve ark., 2019). Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, alzheimer ve parkinson hastalığı gibi sistemik hastalıklarla periodontal hastalıklar arasındaki çift yönlü etki çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Fowler ve ark., 2001; Martínez-García ve ark., 2021). Periodontal hastalıkların yeniden sınıflandırıldığı, 2017 yılında yapılan Avrupa Periodontoloji Derneği konferansında sunulan çalıştay raporunda sistemik

hastalıklar içerisinde özellikle diyabet varlığının sınıflamayı doğrudan etkileyerek, hastalığın bir ileri kademeye yükseltilmesine sebep olacağı belirtilmiştir (Chapple ve ark., 2018).

Periodontal patojenler içerisinde ise özellikle *P. gingivalis*'in kan dolaşımı yoluyla diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit ve Alzheimer hastalığı gibi sistemik hastalıklarla güçlü bir biçimde ilişkilendirildiği gösterilmiştir (Mei ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021). Periodontitisli bir hastada cep epiteli *P. gingivalis* gibi subgingival bakterilere ve ürünlerine maruz kalır. Özellikle *P. gingivalis*'in ürettiği gingipain gibi proteazlar epitelyal bütünlüğü bozarak bakteri LPS'i ve diğer endotoksinlerinin daha derin dokulara geçerek iltihabın yayılmasına ve genel dolaşıma girmesine neden olurlar. *P. gingivalis*, IL-8 dahil olmak üzere konak proinflamatuvar mediatörlerin üretimini uyarır. Konak epitel hücreleri tarafından salgılanan IL-8 enfeksiyon bölgesine daha fazla nötrofil göçüne neden olur ve bu hücreleri hiperaktif hale getirir. Diğer yönden, gingipainlere uzun süre maruz kalma, IL-8'in bazı formlarının bozulmasını tetikleyebilir, bu da kemotaksis ve nötrofil aktivitesini azaltabilir, böylece inflamatuvar durum daha da kronikleşir (Şekil 6) (Dias ve ark., 2008). Bu bölgeler sistemik hastalıklar için enfeksiyon odakları olarak işlev görmektedir. Bunlar, bir dizi akut faz proteininin ve inflamatuvar sitokinin üretimine yol açan akut faz yanıtını tetikler. Bu kimyasal mediyatörler periodontal patojenlerle birlikte dolaşımila uzak organlara ulaştığında ise ilgili organlarda problemler ortaya çıkar (Socransky ve ark., 1998; Cekici ve ark., 2014).



Şekil 6. Gingipain ile modüle edilmiş IL-8 yanıtının şematik gösterimi (Dias ve ark., 2008' den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.4. Hiperglisemi

Hiperglisemi, kan glukoz seviyesinin aşırı derecede artmasıyla karakterize metabolik bir durumdur. Kişinin genel sağlığı düşünüldüğünde, hiperglisemi belirli bir grup sistemik hastalığı doğrudan ilgilendirir. Bu hastalıklar içerisinde diyabet, obezite, hiperlipidemi ve hipertansiyon sayılabilir.

"Hiperglisemi" terimi, Yunanca hyper (yüksek) + glykys (tatlı/şeker) + haima (kan) kelimelerinden türetilmiştir. Hiperglisemi, açlık sırasında ölçülen 125 mg/dL'nin üzerinde ve yemekten 2 saat sonra ölçülen 180 mg/dL'nin üzerindeki kan şekeri. Bir hastanın açlık plazma glukozu 100 mg/dL ile 125 mg/dL arasında ise o kişi bozulmuş glukoz toleransına sahiptir ve pre-diyabet olarak da adlandırılır. Açlık kan şekeri 125 mg/dL'nin üzerinde olan bir kişi ise diyabetik hasta olarak adlandırılır. Hiperglisemi tedavi edilmediğinde göz, böbrekler, sinirler, kalp ve periferik damar sisteminde hasar gibi yaşamı tehdit eden birçok ciddi komplikasyona yol açabilir. Bu nedenle, hastalığın komplikasyonlarını önlemek ve gidişatını iyileştirmek için hiperglisemiye etkili ve verimli bir şekilde yönetmek hayati önem taşır (Mouri & Badireddy, 2022).

Hiperglisemi görülmesinde etkili olan faktörler azalmış insülin sekresyonunu, azalmış glukoz kullanımını ve artan glukoz üretimini içerir. Glukoz homeostazı, hepatik glukoz üretimi ile

periferik glukoz alımı ve kullanımı arasındaki dengedir. İnsülin, glukoz homeostazının en önemli düzenleyicisidir (Simon & Wittmann, 2019). Hipergliseminin ikincil nedenleri arasında pankreasın kronik pankreatit ve pankreas kanseri gibi nedenlerle zarar görmesi, Cushing sendromu, akromegali ve feokromastioma gibi periferik insülin direncine neden olan endokrin bozukluklar, glukokortikoidler, fenitoin ve östrojenler gibi ilaçların kullanımı, gebeliklerde insülin duyarlılığının azalmasından kaynaklanan ve gebelerin % 4'ünde ortaya çıktığı bilinen gestasyonel diyabet, total parenteral beslenme ve dekstrozu infüzyonu, postoperatif veya kritik hastalarda görüldüğü gibi reaktif gelişen hiperglisemi sayılmaktadır.

Hiperglisemi için başlıca risk faktörleri olarak

- Ailede T2DM öyküsü bulunması
- Gestasyonel diyabet öyküsü
- İstenilen vücut ağırlığının % 120'sinden fazla ağırlığa sahip olmak (obezite);
- Hiperlipidemi veya hipertansiyon varlığı;
- Polikistik over sendromu varlığı olarak sayılmaktadır (Mouri & Badireddy, 2022).

Hiperglisemi insidansı artan obezite, azalan aktivite düzeyi ve yaşlanan bir nüfus nedeniyle son yirmi yılda önemli ölçüde artmıştır. Hiperglisemi ile ilişkilendirilmiş sistemik problemler arasında başta diyabet olmak üzere obezite, hiperlipidemi ve hipertansiyon bulunur (Mouri & Badireddy, 2022). Bu hastalıklar içerisinde ise özellikle diyabet, periodontal hastalıkların yeni sınıflamasında kendisine yer edinerek hipergliseminin periodontal hastalıklarla doğrudan ilişkide olduğunun bir göstergesidir (Chapple ve ark., 2018).

4.4.1. Hiperglisemi risk faktörleri

4.4.1.1. Diabetes mellitus

Diabetes Mellitus (DM) gün geçtikçe toplumda görülme sıklığı artan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. İnsülin salgılamasına, insülin fonksiyonuna ya da her ikisindeki bir probleme bağlı olarak gelişir. Pankreastaki Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinde sentezlenen insülin hormonu enerji homeostazisini kontrol eder. İnsülin eksikliği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalara neden olmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2015 yılı verilerine göre dünyada erişkinler arasında 415 milyon

diyabetli hastanın olduğu ve 2040 yılında bu rakamın 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Bu oran her 10 erişkinden birisinin bu hastalıktan etkileneceğı anlamını taşımaktadır (Yuen ve ark., 2019). DM klinik belirtileri arasında poliüri, polidipsi ve polifaji, kilo kaybı ve güçsüzlük sayılmaktadır.

Türkiye Diyabet Vakfı'nın hazırladığı Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi'ne göre DM tanı kriterleri için aşağıdakilerden birine sahip olmak tanı konulması için yeterlidir;

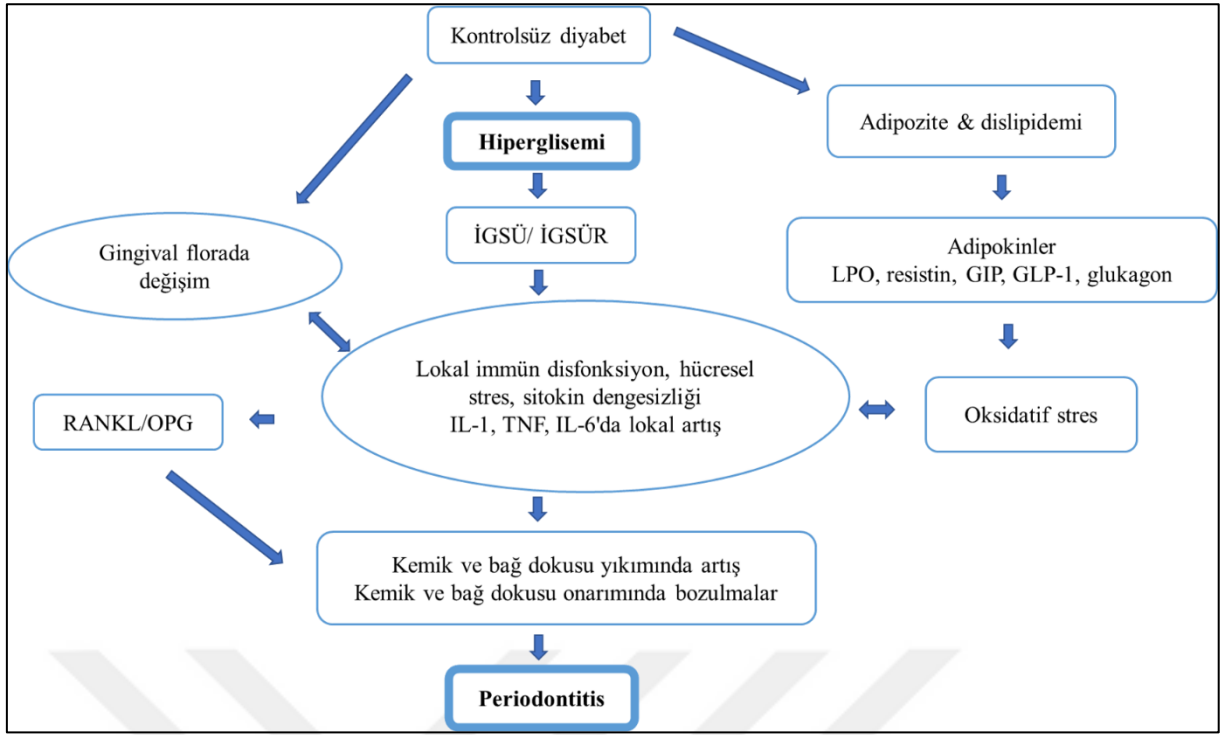
- 8 saatlik açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dl
- Diyabet semptonlarına ek rastlantısal plazma glukozu ≥ 200 mg/dl
- Oral glukoz tolerans testinde 2.saat plazma glukozu ≥ 200 mg/dl
- HbA1c ≥ 6.5 (American Diabetes Association, 2017).

Amerikan Diyabet Derneğı (ADA) tarafından yapılan sınıflamada DM'nin öne çıkan tipleri arasında tip 1 DM, tip 2 DM ve gestasyonel DM sayılmaktadır. Esasen genetik olarak geçiş gösteren, pankreastaki beta hücrelerine karşı gelişen otoimmüniteye bağılı olarak meydana gelen, insülin yetersizliğine bağılı gelişen ve genellikle gençlerde görülen tipi Tip 1 DM olarak isimlendirilir ve toplumdaki diyabet vakalarının %5-10'nunu oluşturmaktadır. Daha çok insülin direncine bağılı gelişen ya da insülin salınımının normale göre az olduğı ya da her ikisinin de birlikte gerçekleştiğı durumlarda meydana gelen tipine ise T2DM denir ve diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturur. Gebelikte ortaya çıkan glikoz intoleransı olarak bilinen tipi ise gestasyonel diyabet olarak adlandırılır. T2DM gelişme riskini yaş, obezite, sağlıksız yaşam tarzı ve önceden geçirilmiş gestasyonel DM gibi birçok faktör arttırmaktadır. Hastaların çoğunda aşırı kilo veya obezite mevcuttur. Bu sebeple fazla kilonun insülin direncine neden olduğı düşünülmektedir (American Diabetes Association, 2017).

Periodontal hastalıklar ve DM birlikte düşünüldüğünde ortak özellik vücutta yarattığı yüksek inflamasyon seviyesidir. Kronik hiperglisemi birçok farklı yollardan vücuttaki sistemik inflamasyonu, oksidatif stresi ve programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) artırmaktadır (Brownlee, 2005). Bunun sonucu olarak vücutta makro ve mikrovasküler komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Uzun dönemde görme kaybı ile sonuçlanabilecek olan retinopati, böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, ayak ülserleri ve amputasyona kadar varan periferik nöropati, gastrointestinal, genitoüriner ve kardiyovasküler semptomlara neden olan otonom nöropati gibi komplikasyonlar gelişebilir. DM'li bireylerde yara iyileşmelerinde gecikmeler ve değişen kemik yoğunluğuna bağılı olarak meydana gelen kırılmalar da komplikasyonlar arasında

izlenebilir (Forbes & Cooper, 2013; Alić ve ark., 2017) Hiperglisemi ve diyabete bağlı yüksek inflamasyon seviyesi periodontal dokulardaki lokal faktörlere bağlı gelişen inflamatuvar cevabı daha da şiddetli hale getirmektedir. Bunun yanında diyabetik hastalardaki polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) fagositoz, kemotaksis ve bakterisidal fonksiyonlarındaki bozukluklar vücudun bakteriyel enfeksiyona karşı direncinde de zayıflamaya neden olur. Buna bağlı olarak periodontal enfeksiyonlarla baş edebilme kabiliyeti diyabetik hastalarda daha düşüktür. Bu nedenle kontrol altında olmayan diyabetik hastalarda peridontal müdahalelerde profilaksi rutin hale gelmiştir. Bunun tam tersi de söz konusudur. Hem diyabetli hem de şiddetli kronik periodontitis hastalarında, PMNL kemotaksis kabiliyeti ve apoptozis hafif kronik periodontitisli ya da sağlıklı periodonsiyuma sahip hastalara göre oldukça bozulmuş durumdadır. Gerekli işlevlerini yerine getirememelerine bağlı olarak, dokulardaki PMNL varlığı gereğinden daha uzun süreli hale gelmekte, bu da ortamdaki reaktif oksijen türevlerinin (ROT) ve MMP seviyesinin normalin çok üstünde olmasına neden olmaktadır (Shetty ve ark., 2008). Buna ilave olarak diyabette meydana gelen mikro ve makrovasküler bozuklukların esas sorumlusu olarak gösterilen ileri glikasyon son ürünlerinin (İGSÜ) periodontal dokulardaki varlığı da bu iki yönlü ilişkiyi açıklayan mekanizmalardan biridir. İGSÜ non-enzmatik olarak bazı lipid ve protein moleküllerinin glikozillenmesiyle oluşan komplekslerdir. Bunlar damar duvarlarına yapışarak vasküler komplikasyonlara neden olurlar. Gingival makrofajların İGSÜ'ler için yüksek afiniteli ileri glikasyon son ürünleri reseptörlerine (İGSÜR) sahip olduğu gösterilmiştir. Periodontal dokularda yüksek oranda İGSÜ komplekslerinin bulunması buralardan epizodik bir şekilde dolaşıma sürekli pro-inflamatuvar molekül salınımına neden olmaktadır. İGSÜ'lerin makrofajlardaki reseptörlerine bağlanması aşırı derecede IL-1 β , TNF- α ve IL-6 salgılanmasına neden olur. Bunun sonucu olarak dokulardaki akut faz proteinleri ve ROS seviyesi artmakta, artan oksidatif stres sonucu vasküler komplikasyonlar meydana gelmekte ve diyabetin komplikasyonları ortaya çıkmaktadır (Chapple ve ark., 2013; D'aiuto ve ark., 2010; Polak & Shapira, 2018).

Kontrolsüz diyabete sahip bireylerde artan periodontitis şiddetinin biyolojik mekanizmalarına ilişkin veriler incelendiğinde bu ilişkide mikrobiyal faktörler, sitokinler ve adipokinler, immün hücre fonksiyonları, hiperglisemi ve alveolar kemik homeostazının rol oynadığı görülmektedir (Şekil 7) (Polak & Shapira, 2018).



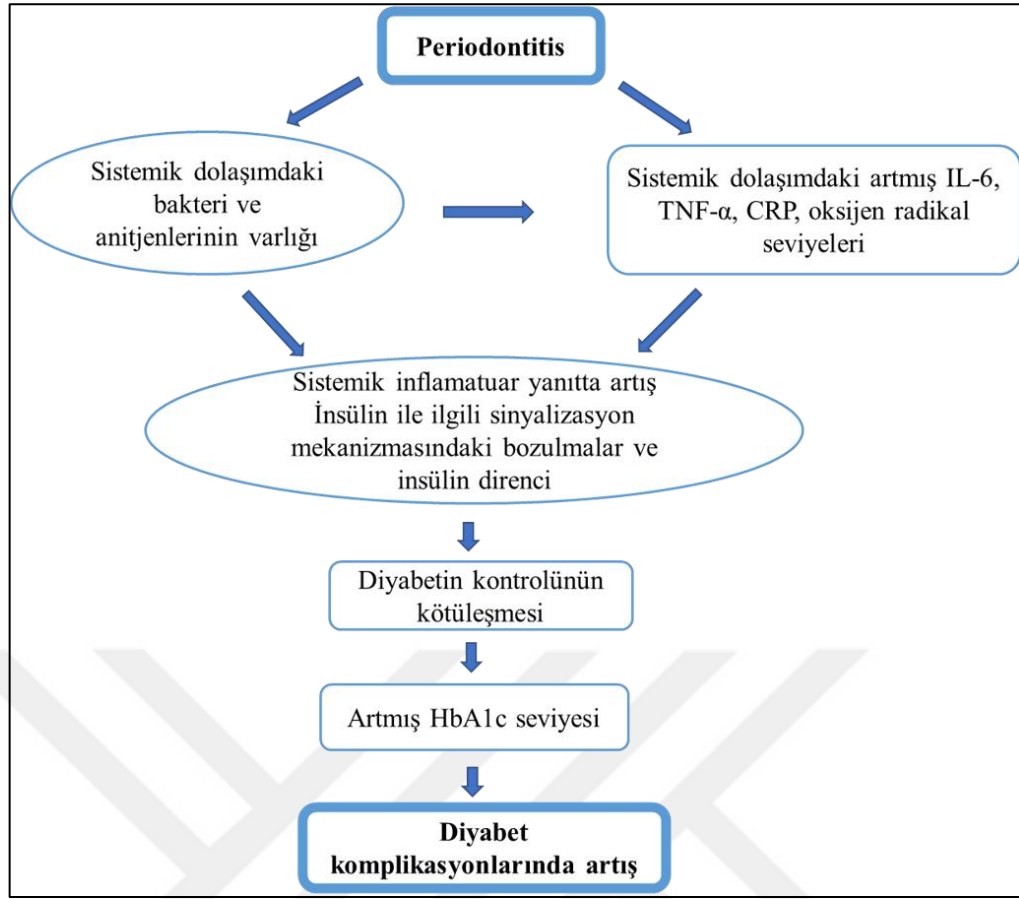
Şekil 7. Kontrolsüz diyabetin periodontitis üzerindeki negatif etki mekanizması (Polak & Shapira, 2018’ den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

Kontrolsüz diyabet sonucu mikrobiyal florada değişimler meydana gelir. Bu değişim ile birlikte periodontal durumun kötüleşmesine yol açan IL1- β , TNF- α , IL-6, RANKL/OPG ve oksijen metabolitlerinin periodonsiyumdaki seviyelerinde artış görülür. Öte yandan, diyabet ve periodontitise sahip bireylerde dolaşımda yüksek seviyelerde TNF- α , CRP ve oksidatif stres elemanları görülür. Yüksek seviyelerde ortaya çıkan inflamasyon elemanları diyabetin kontrol altına alınmasında güçlük meydana getirir. Ancak başarılı uygulanan bir periodontal tedavi bu değerlerin seviyelerini düşürür ve diyabetin kontrol altına alınmasına katkı sağlar (Polak & Shapira, 2018).

Sadece periodontitisli hastalara kıyasla diyabetli ve periodontitisli hastalarda IL-1 β , IL-6 ve RANKL/OPG oranlarının yükseldiği tespit edilmiştir. Bu sitokinler içerisinde IL-1 β ’nın diyabetin majör iki tipinde de glisemik kontrolle periodontitis ilişkisinde rol almada TNF- α ’ya kıyasla öne çıktığı görülmektedir. Klinik, hayvan ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen derleme çalışmasındaki veriler, diyabet gibi hiperglisemik durumların enfekte periodontal dokularda hiperinflamatuvar bir durumu indüklediğini güçlü bir şekilde göstermektedir. Diyabet ve periodontal hastalıkların patogenezinde kemik rezorpsiyonunda rol oynayan moleküllerin etkisi olduğu gösterilmiştir. Diyabette RANKL/OPG eksenindeki değişikliklerin ve inflamatuvar statünün diyabetli bireylerde periodontitis sırasında alveolar kemik kaybında rol oynadığı görüşünü desteklemektedir (Taylor ve ark., 2013; Polak & Shapira, 2018).

Hiperglisemik durum ve dişeti dokusunda yüksek seviyelerde İGSÜ görölmesi ile periodontal ligament fibroblast hücrelerinin de etkilendiği inflamatuvar durum tetiklenir. Fibroblastların da dahil olduğu bu inflamatuvar durum, yüksek seviyelerde TNF- α , IL-6 ve IL-1 β salgılanması, TLR'lerin aktivasyonu, apoptoz ve adezyon ve diğer moleküllerinin ekspresyonunu içerir. Periodontal ligament fibroblast fonksiyonlarındaki bu değişiklikler, klasik inflamatuvar hücrelere ek olarak, periodontitis ile DM şiddetlenmesinin patogeneğinde rol oynayabilir. Taylor ve ark. (2013) derleme çalışmasında, diyabetteki hipergliseminin hücreler üzerinde doğrudan proinflamatuvar ve oksidan etkileri olabilen İGSÜ komplekslerinin geri dönüşümsüz oluşumuna neden olduğu sonucuna varmıştır. Daha da önemlisi, İGSÜ'ler sinyal reseptörü İGSÜR'ye bağlandığında, hücrelerin fenotip ve fonksiyonları kritik bir şekilde etkilenir, İGSÜ'lerde artış görülür ve yüksek inflamasyon ve oksidatif stres seviyesi ile birlikte doku yıkımları meydana gelir. Yıkım ile birlikte periodonsiyumda proinflamatuvar sitokinler seviyesi ile oksidatif hasarın bir göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeylerinin sistemik dolaşımdaki seviyelerinde de artış görölmektedir. Periodontal enfeksiyon, diyabet hastalarında bu kısır döngüyü daha da güçlendirir ve daha şiddetli periodontal yıkıma yol açar (Bastos ve ark., 2012, Taylor ve ark., 2013; Polak & Shapira, 2018).

Diyabet ve periodontitis ile ilgili yapılan klinik çalışmalar, glikoz veya HbA1c seviyeleri ölçümleri ile değerlendirilen diyabet kontrolünün periodontitisten etkilendiğini göstermektedir. Periodontitisin diyabet kontrolü üzerindeki etkisi, periodontal inflamasyonda rol oynayan moleküllerin sistemik dolaşıma katılmasından kaynaklanabilir ve sistemik inflamatuvar duruma neden olabilir. Periodontal inflamasyon ve glikoz homeostazı arasında potansiyel anahtar faktörler içinde oksijen radikallerinin yanı sıra IL-6, TNF- α ve CRP yer alır. Sistemik inflamatuvar yanıtta artış sonucu ortaya çıkan bu moleküller insülin ile ilgili sinyalizasyon mekanizmalarındaki bozulmalar ve insülin direnci ile ilişkilidir. HbA1c seviyelerinde değişikliklere yol açarak diyabet kontrolünün zorlaşmasına ve diyabete bağlı komplikasyonlarda artışa neden olurlar (Şekil 8) (Polak & Shapira, 2018).



Şekil 8. Periodontitisin diyabet kontrolünü zorlaştırmasındaki potansiyel mekanizmalar (Polak & Shapira, 2018’ den yararlanılarak hazırlanmıştır.)

4.4.1.2. Obezite

Obezite yağ dokusundaki anormal veya aşırı yağ birikmesinin vücut sağlığını olumsuz etkileyecek oranda görülmesi olarak tanımlanır. Obezite tanımlanmasında dünyada standart olarak kabul edilen Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ($\text{Ağırlık[kg]} / \text{Boy}^2 [\text{m}]$) (*Body Mass Index [BMI]*) ölçümü yapılmaktadır. İdeal VKİ 20 ile 22 arasında kabul edilirken, VKİ’nin 25’den yukarıda olması fazla kilolu, $\text{VKİ} > 30$ obezite olarak tanımlanır. Obezite ve aşırı kiloda esas sebep diyet yoluyla alınan enerji miktarı ile fiziksel aktiviteler ve metabolizma sırasında harcanan enerji miktarının dengesiz olmasıdır. Obezite kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve özellikle T2DM olmak üzere pek çok kronik iltihabi hastalık için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Kopelman, 2000). T2DM gibi obezite de insülin direnciyle ilişkilendirilir ancak obez bireylerde yeterli miktarda insülin salınımı mümkün olabileceği için her obez bireyde hiperglisemi görülmeyebilir. İnsülin direnci ile birlikte plazmadaki serbest yağ asitleri yükselir. Bu durum, kas hücrelerine glukoz transportunu azaltıp, yağların parçalanmasını arttırarak hepatik glukoz üretiminde artışa yol açar. Serbest yağ asitleri insülin direnci ve beta hücre fonksiyonunun bozulmasında rol oynar. Plazmada serbest yağ asitlerinin

yükselmesinin ardından insülin direnci oluşmaya başlar. Ortaya çıkan lipotoksosite ve glukoz toksisitesinin yanı sıra adipoz doku kaynaklı sitokinler de obezite ve insülin direnci gelişiminde rol oynar.

Obezitede TNF- α , IL-6 , CRP gibi inflamatuvar belirteçlerin seviyeleri sistemik dolaşımda artmış durumda olup kronik inflamatuvar bir durum söz konusudur. Vücutta birincil enerji depolama yeri olan yağ dokusu, sistemik inflamasyona katkıda bulunan çok sayıda proinflamatuvar sitokin üretir. Yağ dokusu ayrıca iştahı ve enerji harcamasını düzenleyen bir hormon olan leptin ile insülin duyarlılığını artıran ve antiinflamatuvar özelliklere sahip bir hormon olan adiponektin üretir. Obez bireylerin düşük adiponektin seviyelerine ve artmış leptin seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir, bu da kronik düşük dereceli inflamasyona katkıda bulunabilir (Al-Goblan ve ark., 2014).

Obezite periodontitis ile yüksek inflamasyon seviyesi açısından ilişkilendirilmiştir. Periodontal hastalıklardaki bakteriler bu ilişkide inflamasyon için sürekli bir kaynak oluşturmaktadır. Buna ilave olarak obezitede yağ dokusu kaynaklı sitokin ve hormonların iki hastalık arasındaki ilişkide anahtar role sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Periodontitis ve obezitede IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve CRP gibi inflamatuvar belirteçler, leptin gibi hormonlar, oksidatif stres sonucu oluşan ürünler ve kemotaktik mediyatörler gibi hücrel bileşenlerin ve çeşitli mediyatörlerin dahil olduğu çok sayıda inflamatuvar yolak örtüşmektedir (Pamuk & Kantarci, 2022).

Obezitede vücut yağının artması periodontal hastalıkta hiperinflamatuvar bir yanıtı da neden olabileceği düşünülmektedir. Adipositler obezite ile ilişkili inflamasyonda kritik hücrelerdir. Yağ dokusu fonksiyonunu korumadaki rollerinin yanı sıra, adipositler enfeksiyöz mikroorganizmaları hedefleyebilir ve yağ dokusunun inflamasyonunda rol oynayabilir. Bakteriler de ayrıca adiposit nekrozu, apoptoz ve tnf- α üretimini uyarabilir. Fagositlerde olduğu gibi TLR'ler bakteri ve adipositler arasındaki bu etkileşimlerde merkezi bir rol oynar. *Escherichia coli* lipopolisakkariti gibi TLR ligandlarının serbest yağ asitlerinin salınımını indüklemek için adipositleri uyardığı gösterilmiştir. TLR'ler *P. gingivalis* ve antijenlerini tanıdığından ve takip eden inflamatuvar yanıtlara aracılık ettiğinden, adipositlerin *P. gingivalis* veya antijenlerine yanıt vermesi, inflamasyonun önemli bir parçası olduğunun göstergelerinden biridir (Dong ve ark., 2022; Pamuk & Kantarci, 2022).

4.4.1.3. Hiperlipidemi ve hipertansiyon

Hiperlipidemi, yüksek total kolesterol, trigliseritler, çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL), serbest yağ asitleri ve

apolipoprotein B seviyelerinin yanı sıra yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (*HDL*) düzeylerinin azalması ile karakterizedir. Arteriyel duvar içinde kolestrol birikimi ve inflamatuvar molekülleri üreten lenfositlerin, monositlerin/makrofajların kronik birikimi ile aterom plakları oluşması en önemli problemlerden biridir. Aterom plaklarının görüldüğü aterosklerotik hastalıklar yani kardiyovasküler hastalıklar için hiperlipidemi majör risk faktörlerdendir (Villegas Vélchez ve ark., 2022).

Hipertansiyon yüksek sistolik ve diyastolik arteriyel kan basıncı olarak kendini gösterir. Hiperglisemi için risk faktörü olan hipertansiyon gelişiminde oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu kritik bileşenler arasındadır. İnflamasyonun hipertansiyondaki rolü dikkat çekmektedir. Kronik inflamasyonla karakterize periodontitis hipertansif hastalarda kan basıncının yükselmesi ve endotel disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Periodontitisli hipertansif hastalarda saptanan inflamatuvar biyobelirteçlerin çeşitliliği ve sayısı artmaktadır (Leong ve ark., 2014).

Hiperlipidemi, hipertansiyon, T2DM ve abdominal obezitenin bir arada görülmesi metabolik sendrom riskini ortaya çıkaran faktörlerdir. Metabolik sendrom kardiyovasküler, serebrovasküler ve metabolik hastalık riskinin artmasına yol açan bir komorbidite kümesi olarak tanımlanmaktadır (Villegas Vélchez ve ark., 2022). Metabolik sendromda rol oynayan diyabette mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarının önlenmesi için glisemik kontrol şarttır. Makrovasküler komplikasyonların başında gelen kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde hiperglisemi kontrolüne ek olarak, eğer eşlik eden hiperlipidemi ve hipertansiyon durumu var ise bunların da kontrolü şarttır. İnflamasyonun aterosklerotik sürecin her adımında yer aldığı artık kabul edilmektedir. Ateroskleroz arteriyel duvar içinde pro-inflamatuvar molekülleri üreten lenfositlerin, monositlerin/makrofajların ve düz kas hücrelerin kronik birikimi ile gittikçe şiddetlenen bir süreç olup, önlenmesi için anti-inflamatuvar tedaviler oluşturmaya yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Bağışıklık sisteminin hem doğuştan gelen hem de adaptif immun yanıtları da ateroskleroz gelişiminde etkili olduğu gösterildiği için bu konuda hem immünolojik hem de inflamatuvar kaskadların açıklanmasına yönelik çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır (Beverly & Budoff, 2020; Li ve ark., 2017).

Periodontal hastalıklar ile hiperlipidemi, aterom plakları oluşumu ve hipertansiyon durumu inflamasyon oluşturma noktasında birleşir. Buna ilave olarak, aterom plaklarında oral bakterilerin, özellikle *P. gingivalis*'in varlığı ortaya konmuş olup, bu bölgeden kronik pro-inflamatuvar sitokin salınımı ve sistemik inflamasyon üzerindeki etkisi ayrı bir dikkat çekici konudur (Haraszthy ve ark., 2000). Periodontal patojenler içerisinde özellikle *P. gingivalis*

varlığı ile ateromlar arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve oral biyofilmdeki periodontal bakterilerin arterlere ulaşmanın bir yolunu bulabileceği gösterilmektedir (Marcelino ve ark., 2010). Etiyolojik açıdan bakıldığında, inflamasyonun aterosklerotik plak gelişiminde nedensel bir faktör olduğu belirtilmiştir. Yüksek yağlı diyet kaynaklı hiperlipidemi, PMNL’de fonksiyonel anormalliklere yol açabilir. Yakın zamanda yayınlanan araştırmalar, obezite ve hiperlipideminin konak yanıtını değiştirerek periodontal yıkımı artırabileceği ve kolesterolle zenginleştirilmiş bir diyetin artan periodontal inflamasyon ve serum pro-oksidan seviyeleri ile birlikte alveoler kemik kaybında rol oynayabileceği bildirilmiştir (Kırzioğlu ve ark., 2016; Yıldırım ve ark., 2017).

4.4.1.4. Polikistik over sendromu varlığı

Polikistik over sendromu genellikle üreme çağındaki kadınlarda sık rastalanan endokrin metabolik bozukluklardan biridir ve etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Bu heterojen hastalığın semptomları arasında başlıca hiperandrojenizm, akne, kilo artışı, düzensiz adet döngüsü ve insülin direnci bulunmaktadır. Polikistik over sendromu olan hastalarda insülin direnci, obezite, diyabet ve dislipidemi gibi metabolik bozukluklar görülmektedir. Abdominal obezite ve insülin direnci sonucu gelişen hiperglisemi durumu kronik inflamasyon ve metabolik bozukluk gelişme riskini arttırmaktadır. Meydana gelen insülin direnci sonucu oluşan hiperglisemi oksidatif stresin artmasına ve vasküler endotelial hasara neden olur. Bu hastalarda diyabete yatkınlık oldukça artmaktadır. Tedavilerinde diyet ve egzersizle desteklenerek kan glukoz düzeylerinin takibinin yapılması oluşabilecek komplikasyonların önüne geçilmesi açısından önemlidir (Çakır ve ark., 2013).

Periodontal hastalıklar ile polikistik over sendromu arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu konunun ele alındığı bir derlemede, poliskistik over sendromuna sahip bireylerin aynı zamanda periodontal hastalıklı olma riskinin yüksek olduğu ve mevcut periodontal hastalığın şiddetini de arttırdığı gösterilmiştir (Machado ve ark., 2020).

4.5. Periodontal Hastalıklar ve Hiperglisemi İlişkisi

Periodontal hastalıklar ve DM birlikte düşünüldüğünde bunlardaki ortak özellik vücutta yarattığı yüksek inflamasyon seviyesidir. Kronik hiperglisemi birçok farklı yollardan vücuttaki sistemik inflamasyonu, oksidatif stresi ve programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) artırmaktadır (Brownlee, 2005). Bunun sonucu olarak vücutta makro ve mikrovasküler komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda uzun dönemde görme kaybı ile sonuçlanabilecek olan retinopati, böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, ayak ülserleri ve

ampütasyona kadar varan periferik nöropati, gastrointestinal, genitouriner ve kardiyovasküler semptomlara neden olan otonom nöropati gibi komplikasyonlar gelişebilir. DM'li bireylerde yara iyileşmelerinde gecikmeler ve değişen kemik yoğunluğuna bağlı olarak meydana gelen kırılmalar da komplikasyonlar arasında izlenebilir (Gavin ve ark., 2003). İşte, başlangıçta bahsi geçen yüksek inflamasyon seviyesi periodontal dokulardaki lokal faktörlere bağlı gelişen inflamatuvar cevabı daha da şiddetli hale getirmektedir. Bunun yanında diyabetik hastalardaki PMNL'deki fagositoz, kemotaksis ve bakterisidal fonksiyonlardaki bozukluklar vücudun bakteriyel enfeksiyona karşı direncinde de zayıflamaya neden olur. Buna bağlı olarak periodontal enfeksiyonlarla baş edebilme kabiliyeti diyabetik hastalarda oldukça düşüktür. Bu nedenle kontrol altında olmayan diyabetik hastalarda periodontal müdahalelerde profilaksi rutin hale gelmiştir. Bunun tam tersi de söz konusudur. Hem diyabetli hem de şiddetli kronik periodontitis hastalarında, PMNL kemotaksis kabiliyeti ve apoptozis hafif kronik periodontitisli ya da sağlıklı periodonsiyuma sahip hastalara göre oldukça bozulmuş durumdadır. Buna bağlı olarak, dokulardaki PMNL varlığı gereğinden daha uzun süreli hale gelmekte, bu da ortamdaki ROT ve MMP seviyesinin normalin çok üstünde olmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, şiddetli periodontitis varlığında hiperglisemiye bağlı inflamasyonu daha da şiddetlendirir (Shetty ve ark., 2008). Buna ilave olarak diyabette meydana gelen mikro ve makrovasküler bozuklukların esas sorumlusu olarak gösterilen İGSÜ'lerin periodontal dokulardaki varlığı da bu iki yönlü ilişkiyi açıklayan mekanizmalardan biridir. İGSÜ non-enzimatik olarak bazı lipid ve protein moleküllerinin glikozillenmesiyle oluşan komplekslerdir. Bunlar damar duvarlarına yapışarak vasküler komplikasyonlara neden olurlar. Gingival makrofajların İGSÜ'ler için yüksek afiniteli reseptörlere sahip olduğu gösterilmiştir. Periodontal dokularda yüksek oranda İGSÜ komplekslerinin bulunması buralardan epizodik bir şekilde sürekli pro-inflamatuvar molekül salınımına neden olmaktadır. İGSÜ'lerin makrofajlardaki reseptörlerine bağlanması aşırı derecede IL-1 β , TNF- α ve IL-6 salgılanmasına neden olur. Bunun sonucu olarak dokulardaki akut faz proteinleri ve ROT seviyesi artmakta, artan oksidatif stres sonucu vasküler komplikasyonlar meydana gelmekte ve diyabetin komplikasyonları ortaya çıkmaktadır. Diyabette antioksidan sistemde de değişiklikler görülmektedir. Glutatyon, süperoksit dismutaz, katalaz, nitrik oksit ve lipid peroksidasyon gibi çeşitli antioksidan parametrelerde görülen azalmalar oksidatif hasarı hızlandırır ve çeşitli komplikasyonların görülmesinde önemli rol oynar (D'aiuto ve ark., 2010; Chapple ve ark., 2013).

4.6. Periodontal Hastalıklarda İnflamasyon ve Akut Faz Yanıtı

Periodontal hastalıklarda esas etiyolojik faktör olan mikrobiyal dental plak içerisindeki bakteriler tarafından salgılanan enzimler, LPS ve diğer virülans faktörleri, konak yanıtını

uyararak inflamasyon sürecini başlatırlar. Bu süreçte, mikroorganizmalardan salınan ürünler ve antijenler konak hücrelerin yüzeyindeki TLR tarafından saptanırlar. Bu maddeler konak hücrelerinde çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımını uyarır ve böylece kan damarları genişler ve geçirgenlikleri artar. Bununla birlikte bağ dokusunda eksüdatif sıvı artışı ve akut faz proteinlerinin birikimi görülür. Akut faz proteinlerinin inflamasyona dahil olması burada gerçekleşir. Ortamdaki antijenleri elimine etmek ve zarar görüp parçalanan dokuları ortamdan temizlemek için konak savunması antikor üretir ve beraberinde ortama PMNL ve nötrofiller göç eder. Konak savunmasında doğal bağışıklıkta öncelikle cevap veren bu hücreler kan damarlarından çıkarak iltihabi hücre infiltratını oluştururlar, PMNL birikimi enzim salınımına yol açarak sitokinler, büyüme faktörleri, PG ve MMP üretiminde rol oynar, monositler ve lenfositler de bunları takip eder.

Inflamatuvar yanıt bir başka açıdan bakıldığında kompleman sistemi aracılığıyla üretilen mediatörler tarafından düzenlenir. Kompleman sisteminin birer ürünü olan C3a ve C5a, lökositler ve mast hücrelerini etkileyerek histamin salınımıyla birlikte vasküler değişiklikler meydana gelmesine sebep olur. İlerleyen inflamasyonla mast hücrelerinin sayısı artar. Mast hücrelerinden akut ve kronik inflamatuvar cevabı düzenleyen IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IF- γ ve TGF- β gibi proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar mediyatörler salgılanır. Bu proinflamatuvar mediyatörler karaciğerde hepatositleri uyarır ve akut faz proteinleri üretilir. Akut faz proteinleri mikroorganizmaları etkisiz hale getirerek konak immün cevabına katılır. PMNL birikimiyle birlikte MMP'lerin ortama salınması ekstraselüler matriks yıkımına sebep olur. Ekstraselüler matriksin yıkımının görüldüğü evrede hastalıktaki yıkım epitel ve bağ dokusu ile sınırlıdır. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte aktive olan makrofajlar ve fibroblastlardan salınan MMP, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi moleküller inflamatuvar yanıtı güçlendirirler, PGE2 ve RANKL, OPG gibi osteoklastogenezi düzenlenmede görevli moleküllerle birlikte alveol kemiği yıkımına yol açarlar. Bu aşamada doku harabiyeti yumuşak dokulardan kalsifiye dokulara doğru ilerler ve alveolar kemik yıkımı ile birlikte periodontitis gelişmeye başlar (Page & Kornman, 1997; Cekici ve ark., 2014).

Akut faz reaksiyonları organizmaya karşı meydana gelen her türlü saldırıya ya da zarar verici duruma cevap olarak ortaya çıkan spesifik olmayan erken dönem reaksiyonları olarak açıklanabilir. Bu etkenler bakteriyel ya da viral saldırılar, mekanik ya da yanık travmaları, oksijensizliğe bağlı nekroz ya da kanser oluşumları gibi durumlar olarak özetlenebilir. Bu reaksiyonların amacı meydana gelen saldırı ya da değişikliğe karşı vücudu korumak, etkeni ortadan kaldırmak ve organizmanın eski haline dönmesi için gerekli fizyolojik ve metabolik değişiklikleri başlatmak yani homeostazı sağlamaktır. Bu reaksiyonlar arasında ateş

yükselmesi, nötrofil sayısında artış, lipid metabolizmasındaki değişiklikler, demir seviyesinde azalma (hypoferremia), glukoneogenezde artma, bu reaksiyonlarda gerekli olan aminoasit ihtiyacı (karaciğere gönderilmek üzere) için kas dokusu katabolizmasında artma, kompleman sistemi ve koagülasyon yollarının aktivasyonu, hormonal değişiklikler ve akut faz proteinleri artışı sayılabilir (Moshage, 1997). Tüm bu olaylarda doku içerisinde bulunan makrofajların doğrudan ya da salgıladıkları mediatörlerle hücre bazında düzenleyici görevleri söz konusudur. Ayrıca dolaşım ile de ilgili olarak ortamda PMNL ve trombosit artışı akut faz reaksiyonlarının en belirginleridir. Başlangıçta PMNL ve trombositler mevcut depolardan karşılanırken ihtiyaca göre kemik iliğinde sentezlenmeleri de mümkün olur. Bu olaylar olurken eritrosit sayısında düşüş ve bakteriler için gerekli olan demir miktarında azalma olur. Buna ilave olarak damar geçirgenliğinin artışı ile birlikte damar dışına sıvı ve trombosit çıkışı da söz konusudur. Bunun sonucu olarak ortamda reaktif oksijen ürünleri, nitrik oksit ve araziidonik asit artışı ile birlikte bölgede ödem, ısı artışı ve kızarıklık oluşur (Ebersole & Cappelli, 2000). Çeşitli nedenlere bağlı oluşan akut faz reaksiyonları sırasında meydana gelen bir başka ilginç olay ise karaciğer tarafından salgılanan bazı plazma proteinlerinin hızla dolaşıma verilmesidir. Bu akut faz proteinleri özellikle yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Bu proteinler ekstraselüler proteazların inhibisyonunda, pıhtılaşmada, mevcut pıhtının ortadan kaldırılmasında, immün sistem organizasyonu, nötralizasyonu ve ortamdaki zararlı artıkların uzaklaştırılmasında çok önemli role sahiptir. Akut faz proteinlerinin regülasyonu büyük oranda sitokinler ve nispeten daha az oranda nöral sistemden salgılanan glukokortikoidler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu proteinlerden kimileri inflamasyonun seviyesi arttıkça azalırken kimisinin ise paralel olarak artar ve buna göre paralel seyir izleyenler pozitif akut faz proteinleri (CRP, YKL-40, Serum amyloid A, Fibrinojen vb.), ters seyir izleyenler de negatif akut faz proteinleri (Antithrombin, Albumin, Transferrin vb.) olarak sınıflandırılırlar (Polepalle ve ark., 2015).

4.6.1. C-reaktif Protein

C-reaktif protein (CRP), 1930 yılında keşfedilmiş inflamasyon ile birlikte artış eğilimi gösteren önemli bir pozitif akut faz proteinidir. Bu protein kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlanmış 23 KDa birimindedir ve peptid zincirinden oluşan pentamer yapıdadır. İçerisinde her biri özdeş 187 amino aside peptid zincirleri disulfide bağlarıyla bağlı bulunur ve karbonhidrat modifikasyonu görülmez. CRP bakterilere non spesifik olarak bağlanarak kompleman sistemi tarafından tanınmasını sağlar ve bu şekilde fagositler tarafından ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır. Bu etki mekanizması antijenlerin antikor ile bağlanması ve fagosit edilmesi olayına benzerlik göstermesine rağmen antikor cevabından oldukça farklıdır. Antikor cevabı

antijen spesifik olarak meydana gelirken CRP non spesifik olarak hareket eder. Sadece bakterilere değil virüslere, mantarlara ve hatta parçalanmış doku hücrelerine de bağlanarak bunların makrofajlar, NK hücreler ve monositler tarafından ortadan kaldırılmasına da aracılık eder. CRP, çoğunlukla karaciğerde üretilir. Mononükleer kan hücrelerinde ve alveolar makrofajlarda IL-1, TNF- α ve IL-6 sentezini indükler ve inflamatuvar yanıtın güçlenmesinde rol oynar. CRP normalde ng/ml miktarlarında bulunur, ancak dokunun yaralanmasını izleyen 72 saat içinde dramatik bir şekilde yüzlerce μ g/ml'ye yükselebilir. Bu, doku hasarından sonraki saatler içinde yüz ila binlerce katlık bir artışa tekabül eder. İnflamasyon veya travmanın çözülmesiyle seviyeleri düşer. CRP seviyeleri, inflamatuvar sürecin ve bununla ilişkili hastalığın teşhisi, izlenmesi ve tedavi süreci konusunda bilgi sağlar (Ebersole & Cappelli, 2000).

CRP ve periodontitis arasındaki ilişkinin incelendiği sistematik derlemede, kesitsel çalışmalarda plazma CRP miktarının periodontitisli hastalarda kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu ve periodontal tedavinin CRP düzeylerini düşürmede etkili olduğu gösterilmiştir (Paraskevas ve ark., 2008). DM ve obezitede oluşan inflamatuvar yanıtaki artış CRP seviyelerindeki değişikliklerle izlenebilir (Ford, 1999; Rathcke ve ark., 2006). Metabolik sendromun görüldüğü hiperglisemik ve periodontitisli hastaların CRP serum seviyelerinde de artış saptanmıştır (Polak & Shapira, 2018).

4.6.2. YKL-40

YKL-40 nispeten yeni bir inflamasyon belirteci olup hem akut hem de kronik inflamasyonda karşımıza çıkan bir proteazdır. İnflamasyonun seviyesi ile birlikte yükselme özelliği gösteren pozitif akut faz proteinleri arasında yer almaktadır (Polepalle ve ark., 2015). YKL-40, adını dizilimindeki en son üç N-terminal aminoasitleri olan tirozin (Y), lizin (K), lösin (L) ve 40kDa moleküler ağırlığında olmasından alan bir glikoproteindir. Bu glikoprotein insan kartilaj glikoproteini 39 (HC gp39) veya kitinaz 3 benzeri protein 1 (CHI3L1) gibi birden fazla isimle adlandırılmaktadır (Hakala ve ark., 1993; Rathcke ve ark., 2006). Memeli kitinaz benzeri proteinlerin bir üyesi olmakla birlikte kitinaz enzimatik aktivitesi yoktur ve akut veya kronik inflamasyonda aktif nötrofiller ve makrofajlar tarafından salgılanır. YKL-40'ın ayrıca vasküler düz kas ve endotel hücreleri, artritlik kondrositler, kanser hücreleri ve embriyonik ve fetal hücreler tarafından üretildiği gösterilmiştir. Muhtemelen hücrelerin ekstrasellüler matrikse yapışmasında, bir taraftan diğer tarafa hareketinde, proliferasyon ve farklılaşmada ve inflamasyon ve apoptozdan korunmada rol oynar. Ek olarak, YKL-40, bağ dokusu hücreleri (fibroblastlar, kondrositler ve insan sinovyal hücreleri) için bir büyüme faktörüdür ve bu hücrelerde hücre proliferasyonunun artmasına neden olan bir sinyal kaskadı başlatır. Ancak,

öncelikle homeostaz ile ilişkili patolojik koşullarda merkezi bir rol oynar (Polepalle ve ark., 2015).

Son dönemlerdeki araştırmalarda YKL-40'ın vücut sıvılarındaki seviyesinin, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, T2DM gibi kronik inflamasyonla karakterize hastalıklarda sağlıklı bireylere oranla artmış olduğu gösterilmiştir (Rathcke & Vestergaard, 2009). Nielsen ve ark. (2008)'in yapmış olduğu çalışmada T2DM'li bireylerdeki artmış plazma YKL-40 seviyesi, açlık plazma glukozu ile ilişkili olduğu ancak vücut kitle indeksi ile ilişkili olmadığı ve dolayısıyla plazma YKL-40 seviyesinin obeziteden bağımsız diyabet spesifik bir belirteç olarak kullanabileceği iddia edilmiştir. Bu görüş aynı zamanda, hiperglisemik durumlarda CRP'e kıyasla YKL-40'ın daha spesifik bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (Nielsen ve ark., 2008). YKL-40'ın patojen bakterilere karşı başta makrofajlar olmak üzere çeşitli immün sistem hücreleri tarafından salınarak konak savunma mekanizmasında rol oynaması ve hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında, fibroblastların stimülasyonunda, ekstrasellüler matriks remodelasyonunda ve angiyojenizde rol oynaması periodontitisteki yerinin araştırılmasına öncü olmuştur. Periodontal hastalıklarla YKL-40 arasındaki ilişki ilk kez 2014 yılında Keleş ve ark. (2014) tarafından ortaya konmuştur. Gingivitis ve periodontitisli bireylerden alınan serum ve dişeti oluğu sıvısı örneklerindeki YKL-40 seviyesi sağlıklı bireylerden alınanlara oranla daha yüksek çıkmıştır (Keleş ve ark., 2014). Sonraki takip çalışmalarında ise, bu hastaların tedavisi sonrasında, YKL-40 seviyeleri sağlıklı grup ile aynı seviyelere indiğini göstermişler ve YKL-40'ın periodontal hastalıklardaki inflamasyon seviyesinin belirlenmesinde potansiyel bir biyomarker olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Keleş-Yücel ve ark., 2020). Bu görüşü destekler nitelikte, Damodar ve Mehta (2018)'nin yapmış olduğu çalışmada ise diyabeti olan ve olmayan kronik periodontitis hastalarında dişeti oluğu sıvısında YKL-40 seviyesinin başlangıç periodontal tedaviyi takiben 6 hafta sonunda azaldığı tespit edilmiştir (Damodar & Mehta, 2018). Bu çalışmalar YKL-40'ın inflamasyonun bir belirteci olduğunu ve YKL-40 seviyesinin DM ve periodontal hastalıklardaki inflamasyona bağlı gelişen komplikasyonların izlenmesi açısından potansiyel bir belirteç olabileceği fikrini desteklemedir.

4.6.3. İnterlökin-1beta

İnterlökin-1 β (IL-1 β) bilinen en kuvvetli pro- inflamatuvar sitokindir. IL-1'in IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere iki farklı tipi vardır. IL-1 β diğerine göre daha yüksek düzeyde sentezlenir. Makrofajlar, fibroblastlar ve nötrofiller dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir.

Yıkımda görevli sitokinlerin primer aktivatörü olan IL-1 β , inflamasyona karşı akut yanıtta rol olarak konak savunmasına katkı sağlar (Yi-June ve ark., 1999; Ebersole & Cappelli, 2000).

IL-1 β 'nın aracılık ettiği inflamatuvar reaksiyonlar periodontal doku yıkımında önemli rol oynamaktadır. Matriks metalloproteinazlar ve inhibitörlerinin düzenlenmesinde etkindir. Kemik yıkımını doğrudan uyardığı gibi matriks metalloproteinazları aktive eden prostoglandin E2'nin salgılanmasını sağlayarak indirek olarak da matriks yıkımını uyarır. İmmunositleri uyararak nötrofillerin parçalanmasını ve kollajen sentezinin inhibisyonuna aracılık eder. IL-1 β periodontal hastalıklarda meydana gelen ataçman kaybı ve kemik rezorbsiyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (Graves ve ark., 1994, Graves & Cochran, 2003). Tüm bu verilerin ışığında yapılan çalışmalar sonucunda IL-1 β 'nın aynı zamanda periodontal hastalıklarda oluşan inflamasyonun izlenmesinde kullanılabilecek önemli bir biyobelirteç olduğu söylenebilir (Cafiero ve ark., 2021).

4.6.4. Tümör nekroz faktörü alfa

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), tümör nekrotizan faktör ailesinin bilinen 18 üyesinden biridir. IL-1 β ile benzer hücresel aktiviteye sahip bu proinflamatuvar sitokin periodontal hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar. Diyabet ve obezite gibi kronik inflamasyonla seyreden metabolik hastalıklarla ilişkilendirildiği gibi periodontal hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Genco ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2014)

TNF- α konak cevabında ve inflamatuvar olaylarda farklı hücreler üzerinde farklı düzenleyici etkiler sergilemektedir. Periodonsiyum üzerindeki etkisini yumuşak dokuda dişeti fibroblastlarında apoptozu indükleyerek ve kolajenaz üretimini uyararak gerçekleştirir. Sert dokudaki etkisini ise osteoklast gelişimini uyararak kemik yıkımda rol oynarak yapar. TNF- α 'nın proinflamatuvar etkileri endotel hücreleri uyararak lökosit birikimini hızlandırması, aktive makrofajlardan IL-1 β sentezini ve salınımını arttırması, makrofaj ve gingival fibroblastlardan PGE2 salınımını arttırması olarak sıralanabilir (Page, 1991; Graves & Cochran, 2003). IL-1 β gibi TNF- α için de periodontal hastalıkların izlenmesinde kullanılabilecek önemli bir biyobelirteç olduğu söylenebilir (Engebretson ve ark., 2007; Afacan ve ark., 2019; Hegde & Awan, 2019)

4.7. Oksidatif Stres ve Periodontal Hastalıklar

Oksidatif stres, hücre ve dokularda ROT'un aşırı üretimi ve bunun organizmadan uzaklaştırılamaması sonucunda oksidan ve antioksidan sistemler arası dengenin oksidanlar lehine bozulmasıdır. Periodontal hastalıklarda meydana gelen yüksek miktarda ROT dişetinde,

periodontal ligamentte ve alveol kemiğinde birikerek oksidatif hasara ve periodonsiyumda yıkıma sebep olduğu gösterilmiştir. Obezite ve diyabet gibi kronik inflamasyona bağlı sistemik oksidatif stres artışı periodontal dokularda meydana gelen lokal inflamasyonla birleştiğinde daha hızlı doku yıkımı oluşur (Bullon ve ark., 2009). İnflamatuar koşullara bağlı polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu sonucu hücrelerin mitokondrilerinde elektron taşıma zinciri sisteminde üretilirler. Kronik inflamasyonla birlikte hem lokal hem sistemik ROT oluşumu artar. Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücreler ROT salınımında görev alırlar. İnflamasyonda PMNL'ler tarafından üretilen ROT bir yandan bakterilerle savaşarak dokuları koruma görevi yaparken bir yandan da ekstrasellüler matriks ve bağ dokuda yıkıma neden olur. Sitoplazmik hücre membranları ve mitokondri membranları ROT'un primer hedefleri arasında yer almaktadır. Aşırı miktarda ROT'un hücrelerde birikimi sonucu lipid peroksidasyonu, protein yıkımı, ekstrasellüler matriksin depolarizasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerde artış meydana gelir. Bunların sonucunda hücrelerde apoptoz ve DNA hasarı görülür (Canakci ve ark., 2005; Kim ve ark., 2010).

Hiperglisemiyle karakterize metabolik hastalıklar olan T2DM ve obezitede görülen insülin direnci ya da bozulmuş insülin sekresyonu aşırı beslenmeyle bozulan redoks dengesinin ve ROT birikiminin bir sonucudur. Aşırı ROT birikimi sonucu hücresel proteinlerin ve lipidlerin yapısı ve fonksiyonu değişir, bu da bozulmuş enerji metabolizması, değiştirilmiş hücre sinyalizasyonu ve hücre döngüsü kontrolünde anormalliklere, bozulmuş hücre içi taşıma mekanizmaları ve genel işlevsiz biyolojik aktivitelere, immün aktivasyon ve inflamasyon dahil olmak üzere hücresel fonksiyon bozukluklarına yol açar. Aşırı yüksek yağlı ve/veya karbonhidratlı diyetlerin neden olduğu beslenme stresi, lipid peroksidasyon ürünlerinde artışa, protein karbonilizasyonuna ve antioksidan miktarında azalmaya neden olarak belirgin şekilde oksidatif stres teşvik eder. Obezitede gelişen kronik oksidatif stres ve inflamasyon durumu insülin direnci, metabolizma yollarında düzensizlikler, insülin sekresyonunda bozukluklar ve immünolojik fonksiyon bozuklukları ile sonuçlanan diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi patolojilerin gelişmesine yol açan temel faktörlerdir (Newsholme ve ark., 2016).

Dışarıdan ya da içeriden gelen etkilere cevaben oluşan ROT'ların meydana getirdiği oksidatif stresle birlikte, organizmalar oluşan zararlı etkilerden korunmak için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri oluşturmuşlardır. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz (GST) ve katalaz (CAT) bunlar arasında sayılabilir.

Oksijen organizma tarafından kullanılırken, mitokondrilerde meydana gelen zincir reaksiyonlar sonucunda ROT olarak süperoksit radikalleri ortaya çıkar. SOD enzimi bu molekülleri hızlıca ortamdaki ulaştırmaya çalışarak dengenin tekrar korunmasını sağlamak için reaktif oksijen molekülünü daha az zararlı molekül olan hidrojen peroksit'e dönüştürür (Özcan ve ark., 2011).

CAT ise bu oluşan hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalize eder. Hücreleri hidrojen peroksitin zararlı etkilerinden korumada hayati bir rol oynar. Kırmızı kan hücreleri, karaciğer ve dalak hücreleri gibi hidrojen peroksit'e maruz kalan hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Katalazın eksikliği veya işlev bozukluğu, sistemde hidrojen peroksit birikimine yol açabilir, bu da hücresel hasara neden olur ve çeşitli hastalıkların gelişiminde önemli rol oynar (Chelikani ve ark., 2004).

GST, hem endojen bileşikler hem de farmasötikler gibi toksik maddeleri detoksifiye eden önemli bir enzim grubunu temsil etmektedir. GST glutatyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonunu kataliz eder. GST'ler elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik yapıda enzimler olarak bilinmektedir. GST'nin en sık rastlandığı dokular karaciğer, ince bağırsak, kalın bağırsak ve böbreklerdir (Ozcelebi ve ark., 2021).

Nitrik oksit (NO) hastalık ve sağlık durumunda karmaşık rollere sahip bir radikaldir. İnflamatuar hastalıkların patogeneğinde yer alan bu molekül serbest gazdır ve membranlardan kolayca geçebilir. Süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşmasına neden olur. Bu molekül hidroksil kadar reaktiftir ve lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın hasarına sebep olmaktadır (Özcan ve ark., 2011).

Serbest radikal türlerinin oluşumundan sonra en önemli reaksiyonlardan biri de lipid peroksidasyonudur (LPO). Hücre zarları zengin lipid içeriğine sahiptir. Bunlar fosfolipitler, gliseritler veya glikolipidler şeklinde olabilir. Membran lipidlerinin serbest radikaller tarafından tahrip edilmesine lipid peroksidasyonu denir. Lipid peroksitlerin parçalanmasını takiben, biyolojik olarak aktif aldehytler ortaya çıkar. Üç veya daha fazla çift bağ ile yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında, tiyobarbitürik asit kullanımı ile ortaya çıkan ara ürün malondialdehyttir (MDA). LPO oksidatif stresin bir sonucu olduğundan, bu süreci izlemek için çok sayıda belirteç kullanılmıştır. MDA, oksidatif stresi takiben arttığı gösterilebilen lipid peroksidasyonunun başlıca ve en çok çalışılan ürünüdür (Del Rio ve ark., 2005; Akalın ve ark., 2007).

Oksidatif strese önemli bir diğer molekül de glikoproteinlerin ve glikolipidlerin karbonhidrat zincirlerinin indirgeyici olmayan ucunun terminal bileşeni olan siyalik asittir (SA). SA hücre zarları için esansiyel bir bileşendir ve hücre zarının yapısını, geçirgenliğini ve bütünlüğünü korumada önemli rol oynar. SA ayrıca hücre adezyonunu, antijeniteyi, transport mekanizmasını, bazı hormonların etkisini ve enzimlerin katalitik özelliklerini etkiler. İnflamatuar süreçlerde, diyabet ve periodontal hastalıklarda serum ve tükürük gibi vücut sıvılarındaki seviyesi yüksektir (Oktay ve ark., 2020; Shahvali ve ark., 2020)

4.8. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Asetilkolin (ACh), sinir ve kas lifleri boyunca elektriksel uyarının üretilmesinde ve iletilmesinde rol oynayan ve ayrıca sinir uçları-organ ve nöron-nöron arasındaki uyarıları taşınmasını sağlayan kritik öneme sahip bir esterdir. ACh, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından inaktif formuna hidrolize edilir. Hidroliz reaksiyonundan sonra, kolin ve asetik asit adı verilen iki inaktif molekül oluşur. Belirli bir süre sonra inaktif olan formlar tekrar aktif hale gelir ve uyarı iletiminde yer alır. Yüksek AChE seviyeleri, inflamasyonun bir işareti olarak gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda DM, insülin direnci ve hiperlipidemisi olan hastalarda AChE'nin plazma ve doku aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur. Bu artışın bir sonucu olarak plazma ve doku ACh düzeylerinin düşük olması beklenebilir. ACh, TNF- α ve IL-1 β oluşumunu kolinerjik anti-inflamatuar yolak yoluyla inhibe eder. ACh, serotonin, dopamin ve diğer nöropeptitlerin seviyelerini ve aktivitelerini düzenleyerek hem bağışıklık tepkisini hem de nörotransmisyonunu kontrol eden bir nörotransmitterdir. Sonuç olarak, AChE, ACh'yi inaktive ederek iltihabı durumu artırabilir. Buna göre, çeşitli klinik durumlarda görüldüğü gibi plazma ve dokularda artmış AChE aktivitesinin, düşük dereceli sistemik inflamasyonun bir işareti olduğu öne sürülmüştür. (Pavlov & Tracey, 2006; Das, 2007). Ayrıca periodontal hastalıkların patogeneğinde kolinerjik mekanizmaların rolünün araştırıldığı bir çalışmada periodontitisli hastaların tükürük ve dişeti oluğu sıvısı örneklerinden ölçülen yüksek AChE seviyelerinin klinik olarak periodontal hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Apatzidou ve ark., 2018).

4.9. Alkalen Fosfataz Aktivitesi

Alkalen fosfataz (ALP), proteinlerden, nükleotidlerden ve alkoloidlerden fosfat grubunun koparılmasını sağlayan başlıca enzimlerdendir. Dişeti iltihabı ve kemik rezorpsiyonunda önemli rol oynamaktadır. ALP'nin ana kaynağı karaciğer, böbrek, kemik, bağırsak ve plasenta olsa da nötrofiller, osteoblastlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere periodonsiyumun birçok

hücrelerinde de bulunur. Esas olarak enfeksiyon bölgesine göçleri sırasında PMNL'lerden, kemik oluşumu sırasında osteoblasttan ve periodontal rejenerasyon sırasında periodontal ligamentteki fibroblasttan salınır (Malhotra ve ark., 2010). Periodontitis ve diyabete sahip hastalarda yapılan bir çalışmada T2DM ve kronik periodontitis hastalarında serum ve tükürük ALP konsantrasyonunun diyabetli olmayan kronik periodontitisli hastalara ve sağlıklı gruba göre yüksek olduğu gösterilmiştir (De ve ark., 2018).

4.10. Deney Hayvan Modeli Olarak Zebra Balıkları

Günümüzde deney hayvan modellerinin kullanılabilmesi araştırmacılara karmaşık biyolojik süreçleri irdeleyebilmek ve terapötik müdahaleleri kontrollü ve etik şartlarda gerçekleştirilmek için büyük olanaklar sunar. Hayvanlar ve insanlar arasındaki genetik, fizyolojik ve hücre benzerlikleri nedeniyle, hayvan modelleri insan patofizyolojisini anlamak ve yeni tedaviler geliştirmek için mükemmel bir çalışma sahası yaratmaktadır. Hayvan modellerinin kullanımı, yeni ilaçların, aşıların ve tıbbi cihazların geliştirilmesinde ve temel biyolojik bilgilerin açığa çıkartılmasında kritik rol oynamaktadır. Düünden bugüne insana olan benzerlikleriyle deney hayvan modeli olarak sıklıkla kullanılmakta olan fare ve sıçan hayvan modellerinin yanı sıra günümüzde insana olan genetik benzerliği, sistemik hastalık modellemesi ve enfeksiyon sürecinin takibi ve analizinde kullanılabilmesi, diğer modellere göre daha küçük, elde etmesi ve bakımı daha kolay ve nispeten ucuz olması nedeniyle zebra balıkları da bir başka seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Zebra balığı (*Danio rerio*) doğal olarak Kuzey Hindistan, Güney Asya Pakistan, Bhutan ve Nepal gibi ülkelerdeki akarsularda yaşayan küçük boyutlarda tropikal bir tatlı su balığıdır. Kemikli balıkların (Teleostei) Actinopterygii sınıfında, Cyprinidae familyasına ait bir tür olan zebra balıkları maksimum 4-5 cm boyutunda canlılardır. Bir defada sayısız embriyo elde edilebilen bu türün embriyoları şeffaftır ve gelişim aşamaları kolayca izlenebilmektedir. Bu sebeple 1930'lu yıllarda zebra balığı ilk olarak gelişimsel ve embriyolojik çalışmalar için bir model olarak kullanılmıştır. Ek olarak, döllenme sürecinin zebra balıklarında harici olarak gerçekleştirilmesi bu balıkların doğrudan manipüle edilmesine izin verir. Zebra balığı, insan genleri ile çok sayıda homolog genlere sahiptir. İnsan genomuyla karşılaştırıldığında insandaki genlerin yaklaşık %70'inin en az bir belirgin zebra balığı ortoloğuna sahip olduğu gösterilmiştir. 1980'li yılların başında klonlama, mutagenез ve transgenез gibi ileri genetik tekniklerin gelişmesiyle birlikte zebra balıkları genetik çalışmaların yapılabildiği bir model organizma olarak tanıtılmıştır. 1990'larda zebra balıklarında gerçekleştirilen çeşitli genetik manipölasyonlar gösterilmiştir. Bu gelişmelerle birlikte zebra balıkları model organizma olarak

popülerlik kazanmıştır. O zamandan beri, zebra balıkları genetik, biyotıp, nörobiyoloji, toksikoloji, farmakoloji ve insan hastalıklarının modellenmesi de dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında kullanılmaktadır (Howe ve ark., 2013; Karaman ve ark., 2020).

Zebra balıkları kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite gibi sistemik hastalıkların araştırılmasında kullanıldığı gibi bakteri kaynaklı inflamatuvar durumların ve patogenezin araştırılmasında da kullanılmakta olup, enfeksiyon hastalıklarının araştırılmasında önem teşkil eden konak ve patojen arasındaki ilişkilerin incelenmesine geniş olanaklar sunmaktadır (Miller & Neely, 2004; Widziolek ve ark., 2016; Sullivan ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018).

Zebra balıkları insanlarla benzer glukoz metabolizmasına, reaktif metabolit üretme yollarına ve bunun yanında yine benzer çeşitli patofizyolojik yollara sahiptir. Örnek verilecek olursa, hipergliseminin esas rol oynadığı obezite ve diyabet gibi metabolik durumlar ve bunların meydana getirdiği patolojik değişimler zebra balıklarında izlenebilmektedir. Fazla besleme yoluyla 6 ayda T2DM oluşturulan farelerde meydana gelen hiperglisemik durum ve komplikasyonlar, zebra balıklarında yüksek yağlı diyet uygulamasıyla 2 hafta gibi çok daha kısa bir sürede geliştirilebilmektedir (Heckler & Kroll, 2017; Zang ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018). 2 hafta besleme protokolü uygulanan yeni bir çalışmada zebra balıklarında glukoz intoleransı ve hiperglisemi geliştiği gösterilmiş aynı zamanda oksidatif stres ürünleri ve sitokinler gibi inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Dandin ve ark., 2022).

Periodontitiste *P. gingivalis* ile kardiyovasküler hastalık ilişkisini araştıran çalışmalarda zebra balıkları model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda zebra balık kullanımının dışında dikkat çeken bir diğer unsur ise *P. gingivalis* virulans faktörleri arasında gingipaini öne çıkarmalarıdır. *P. gingivalis* varlığında gingipain blokerleri kullanarak ya da gingipain salgılayamayan mutant *P. gingivalis* kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalar gingipain gibi virulans faktörlerinin bireysel etkilerini incelemekte yetersiz kalmaktadır (Widziolek ve ark., 2016; Farrugia ve ark., 2021). Literatürde *P. gingivalis*'in doğrudan kullanımı yerine, bakterinin en önemli virulans faktörlerinden olan gingipain kullanımı ile ilgili endotoksine özgü etkilerinin ortaya çıkarıldığı araştırmalar nadir olup, bu alan araştırmaya açık bir konu olarak yerini korumaktadır. Diğer yönden inflamatuvar düzeyde hiperglisemi ve periodontal hastalıklar arasındaki çift yönlü etkinin karmaşık patogenezi düşünüldüğünde, zebra balığında hiperglisemi modeli yaratılarak periodontal patojenlere ait virulans faktörlerinin doğrudan bu balıklar üzerinde kullanılmasıyla, yaratılan etkinin bu iki hastalığın etkileşimlerindeki açıklanamamış alanlara ışık tutacağı ve bu alanda daha ileri çalışmaların önünü açacağı düşünülmektedir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Zebra Balıklarının Bakım ve Beslenme Prosedürleri

Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 08.03.2022 tarihinde etik kurul onayı alınan 38.2021mar protokol numaralı çalışmamızda sağlıklı yetişkin (6-9 aylık) yabani tip AB/AB suşu, ortalama 6 aylık zebra balıkları kullanıldı (EK-1). Bu balıklar yaşamları ve deney koşulların için ideal şartları sağlanması amacıyla ZEBTEC Mini Akvaryum sistemindeki tanklarda, günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlığa ayarlı olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak barındırıldı ve böylelikle balıkların normal sirkadiyen ritimlerinin oluşması sağlandı (Şekil 9). Akvaryumdaki sistem suyu pH'ı 7,2 civarında sabit tutularak ortam sıcaklığı $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı %61 olacak şekilde ayarlandı. Gerekli oksijen pompaları tanklara yerleştirildi. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon mekanizmaları ile balıkların ortam temizliği sağlandı. Deney sırasında ise balıklar bu şartların yerine getirildiği ve belirtilen değerlerin günlük olarak kontrol edildiği maruziyet tanklarında barındırıldı. Yemlerin ayarlanan saatlerde verilebilmesi için otomatik yemleyiciler tanklara monte edildi. Deney süresince maruziyet tanklarının temizliği her gün atıklardan arındırılarak yapıldı ve sistem suları günlük olarak değiştirildi.

Deney öncesinde tüm zebra balıklarının ağırlıkları hesaplanarak maruziyet tanklarına ortalama ağırlıkları birbirlerine benzer olacak şekilde dağıtıldı. Normal besleme protokolü uygulanan tanklardaki balıklara deney öncesinde ve sırasında balık başına günlük toplam 20 mg ticari balık yemi verildi. Fazla besleme protokolü uygulanan tanklardaki balıklar ise 2 haftalık deney süresi boyunca balık başına normal beslemenin 6 katı olacak şekilde günlük toplam 120 mg ticari yem ile beslendi. Kullanılan Tetramin isimli ticari yemin içeriği minimum %51 ham protein, %11 ham yağ %2,3 kalsiyum, %1,5 fosfor, maksimum %15 kül, %3 ham fiber ve %6,5 nem şeklindedir. Granül boyutu 0,36–0,65 mm ve enerjisi 3,39 kcal/g'dır.



Şekil 9. ZEBTEC mini akvaryum sistemi

5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar Tablo 1’ de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Akvaryum sistemi	Zebtec Mini Akvaryum sistemi
RT-PCR	Rotor Gene-Q, Qiagen
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAcube, Qiagen
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Santrifüj	Sigma 1-16K, Sigma
Nanodrop	NanoDrop 2000c
Vorteks	V-1 PLUS, Biosan
pH metre	Hanna HI 2211
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Otomatik pipet	Rainin
Homojenizatör	Tissuelyser LT, Qiagen
Etüv	Nüve EN 400
Manyetik karıştırıcı	Witeg Wisd Hotplate Stirrer MSH
Distile su cihazı	Elga Option-Q Ultra saf su sistemi
Termostat	EHEIM thermocontrol
Kamera	Canon D500

5.3. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Tablo 2’ de listelenmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar

Sodyum karbonat	Merck 1.06392.1000
Sodyum hidroksit	Merck 1.06482.1000
Bakır (III) sülfat	Fisher Chemical C/8600/50
Sodyum potasyum tartarat	Merck 1.08087.1000
Folin çözeltisi	Sigma F9252
Sodyum klorür	Sigma S9888
Albumin	Sigma A3912
Tiyobarbütirik asit (TBA)	Sigma T5500-25g
Triklorasetik asit (TCA)	Acros 421451000
Hidroklorik asit	Merck 1.00317.2500
N-bütanol	Fisher 4800/17
Çinko sülfatheptahidrat	Merck 1.08883.1000
Vanadyum (III) Klorür	Acros 197000250
Sülfanilamid (SULF)	Sigma S9251
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	Merck 1.06237.0025
Dipotasyum hidrojen fosfat	Sigma P2222-100g
Potasyumdihidrojen fosfat	Sigma P5655-100g
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma 255793-10g
Sodyum Etilendiamin tetraasetik asit (Na-EDTA)	Sigma E4884-100g
Riboflavin	Fisher Bioreagentsbp167-50
O-dianisin	Acros 407890050
L-Glutatyon (GSH)	Sigma G4251-5g
1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	Acros 160511000
Glukoz	Biolabo 87109
DEHP(Bis2-etilhekzil) fitalat	Sigma Aldrich
DTNB (5,5'-Dithiobis 2 nitrobenzoik asit)	Sigma-D8130

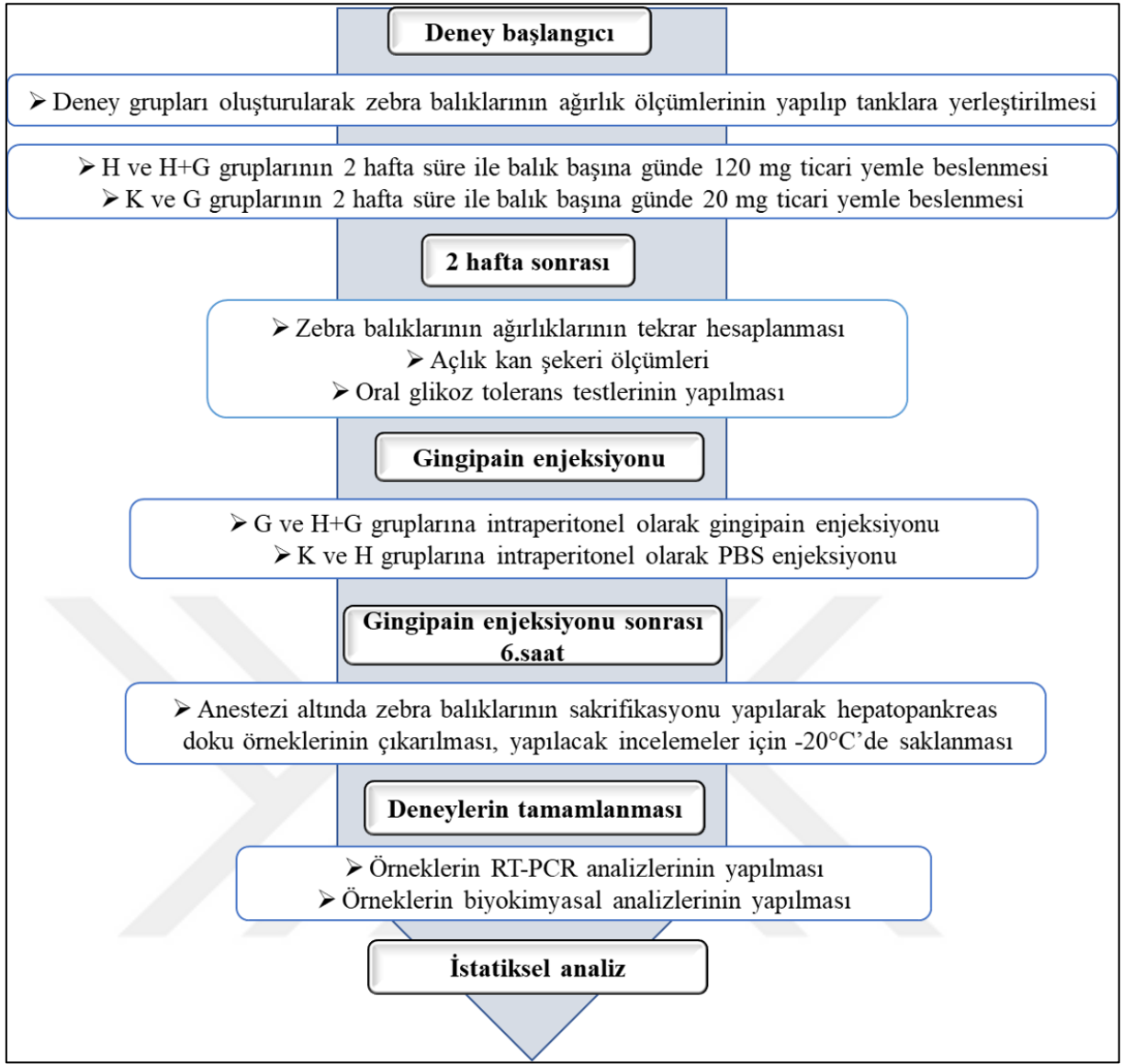
5.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada her bir grupta 15 adet (n=15) olacak şekilde ortalama 6 aylık olan yetişkin AB/AB suşu zebra balıkları kullanıldı. Oluşturulan deney grupları aşağıdaki gibidir (şekil 10):

- Standart besleme protokolü uygulanan ve PBS enjekte edilen zebra balıklarından oluşan kontrol grubu (K)
- Standart besleme protokolü uygulanan balıklardan oluşan ve gingipain enjekte edilen grup (G)
- Fazla besleme protokolü uygulanan balıklardan oluşan ve PBS enjekte edilen grup (H)
- Fazla besleme protokolü uygulanan balıklardan oluşan ve gingipain enjekte edilen grup (H+G)



şekil 10. Deney grupları



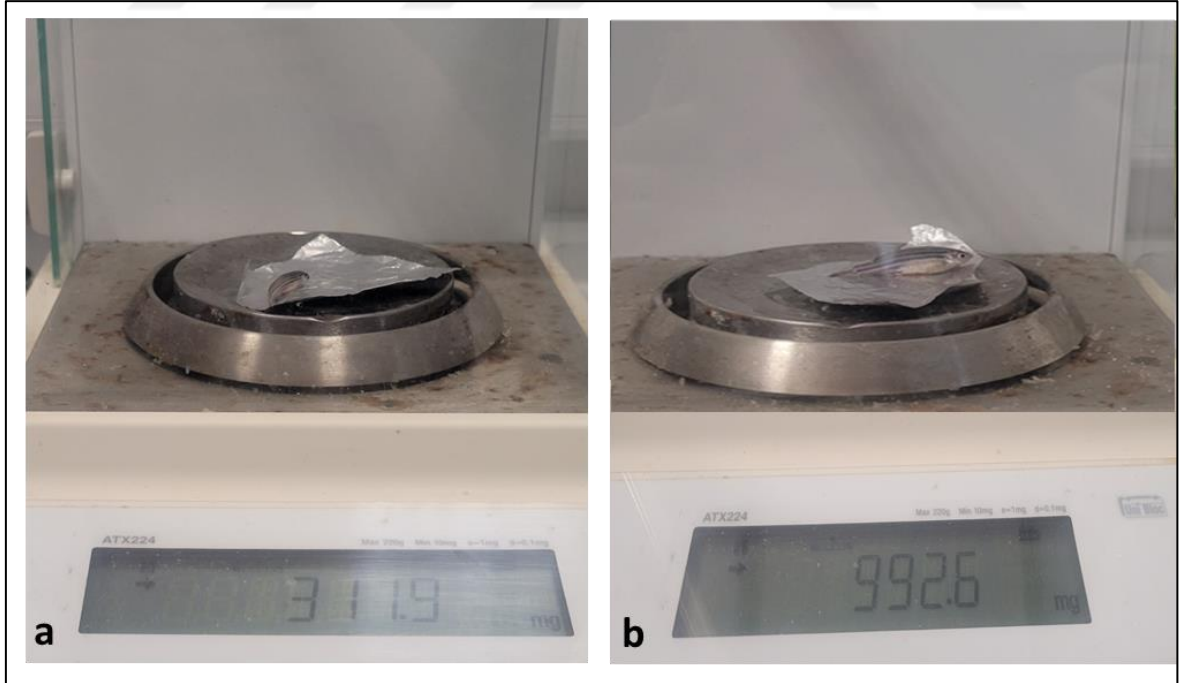
Şekil 11. Deney akış şeması

5.5. Gingipain Enjeksiyonlarının Uygulanması

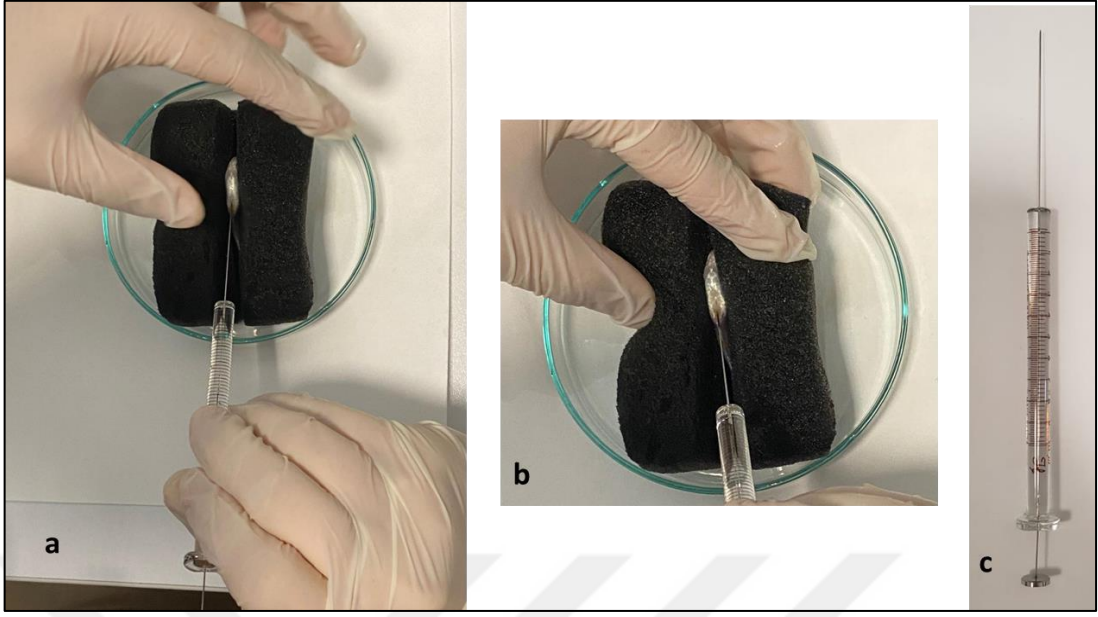
Gingipainin yetişkin zebra balıklarında in vivo şartlarda doğrudan kullanımı literatürde bir ilk olduğu için deney öncesi zebra balıklarında gingipaine karşı gelişen maksimum inflamatuvar yanıtı ölçmeye yönelik doz ve süre belirleme çalışması yapıldı. Zebra balıklarında gingipaine özgü doz hesabında literatürde Wilensky ve ark., (2017) tarafından yapılan fare modeli kullanılan bir çalışma referans alındı. Bu çalışmadaki yaklaşık 15 g ağırlığında fareye özgü gingipain dozu yaklaşık 1 g ağırlığındaki zebra balıklarına uyarlanarak zebra balığına özgü olacak şekilde gingipain dozu hesaplandı (Wilensky ve ark., 2017). Ticari olarak Recombinant gingipain R1 (RgpA) (*Recombinant Porphyromonas gingivalis* Gingipain R1(*rgpA*), partial, MBS969681, MyBiosource) temin edildi. Zebra balıklarında 9,3 nmol/L, 93 nmol/L ve 186

nmol/L olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda gingipain enjeksiyonlarının sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin 3., 6., 15., 24., 48. ve 72. saatlerde incelenmesi sonucu en etkili doz 186 nmol/L ve süre 6. saat olarak belirlendi (Kose ve ark., 2022). Bu verilere dayanarak deneyde kullanılacak olan gingipain enjeksiyonun dozu ve zebra balıkları için enjeksiyonlar sonrası sakrifikasyon zamanları belirlendi.

Fazla besleme protokolü ve standart besleme protokolü uygulanan tüm gruptaki balıkların ağırlıkları iki hafta sonunda buz ile sağlanan anestezi sonrası hassas terazi ile ölçüldü ve ağırlık ortalamaları hesaplandı (Şekil 12a ve Şekil 12b). Grupların açlık kan şekeri ölçümleri (AKŞ) ve oral glikoz tolerans testleri (OGTT) yapıldı. Maruziyet uygulamaları sırasında K ve H gruplarına PBS enjeksiyonu yapıldı, G ve H+G gruplarına ise 186 nmol/L dozunda gingipain enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonlar intraperitoneal yolla ve 10 µl Hamilton mikro enjektörü kullanılarak yapıldı. Tüm intraperitoneal enjeksiyonlar, balıklara 5 µl/gram hayvan olacak şekilde ve pelvik desteğe daha posteriorunda mide çukuruna uygulanarak gerçekleştirildi (Stewart ve ark., 2011). Enjeksiyon sırasında maruz kaldıkları sıkıntıyı azaltmak için, balıklar suya doymuş sünger içinde sabitlendi ve enjeksiyon sonrasında gözlem tankına alındı (Şekil 13a, Şekil 13b ve Şekil 13c) (Üstündağ ve ark., 2022).



Şekil 12. a. Zebra balığının standart besleme protokolü sonrası hassas terazi ile ağırlık ölçümü, **b.** Zebra balığının 2 hafta fazla besleme protokolü sonrası hassas terazi ile ağırlık ölçümü

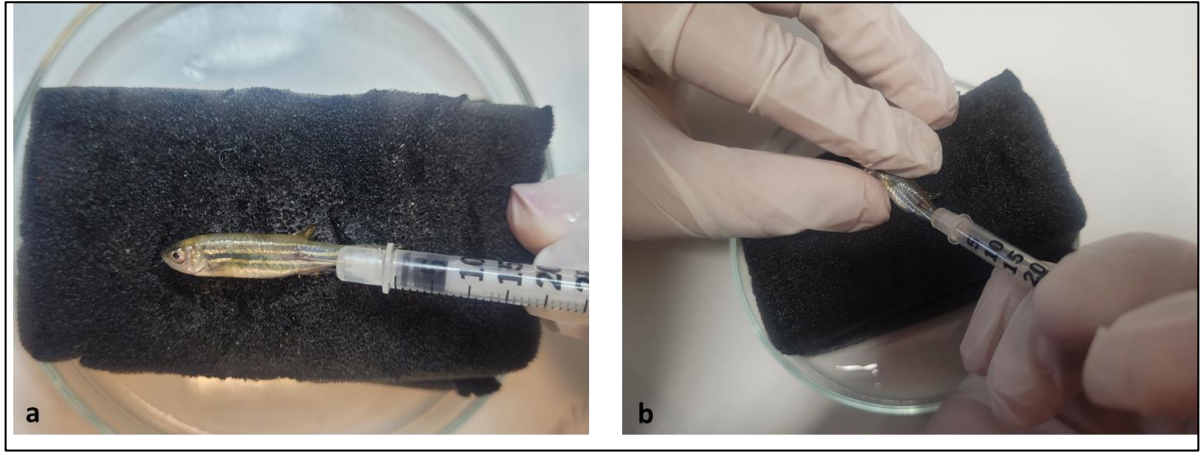


Şekil 13. a. Zebra balığına intraperitoneal enjeksiyon uygulanması, **b.** İntraperitoneal enjeksiyon uygulanmasının yakından görünümü, **c.** Hamilton enjektörü (10µl)

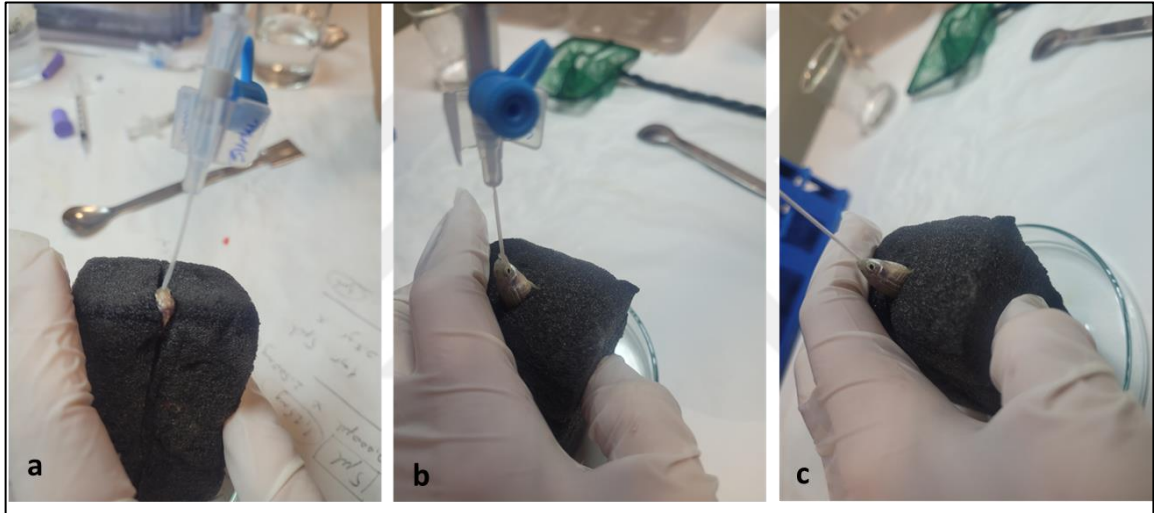
5.6. Açlık Kan Şekeri Ölçümleri ve Oral Glukoz Tolerans Testi

Deney öncesinde tüm grupların en az 8 saat açlık sonrası açlık kan şekeri ölçümleri yapıldı. Kan alımı öncesi balıklar buz kütlesi üzerinde bekletilerek hafif anestezi altına alındı. Balığın dorsal aort damarından insülin enjektörü yardımıyla kan alındı ve kandaki glukoz değerleri glukometre cihazı (Contour TS) yardımıyla ölçüldü (Şekil 14a ve Şekil 14b) (Zang ve ark., 2013).

İki hafta uygulanan fazla besleme protokolü sonrasında zebra balıklarının 16 saatlik açlık kan şekeri ölçümleri yapıldı. Oral glukoz tolerans testi için zebra balığının gram ağırlığı başına (1,25 mg/g zebra balığı ağırlığı) glukoz çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti mikropipet yardımıyla gavaj yöntemiyle balığa verildi (Şekil 15a, Şekil 15b ve Şekil 15c). Gavajı takiben 30, 60 ve 120 dakika sonra alınan kan örneklerinden kan glukoz düzeyleri ölçüldü (Zang ve ark., 2015; Beler ve ark., 2022; Dandin ve ark., 2022;)



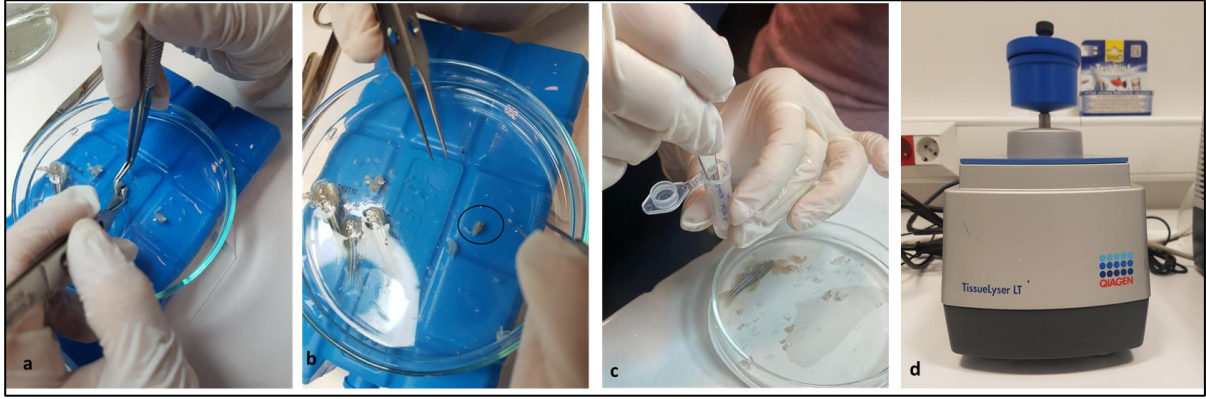
Şekil 14. a. Zebra balıklarında dorsal aortadan kan alımı uygulaması, **b.** Zebra balıklarından enjektör yardımıyla kan alınması işleminin gösterilmesi



Şekil 15. a. OGTT için mikropipetin zebra balıklarının ağız içine yerleştirilmesi, **b.** Gavaj uygulaması, **c.** Gavaj uygulaması sonrası pipetin nazikçe çıkarılması

5.7. Homojenatların Hazırlanması

Maruziyet uygulaması sonrası 6.saatte balıklar buzlu suda anestezi altına alınarak etik şartlar altında sakrifiye edildi (Şekil 16a). Sakrifikasyon sonrası balıkların hepatopankreas (karaciğer ve pankreas) dokuları çıkarıldı (Şekil 16b). Elde edilen hepatopankreas dokularına ağırlıklarının on katı serum fizyolojik ilave edildi ve Tissuelyser LT, Qiagen homojenizatör kullanılarak dokular homojenize edildi (Şekil 16c ve Şekil 16d). Hazırlanan doku homojenatları ependorflarda -20°C 'de kullanılacakları tarihe kadar muhafaza edildi.



Şekil 16. a. Sakrifikasyon sonrası hazırlanacak homojenatlar için dokuların ayrılması, **b.** Hepatopankreas dokusunun çıkarılması, **c.** Dokunun ependorf tüplere aktarılması, **d.** TissueLyser LT cihazıyla homojenize edilmesi

5.8. Oksidan ve Antioksidan Parametreler

Zebra balıklarından alınan hepatopankreas doku örneklerinde total protein, NO, LPO düzeyleri, GST, SOD, CAT, SA, ALP ve AChE aktiviteleri biyokimyasal metodlarla ölçüldü ve protein başına verilerin istatistiksel anlamlılıkları *Graph Pad Prism 9 software* (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi.

5.8.1. Total protein tayini

5.8.1.1. Çalışma prensibi

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokuldu. Daha sonra fosfomolibdik- fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgendi. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (Lowry, 1951).

5.8.1.2. Gerekli çözeltiler

- **A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (%2 g, 0,1 N NaOH'teki);** 0,4 g NaOH biraz suda çözüldü ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözüldü ve hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlandı. (Önceden hazırlandı. Plastik şişede, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı.)
- **Bakır sülfat çözeltisi (%1 g):** 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. (Taze hazırlandı.)
- **Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 g):** 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. (Taze hazırlandı.)
- **B çözeltisi:** Bakır sülfat çözeltisi %1 g'lık ile Sodyum potasyum tartarat çözeltisi %2 g'lık olarak eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanıldı. (Önceden hazırladığımız bu iki çözelti kullanılacağı zaman 1/1 karıştırılarak taze hazırlandı.)

- **C çözeltisi:** 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanıldı. (Taze hazırlandı.)
- **Folin çözeltisi:** 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat .2H₂O, 50 ml %85 g'lık fosforik asid, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı ve sonra soğutuldu. Üzerine 150 g Li₂SO₄ ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatıldı. Soğuduktan sonra, 5-6 damla Brom katıldı. (Çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve kullanıldı. Bu çözelti koyu renkli şişede saklanır ve uzun süre dayanır.
- **Serum fizyolojik (%0,9 g NaCl):** 0,9 g NaCl biraz suda çözüldü ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlandı (Önceden hazırlandı, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı.)
- **Protein stok standart çözeltisi (%100 mg'lık albumin çözeltisi):** 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır. (Önceden hazırlandı, buzdolabında ve karanlıkta saklandı.)
- **Protein çalışma standart çözeltileri:** Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak %5, 15, 25 mg albümin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlandı.

5.8.1.3. Deneyin yapılışı

5 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2(St2), standart 3(St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlendi. Vortekste iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk. bekletildi. 30 dk. sonunda 500 nm de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedildi. Standart grafiği çizildi. Doku protein miktarı hesaplandı. Deney basamakları Tablo 3'de özetlenmektedir.

Tablo 3.Total protein tayini

	Numune (N)	(St1), %5 mg Albumin	(St2), %10 mg Albumin	(St3), %15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (Veya süpernatant)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0,5 ml
Toplam hacim	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vortekste karıştırıldı.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.					
Folin ayıracı	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

5.8.2. Süperoksid dismutaz aktivitesi tayini

5.8.2.1. Çalışma prensibi

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Myroie ve ark., 1986).

5.8.2.2. Gerekli çözeltiler

- **Fosfat Tamponu (50 mM, pH = 7,8):** 0,136 gram KH_2PO_4 ve 0,697 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı distile su içinde çözüldü, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edildi, pH 7,8'e ayarlandı) (2 °C'de saklandı).
- **Fosfat tamponu + 0,1 mM Na-EDTA:** 0,0037 gram Na-EDTA tartıldı ve 50mM'lık fosfat tamponunda çözüldü. Hacim, 50 mM'lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı. (Önceden hazırlandı, buzdolabında 2-4 °C'de karanlıkta saklandı.)
- **Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7,5):** 0,041 gram KH_2PO_4 ve 0,122 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı distile su içinde çözüldü, birleştirildi ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edildi, pH 7,5'a ayarlandı). (2 °C'de saklandı).
- **Riboflavin (0,2 mM):** 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10mM'lık, pH = 7,5) çözüldü. (Önceden hazırlandı, buzdolabında 2-4 °C'de karanlıkta saklandı)
- **o- dianisin (6 mM):** 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözüldü. (Taze hazırlandı, ışıktan korundu.)

5.8.2.3. Deneyin yapılışı

%10 gramlık doku homojenatı (10g/100 ml) 10 dk 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alındı. Deney reaksiyon hacimleri Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4. Süperoksid dismutaz aktivitesi tayini

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu (pH = 7,8)	2,6 ml	2,6 ml
o- dianisidin	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	--	0.1 ml
--	--	--
Dilue süpernetant	0.1 ml	--
Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konuldu ve vorteksle karıştırıldı. Plastik makro küvette 460 nm’de abs okundu.		
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edildi. 460 nm’de abs okundu.		

Not: Lamba 20 dakika önceden açılır ve ısınması sağlanır.

5.8.3. Glutasyon s-transferaz aktivitesi tayini

5.8.3.1. Çalışma prensibi

GST aktivitesi tayini, GSH ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm’deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır (Habig ve ark., 1974).

5.8.3.2. Gerekli çözeltiler

- **Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6,5):** 0,534gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,3 gram KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözüldü ve birbirine karıştırılarak hacim, distile su ile 100 ml’ye tamamlandı (Hacim 100 ml’ ye tamamlanmadan önce pH kontrol edildi, 1M NaOH ile pH 6,5’e ayarlandı.) (Önceden hazırlandı, buzdolabında 2°C’de ve karanlıkta saklandı).
- **Glutasyon (GSH) (60 mM):** 1,84 gram glutasyon biraz distile suda çözüldü ve hacmi 100 ml’ye tamamlandı (Taze hazırlandı).
- **1-klor-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM):** Absolü etanolde taze hazırlandı. 1,22 gram CDNB tartıldı ve biraz etanolde çözüldü. Sonra hacmi 100 ml’ye tamamlandı (Taze hazırlandı).

5.8.3.3. Deneyin yapılışı

%10 gramlık doku homojenatı (100g/100 mL) 10 dk ve 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alındı ve Tablo 5’de belirtilen reaktanlar eklendikten sonra karıştırıldı.

Tablo 5. Glutasyon s-transferaz aktivitesi tayini

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	--
SF veya Distile Su	--	0,5 ml
Fosfat Tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam Hacim	3 ml	3 ml

3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm’de (25 ° C) absorbansları izlendi ve kaydedildi. Absorbans artışı hesaplandı. Glutasyon ve CDNB’nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstraksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar hesaplandı. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarıldı.

5.8.4. Total nitrik oksit tayini

5.8.4.1. Çalışma prensibi

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm’ de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Miranda ve ark., 2001).

5.8.4.2. Gerekli çözeltiler

- **0,3 M NaOH çözeltisi:** 0,6 g NaOH tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve üzeri distile su ile 50 ml’ye tamamlandı.
- **ZnSO₄ (%10’luk):** 5 g ZnSO₄ ya da 8,9 g ZnSO₄.7 H₂O tartılarak bir miktar distile suda çözüldü ve üzeri distile su ile 50 ml tamamlandı.
- **1 M HCl:** 4,20 ml HCl çekildi ve üzeri distile su ile 50 ml’ye tamamlandı.

- **VCl₃:** 0,4 g VCl₃ bir miktar 1 M HCl' de çözüldü ve üzeri aynı çözelti ile 50 ml'ye tamamlandı.
- **HCl (%5'lik):** 2,86 ml %37'lik HCl çekildi ve üzeri distile su ile 25 ml ye tamamlanır.
- **SULF (%2'lik)(Sülfanilamid):** 0,5 g sülfanilamid tartıldı, 25ml %5' lik HCl içerisinde çözüldü.
- **NEDD (%0,1'lik) (N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür):** 0,025 g NEDD tartıldı. Bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlandı.

5.8.4.3. Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı, (%10 gramlık) (100g/100 mL) 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 0,3 ml süpernatant alındı, üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dk beklenir. 0,3 ml %10'luk ZnSO₄ ilave edildi. Vortekslendi. +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz alındı ve +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. İki adet deney tüpü alındı, kör ve numune olarak işaretlenerek Tablo 6'daki gibi çalışıldı.

Tablo 6. Total nitrik oksit tayini

	Numune	Kör
Deproteinize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,6 ml
VCl ₃	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dk 37 °C'de etüvde inkübe edildi.		

Köre karşı 540 nm'de absorbans kaydedildi. Sonuçlar 53000 M⁻¹/cm⁻¹ ekstinsiyon katsayısı ile µmol/ L cinsinden hesaplandı.

5.8.5. Lipit peroksidasyon tayini

5.8.5.1. Çalışma prensibi

LPO ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirildi (Ledwozyw ve ark., 1986).

5.8.5.2. Gerekli çözeltiler

- **NaOH (1 M):** 4 gram NaOH tartıldı, biraz distile suda çözüldü, hacmi 100 ml' ye distile su ile tamamlandı. (TBA çözeltisi için taze hazırlandı.)
- **TBA çözeltisi (0.047 M):** 500 mg TBA ile 6 ml 1 M'lık NaOH ile karıştırıldı. Üzerine 69 ml distile su ilave edildi. (Önceden hazırlandı, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı)
- **Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl deki):** 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (%37 g'lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırıldı ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlandı. (Önceden hazırlandı, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı)
- **n-butanol :** Orijinal şişesinden kullanıldı.

5.8.5.3. Deneyin yapılışı

2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlendi ve Tablo 7'de belirtildiği gibi çalışıldı.

Tablo 7. Lipit peroksidasyonu tayini

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0,25 ml	-
Distile su	-	-
TCA	1,25 ml	-
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletildi.		
TBA	0,75 ml	-
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi.		
n-butanol	2 ml	1 ml

İlave edildi ve vortekslendi. 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edildi. 1ml butanol fazı alınarak 532 nm'de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedildi. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplandı.

5.8.6. Total siyalik asit tayini

5.8.6.1. Çalışma prensibi

SA, periyodik asit ile okside olarak beta-formilpürivik asit oluşur. Bu bileşik tiyobarbitürik asit ile reaksiyona sokularak, 549 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir bileşiğe dönüştürülür. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle siklohegzanon fazına çekilir. Oluşan rengin

şiddeti 549 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. 549 nm'deki rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

5.8.6.2. Çözeltiler

0,1 N H₂SO₄: Bir litrelik balon jojeye bir miktar distile su ilave ettikten sonra üzerine 2,71 ml derişik sülfirik asit konur ve hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

0,2 M Sodyum metaperiyodat (9M fosforik asit (ortho fosforik asit) içinde): 250 ml'lik balon jojeye belli bir miktar distile su ilave edilir. Suyun üzerine 151,7 ml fosforik asit ilave edilip karıştırılır. Bu karışımın üzerine 10,695 g Sodyum-metaperiyodat ilave edilir, karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacim, distile su ile 250 ml'ye tamamlanır. (Önceden hazırlanır, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklanır)

0,5 M Sodyum sülfat (0,1 N H₂SO₄ içerisinde): 500 ml'lik bir balon jojeye 35,5 g sodyum sülfat bir miktar 0,1 N sülfirik asit içinde çözüldükten sonra hacim 500 ml'ye 0,1 N sülfirik asit ile tamamlandı.

Sodyum arsenit-%10 g (0,1 N sülfirik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 10 g sodyum meta arsenit tartıldı, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözüldü, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml'ye tamamlandı. (Önceden hazırlandı, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı.)

TBA-%0,6 g (0,1 N sülfirik asitte hazırlanan 0,5 M sodyum sülfat içerisinde): 0,6 g TBA tartılır, bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözüldü, hacim 0,5 M sodyum sülfat ile 100 ml'ye tamamlandı. (Taze hazırlandı.)

Sikloheksanon: Orijinal şişesinden kullanıldı.

5.8.6.3. Deneyin yapılışı

Doku homojenatı (%10 g'lık) 10 dk 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı. 360 µl 0,1 N H₂SO₄ ile 40 µl süpernatant karıştırıldı, tüplerin ağzı kapatılarak 1 saat 80°C'de etüvde hidroliz edildi. Elde edilen hidrolizat numune olarak işaretlenmiş deney tüpüne konuldu. Aşamalar Tablo 8'de verilmektedir.

Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak mg siyalik asid / g protein cinsinden hesaplandı (Warren, 1959).

Ekstinksiyon katsayısı 57000 M⁻¹ cm⁻¹'dir.

Tablo 8. Total siyalik asit tayini

	Numune
Hidrolizat	0,2 ml
0.2 M sodyum metaperiyodat	0,1 ml
	20 dakika oda sıcaklığında beklenildi.
%10 sodyum arsenit	1 ml
	Meydana gelen sarı renk kayboluncaya kadar çalkalandı.
%0,6 g TBA	3 ml
	100°C lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak buzlu su içinde oda ısısına soğutuldu.
Sikloheksanon	4,3 ml
	İlave edildi ve vortekslendi. 10 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi Kör olarak 1ml sigloheksanon kullanıldı. Organik fazın renk şiddeti 549 nm’ de okundu.

5.8.7. Katalaz aktivitesi tayini

5.8.7.1. Çalışma prensibi

CAT enzimi H_2O_2 ’nin, H_2O ’ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm’de absorbanın azalması ile takip edilebilir. 1 dk.’da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir.

5.8.7.2. Gerekli çözeltiler

Fosfat tamponu (PBS) (50 mM, pH=7,0):

- 6,81 g KH_2PO_4 ve
- 8,90 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ tartılıp ayrı ayrı biraz distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı.

Kullanılacağı vakit a’dan 1 hacim b’den 1,5 hacim alınarak karıştırıldı (pH=7.0 olmalı). (Önceden hazırlandı, buzdolabında ve karanlıkta saklandı.) (Fosfat tamponu bakteriyel kontaminasyon olmadığı sürece stabil durumdadır ve kullanılabilir.)

* Na_2HPO_4 anhydrous’dan 7,1 gr alındı.

H_2O_2 çözeltisi (30 mM) + fosfat tamponu: Yoğunluğu $d=1,11$ g/ml olan %30 g’lık H_2O_2 çözeltisinden 0,31 ml alındı ve 50 mM lık fosfat tamponu (pH=7,0) ile 100 ml’ye seyreltildi. (Taze hazırlandı.)

5.8.7.3. Deneyin Yapılışı

Doku homojenatından %10 gram olacak şekilde 10 dk. 4000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 1/10, 1/20 veya 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışıldı. Supernatant dilue edildikten sonra 5-10 dakika içinde çalışıldı.

Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alındı. Aşağıda gösterilen Tablo 9’daki gibi çalışıldı.

Tablo 9. Katalaz aktivitesi tayini

		Numune	Kör
Fosfat tamponu		-	0,2 ml
Dilue süpernatant		0,4 ml	0,4 ml
H ₂ O ₂ çözeltisi + fosfat tamponu		0,2 ml	--

Tablodakiler ilave edildi ve karıştırıldı. 1. dk sonrasında 240 nm’de kuartz küvette absorbansları okunarak kaydedildi. Sonuçlar bu deneyde ekstinksiyon katsayısı 0.004(0.00394) mM⁻¹/ mm⁻¹ göz önüne alınarak hesaplandı (Aebi, 1974).

5.9. Alkalen Fosfataz Aktivitesi tayini

5.9.1. Çalışma prensibi

ALP enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenil fosfatı ortamın pH’ına bağlı olarak p-nitrofenol’a hidroliz etmektedir. Meydana gelen ürünün 405 nm’de verdiği absorbans spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

5.9.2. Gerekli çözeltiler

HCl çözeltisi (0,1 N): d=1,19 g/ml %37 g HCl çözeltisinde 0,828 ml alarak biraz distile su üzerine konuldu. Sonra hacim 100 ml’ye tamamlandı.

Tampon çözelti (pH=9,8): 1,052 gram dietanolamin, 8 ml 0,1 N HCl, 46,4 mg 4-nitrofenilfosfat 85 ml distile suda çözündü. 0,1 N HCl ile pH’sı 9,8’e ayarlanır. Sonra hacmi distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

NaOH çözeltisi (0,05 N): 0,2 g NaOH biraz distile suda çözüldü. Hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

5.9.3. Deneyin yapılışı

Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 deney tüpü alındı. Deney basamakları Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10. Alkalen fosfataz aktivitesi tayini

	Numune	Kör
Tampon çözelti	2 ml	2 ml
Distile su	--	0,05 ml
Doku homojenatı	0,05 ml	--
Vortexde karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.		
NaOH çözeltisi	10 ml	10 ml
Vortexde karıştırıldı ve 405 nm'de absorbans okunarak kaydedildi.		

Doku homojenatında ALP aktivitesi $Abs \times 434$ (U/L) formülü kullanılarak Ü/g protein cinsinden hesaplandı (Walter & Schutt, 1974).

5.10. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Tayini

5.10.1. Çalışma prensibi

Çalışmamızda asetilkolinesteraz aktivitesi Ellman ve ark. (1961) yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 17). Ellman deneyinin prensibine göre asetilkolinesterazın asetiltiyokolini hidrolize etmesi ile açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2- nitrobenzoik asit) ile reaksiyona girerek sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2- nitrobenzoik asit) oluşumuna neden olur. 405 nm'de açığa çıkan bu sarı rengin şiddeti TNB oluşumu dolayısı ile AChE aktivitesi ile doğru orantılıdır (Ellman ve ark., 1961).

5.10.2. Gerekli çözeltiler

Fosfat tamponu (100 mM pH:7,5): 1070 mg Na_2HPO_4 , 295 mg NaH_2PO_4 80 ml distile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100ml'ye tamamlandı.

Asetiltiyokolin iyodür (75mM): 41,25 mg asetiltiyokolin iyodür, 1 ml pH:7,5 olan 100 mM fosfat tamponunda çözüldü.

DTNB (10mM): 39,6 mg DTNB 10 ml Fosfat tamponunda (pH:7,5 100mM) çözüldü.

Doku homojenatı: %10' luk homojenat 1/200 oranında seyreltilti.

5.10.3. Deneyin yapılışı

Deneyin yapılmasına ilişkin aşamalar Tablo 11'de verilmektedir. Tablodaki verilen basamaklar sonrası devamında 412 nm'de dakika başına 3 dakika boyunca absorbans alındı ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

Tablo 11. Asetilkolinesteraz aktivitesi tayini

	Numune
Fosfat Tamponu	650ul
DTNB	25ul
Örnek	100ul
Absorbanstaki artışın sabitlenmesini beklenir (10 dk)	
Asetiltiyokolin iyodür (substrat)	5ul

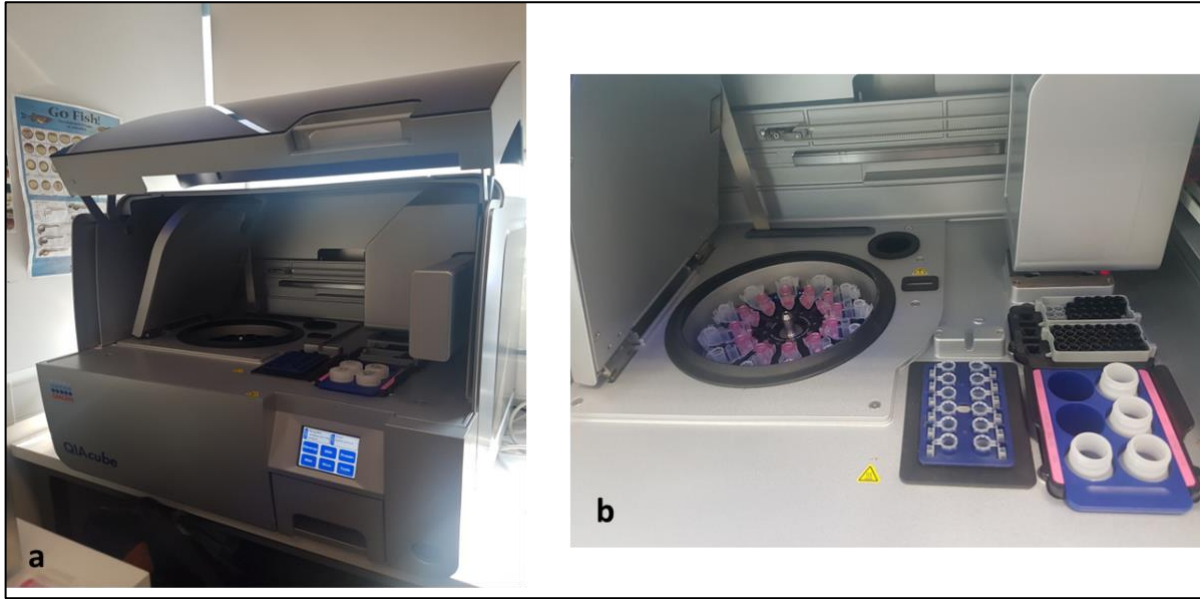


Şekil 17. Spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-120-02)

5.11. Gen İfadesi Analizi

5.11.1. RNA izolasyonu

Gen ifadelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ((Real time-PCR (RT-PCR)) ile belirlenebilmesi için hepatopankreas dokuları 3 adet olacak şekilde RLT lizis tamponu içinde homojenize edildi (Tissue lyser, Qiagen). RNA izolasyonları RNeasy Mini Kit (50) (Cat No./ID: 74104) kullanılarak gerçekleştirildi. RNA izolasyon basamakları Tablo 12’de özetlenmektedir. Kısaca homojenizasyon ile elde edilen lizata etanol eklenerek RNA’nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli koşullar sağlandı ve örnekler RNeasy spin kolonuna aktarıldı. Total RNA membrana bağlandığında kontaminantların da yıkanması ile RNA elüsyonu RNase-içermeyen su içinde gerçekleştirildi. Bağlanma, yıkanma ve elüsyon işlemleri QIacube (QIAGEN) izolasyon robotu kullanılarak yapıldı (Şekil 18a ve Şekil 18b). RNA konsantrasyonları NanoDrop 2000c spektrofotometre kullanılarak belirlendi.



Şekil 18. a. QIAcube (QIAGEN) izolasyon robotu, **b.** mRNA eldesi için hazırlanmış şekilde robotun içeriden görünümü

Tablo 12. RNA izolasyon basamakları

3 adet hepatopankreas dokusu üzerine 350 µl RLT lizis tamponu koyuldu.
Tissue Lyser (QIAGEN) kullanılarak 2 dk 50 osc'de homojenize edildi.
2,5 dk 25°C 15000 rpm'de santrifüj edilir. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı.
Tissue Lyser (QIAGEN) kullanılarak 2 dk 50 osc'de homojenize edildi.
2,5 dk 25°C 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz yeni bir tüpe alındı.
Üst fazın hacmi kadar %70 etanol ilave edildi ve karışması sağlandı.
RNeasy Mini Spin Column 2ml'lik ependorfa yerleştirildi ve hazırlanan karışım aktarıldı.
15 sn 9000g de santrifüj edildi ve süzüntü kısmı atıldı.
700µl RW1 ilave edildi.
15sn 9000g'de santrifüj edilir ve süzüntü kısmı atıldı.
500 µl RPE tamponu ilave edildi.
2 dk 9000g de santrifüj edilir ve süzüntü kısmı atıldı.
RNeasy Mini Spin Column yeni bir ependorfa konuldu ve 1 dk kuru olarak 9000g de santrifüj edildi.
RNeasy Mini Spin Column yeni bir ependorfa konuldu ve 40 µl RNase Free su ilave edildi.
1 dk 9000g'de santrifüj edilir.
Total RNA elde edildi.

5.11.2. cDNA eldesi

Total RNA örneklerinden cDNA sentezi, EasyScript™ Reverse Transcriptase EasyScript cDNA Synthesis Kiti (abm) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm protokol soğuk blok üzerinde hazırlandı. cDNA sentezi için izlenen protokol Tablo 13 ve 14’ de verilmektedir.

Rotor Gene-Q (Qiagen) cihazı programlanarak, karışım 5dk 65°C inkübasyon sonrası santrifüj edildi. 1 dk buz üzerinde soğuması sağlandı. Üzerine, Rotor Gene-Q (Qiagen) cihazı programlanarak, karışım santrifüj edildi. Sırasıyla 10 dk 25°C, 15 dk 42°C, 5 dk 85°C inkübe edildi. Tüpler 1 dk soğuk buz üzerinde soğutuldu. Üzerine 91 µl RNase Free Water ilave edildi. Hazırlanan karışım hafif bir şekilde pipet yardımıyla karıştırıldı ve alikotlanarak -20°C de saklandı. Hazırlanan alikotlar üç defadan fazla don-çöz yapılmamasına dikkat edildi.

Tablo 13. cDNA sentezinde birinci basamak

Bileşenler	Hacim
Random Primers	1 µl
dNTP	1 µl
Total RNA (500ng)	(RNA miktarına göre hacim belirlenir) µl
RNase Free Water	(12,5 - (RNA hacmi)) µl
Toplam Hacim	14,5 µl

Tablo 14. cDNA sentezinde ikinci basamak

Bileşenler	Hacim
Buz üzerinden alınan örnek	14,5 µl
5X RT Buffer	4 µl
RNase Off Ribonükleas inhibitör	0,5 µl
EasyScript™ RTase	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

5.10.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi için gerekli ortam ve cihazlar hazırlandı (Şekil 19a ve Şekil 19b). Tüm gruplarda pro-inflamatuar sitokinlerle ilişkili *il-1β*, *tnf-α* genleri, akut faz proteinleri olarak *crp* geni ve insan YKL-40 proteininin zebra balığı analogu olan kitinaz proteinleri *chia.5* ve *chia.6* genleri ve *ins* geninin mRNA ekspresyon

seviyelerine bakıldı. Housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı. Örnekler 3 tekrarlı havuz oluşturularak çalışıldı.



Şekil 19. a. RT-PCR uygulaması için ortamın hazırlanması, b. Rotor Gene-Q (Qiagen) cihazı

5.11.3.1. Gen ifadelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analizleri

Gen ifadelerinin belirlenmesi için Bright Green qPCR MasterMix Kit kullanıldı. Optimum sonuçlar için, primerlerin 18-22 nükleotit uzunluğunda ve 55°C- 60°C Tm olması ve hedef boyutunun 200 bp'den az olması önerilmektedir. Liyofilize halde gelen primerler RNaz içermeyen su ilave edilerek 100 μ M konsantrasyonda hazırlandı. Konsantre primerler (100 μ M) onda bir oranında seyreltilerek kullanıldı. Primer konsantrasyonu yüksek olmamalıdır, her primerin 50 nM ila 500 nM'lik bir konsantrasyonu genellikle en iyi sonuçları vermektedir. Tüm protokol soğuk blok üzerinde hazırlandı. RT-PCR işlemi için gerekli bileşenler Tablo 15'de verilmektedir.

Tablo 15. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
cDNA	1 μ l	
Primer (F) (10 μ M)	0,6 μ l	300 nM
Primer (R) (10 μ M)	0,6 μ l	300 nM
BrightGreen qPCR MasterMix	10 μ l	
RNazsız Su	7,8 μ l	
Toplam	20 μ l	

5.11.3.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri

RT-PCR döngüleri içerisinde işlem basamaklarını oluşturan enzim aktivasyonu, denatürasyon ve birleşim/ uzamaya ilave olarak kullanılan cihaza özgü önerilen erime eğrisi dikkate alındı. RT-PCR döngüleri Tablo 16’da verilmektedir.

Tablo 16. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu döngüleri

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Birleşim/uzama	60	60 saniye	
Erime Eğrisi	Kullanılan cihaz için önerilen değerlere bakıldı.		

5.11.3.4. Delta delta ct metodu ile veri analizi

Verilerin analizi house keeping gen β -aktin ile normalizasyona dayalı delta delta CT ($\Delta\Delta CT$) metodu kullanılarak yapıldı.

Bu yöntem ile PCR’da belirlenen eşik değer döngü sayısı (threshold cycle number = Ct), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırıldı. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki Ct değer farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip $\Delta\Delta Ct$ oranı belirlenerek bulundu. “Housekeeping” genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler.

Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β -aktin, albumin, β -globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Çalışmamızda housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı. Karşılaştırmalı Ct metodu aynı zamanda $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ olarak bilinmektedir.

Formül 1. $[\Delta\Delta Ct] = [\Delta Ct]_{\text{örnek}} - [\Delta Ct]_{\text{referans}}$

Bu formülde $[\Delta Ct]_{\text{T,örnek}}$; ilgilenilen örneğe ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değeri farklılığıdır. $[\Delta Ct]_{\text{T,referans}}$ ise kontrole ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değeri farklılığıdır (Yuan ve ark., 2008).

5.12. İstatistiksel Analiz

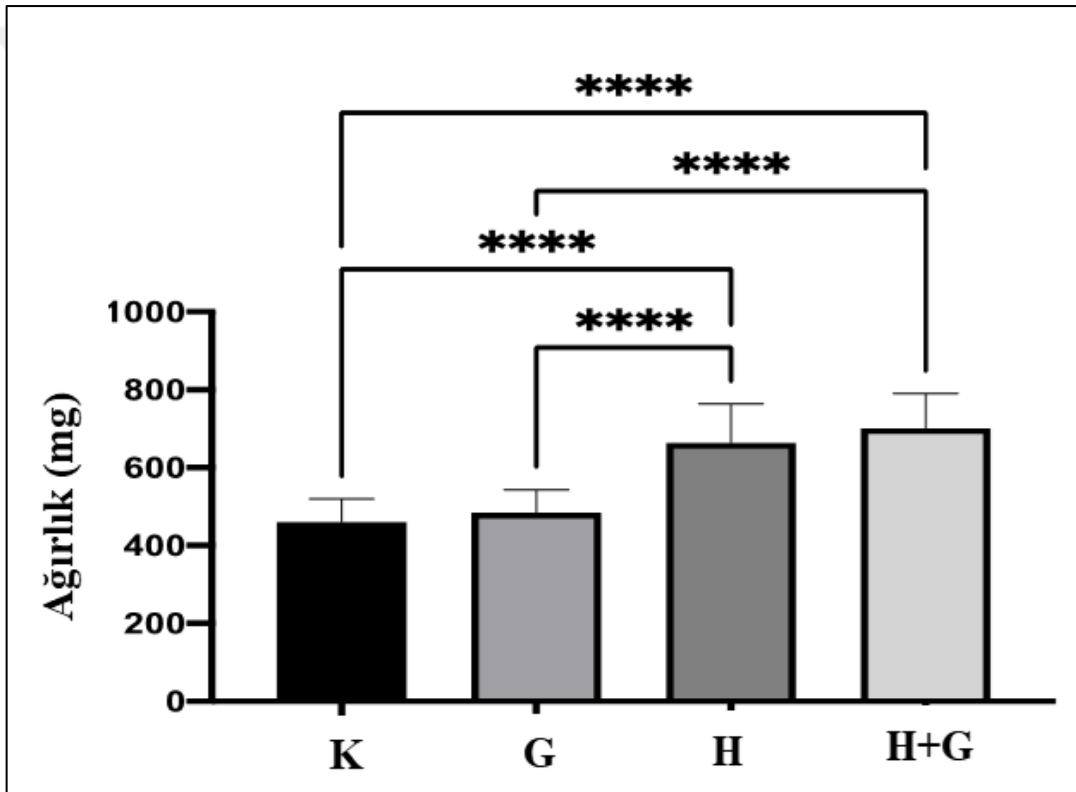
Verilerin istatistiksel analizi *One Way Anova* sonrası *Post Hoc Tukey* Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak *Graph Pad Prism 9 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)* istatistik programı ile yapıldı. Sonuçlar Ortalama $\pm$ Standart Sapma şeklinde verildi ve $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1. Grupların Vücut Ağırlık Ortalamalarının Karşılaştırılması

2 hafta süre ile fazla besleme ve standart besleme protokolü uygulanan gruplar arasındaki vücut ağırlık ortalamalarının karşılaştırılma grafiği Şekil 20’de verilmektedir (Şekil 20). H ve H+G gruplarında vücut ağırlıkları ortalamalarında hem kontrol grubuna hem de G grubuna kıyasla anlamlı derecede artış saptandı ($p<0,0001$).



Şekil 20. Grupların 15.gün vücut ağırlık ortalamalarının karşılaştırılması grafiği

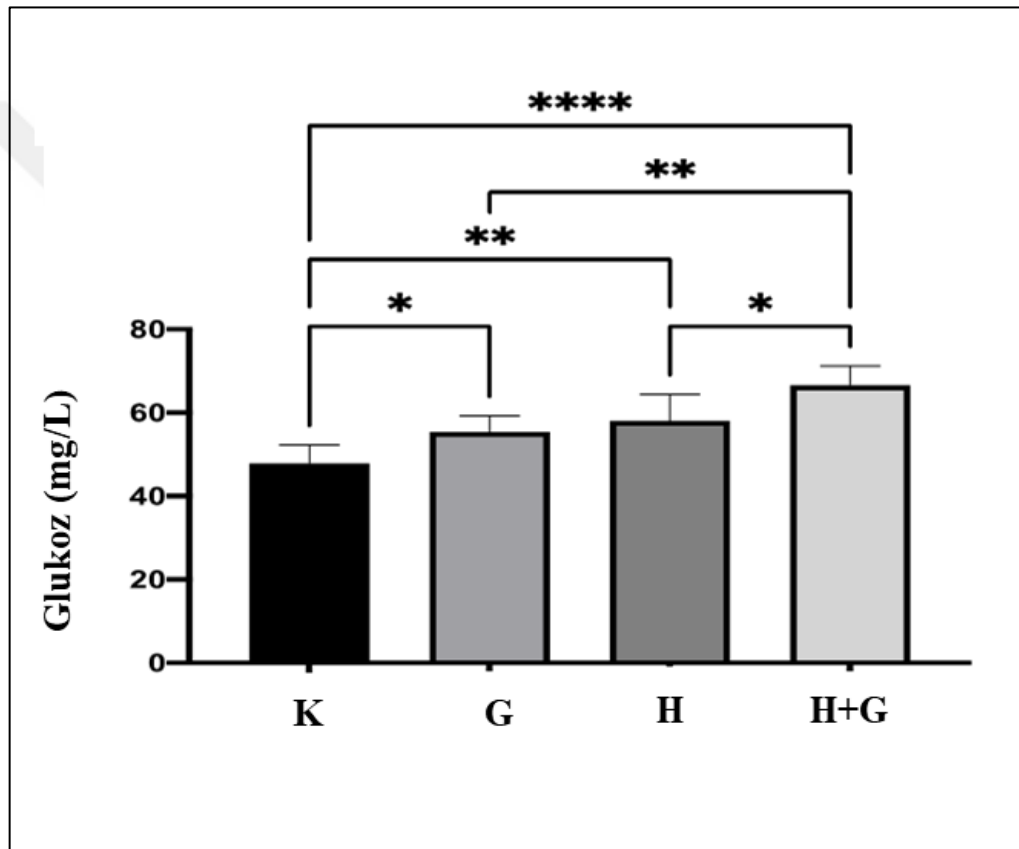
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

6.2. Grupların Açlık Kan Glukoz Değerlerinin Karşılaştırılması

Grupların 2 hafta süre sonundaki açlık kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması grafiği Şekil 21’de verilmektedir (Şekil 21). Kontrol grubuna kıyasla G, H ve H+G grupları açlık kan glukoz değerlerinde anlamlı derecede artış tespit edildi (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,0001$). Ağırlık ortalamaları artan H ve H+G gruplarındaki kan glukoz değerlerinde kontrol grubuna göre tespit edilen anlamlı derecede artış ($p<0,01$, $p<0,0001$) G grubunda görülen artışa kıyasla daha anlamlıydı ($p<0,05$). H+G grubunun açlık kan glukoz değerleri ise hem G hem de H grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek görüldü ($p<0,01$, $p<0,05$)



Şekil 21. Grupların 15.gün açlık glukoz değerlerinin karşılaştırılması grafiği

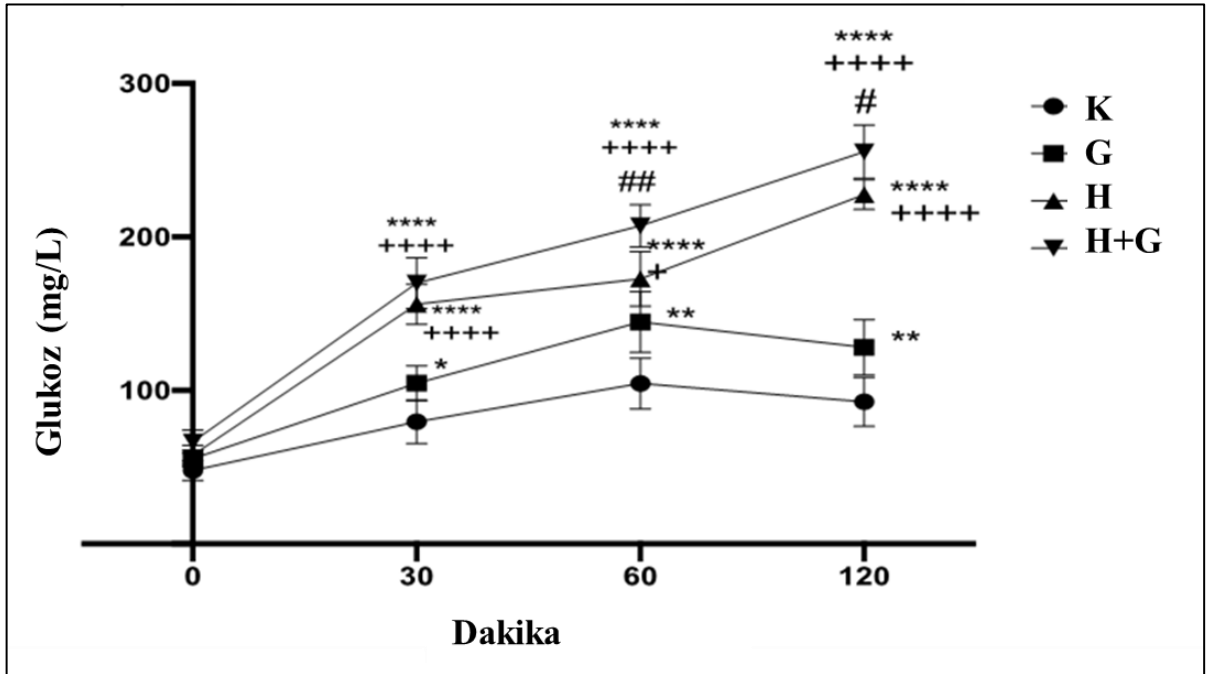
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.3. Grupların Oral Glukoz Tolerans Testi Değerlerinin Karşılaştırılması

Grupların oral glukoz tolerans testi (OGTT) değerlerinin karşılaştırılması grafiği Şekil 22’de verilmektedir (Şekil 22). Gavaj yöntemiyle glukoz yüklenmesinin ardından ölçülen 30, 60 ve 120. dakikadaki tüm grupların kan glukoz değerlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artış görüldü ($p<0,5$). 30. dk kan glukoz seviyesi değerleri H+G grubunda G grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdi ($p<0.0001$). 60. ve 120. dk değerlerinde H+G grubunda G grubuna kıyasla anlamlı artış görüldü ($p<0.0001$). Sadece gingipain enjeksiyonunu takiben balıklarda hiperglisemi durumu gelişti ve hiperglisemik durum hem fazla beslenen hem de gingipain enjeksiyonu yapılan grupta daha da yüksekti ($p<0.0001$).



Şekil 22. Grupların 15.gün OGTT değerlerinin karşılaştırılması grafiği

K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

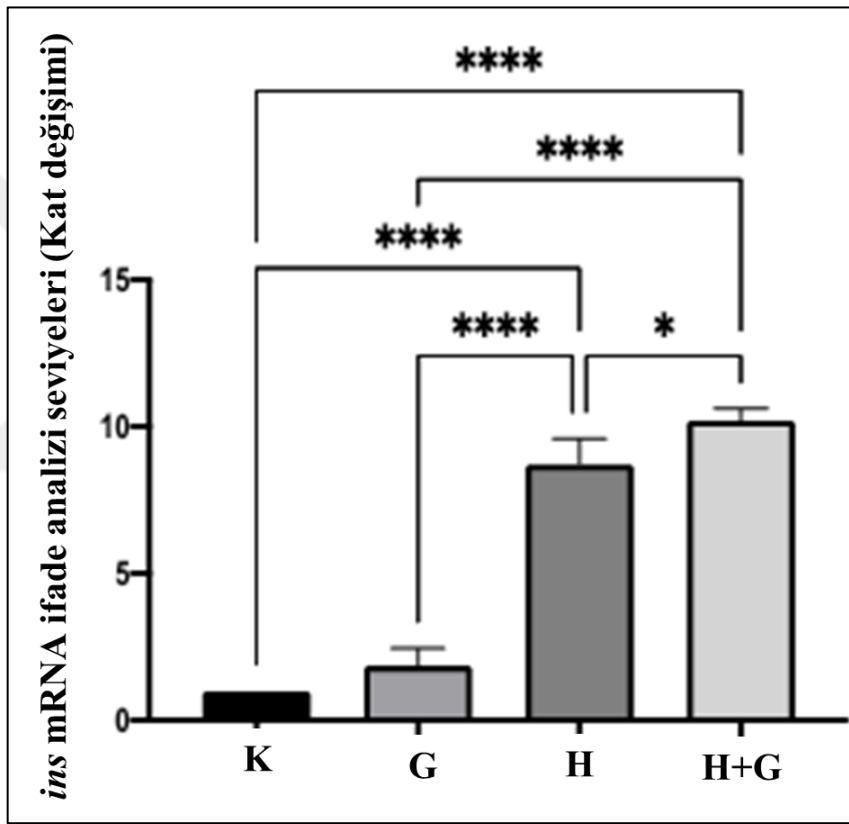
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.4. Gen İfadelerinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Analiz Sonuçları

6.4.1. İnsülin mRNA ifade analizi sonuçları

Grupların *ins* mRNA ifadelerinin analiz sonuçları grafiği Şekil 23’de verilmektedir (Şekil 23). H+G grubunda *ins* gen ifadeleri için hem kontrol grubuna hem de G ve H gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,05$). H grubunda kontrol (8 kat) ve G grubuna (4 kat) kıyasla anlamlı artış görüldü ($p<0,0001$). *ins* mRNA seviyesindeki artış H grubunda 8.7 kat ve H+G grubunda ise 10 kat seviyesindeydi. Bununla birlikte *ins* mRNA ifade seviyesinde artış hiperglisemi grubuna uygulanan gingipain enjeksiyonuyla birlikte H+G grubunda H grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti ($p<0,05$).



Şekil 23. Grupların RT-PCR ile ölçülen *ins* ifade değişiklikleri grafiği

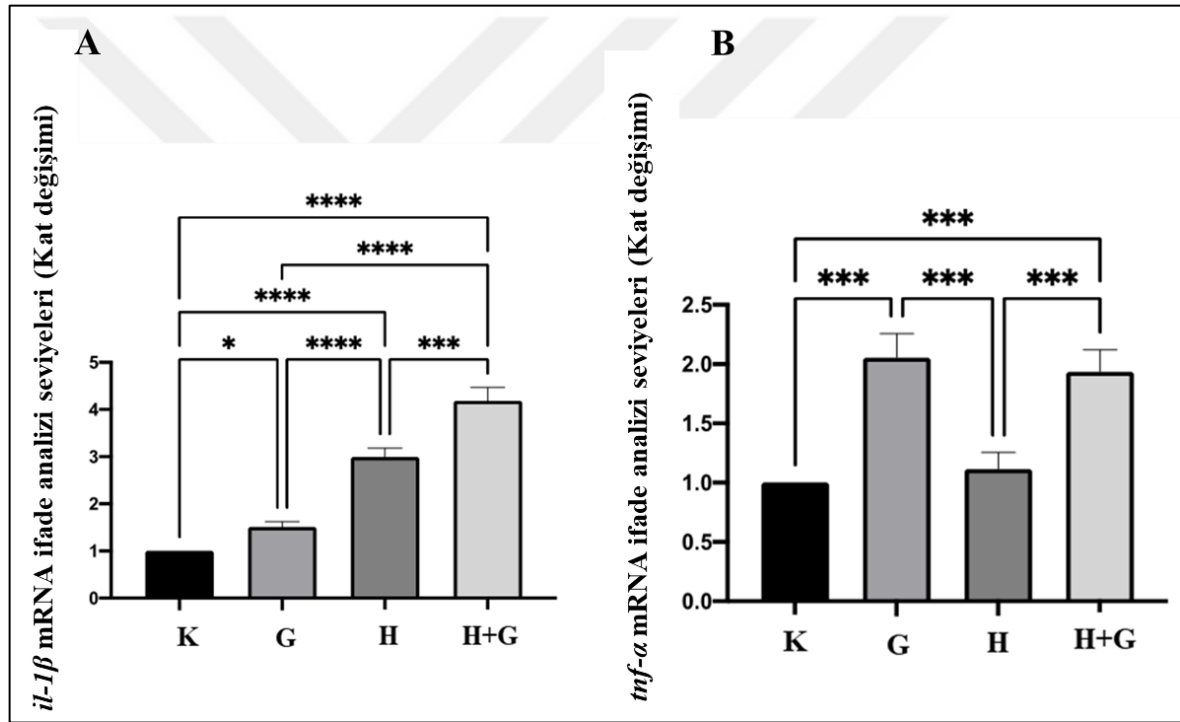
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Housekeeping gen olarak *beta aktin* kullanılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.4.2. İnflamatuvar genlerin mRNA ifade analizi sonuçları

Grupların *il-1 β* ve *tnf- α* mRNA ifadelerinin analiz sonuçları grafikleri Şekil 24’de verilmektedir (Şekil 24). Gingipain enjeksiyonu hem kontrol grubu hem de hiperglisemik grupta *il-1 β* ifade seviyesinde artışa neden oldu ($p<0,05$, $p<0,0001$). Bu artış H+G (3 kat) grubunda G (1,5 kat) grubuna kıyasla çok yüksek seviyede gerçekleşti. *tnf- α* seviyeleri incelendiğinde, gingipain enjeksiyonu daha gerek sağlıklı (2 kat) gerek hiperglisemik grupta (1,9 kat) ifade düzeylerinde artışa neden oldu ($p<0,001$). Bu artış hiperglisemik grupla sağlıklı grup karşılaştırıldığında ise *tnf- α* ifade düzeylerinde anlamlı bir farka rastlanmadı ($p=0,8$).



Şekil 24. Grupların RT-PCR ile ölçülen inflamatuvar genlerin **A: *il-1 β*** ; **B: *tnf- α*** mRNA ifade değişiklikleri grafikleri

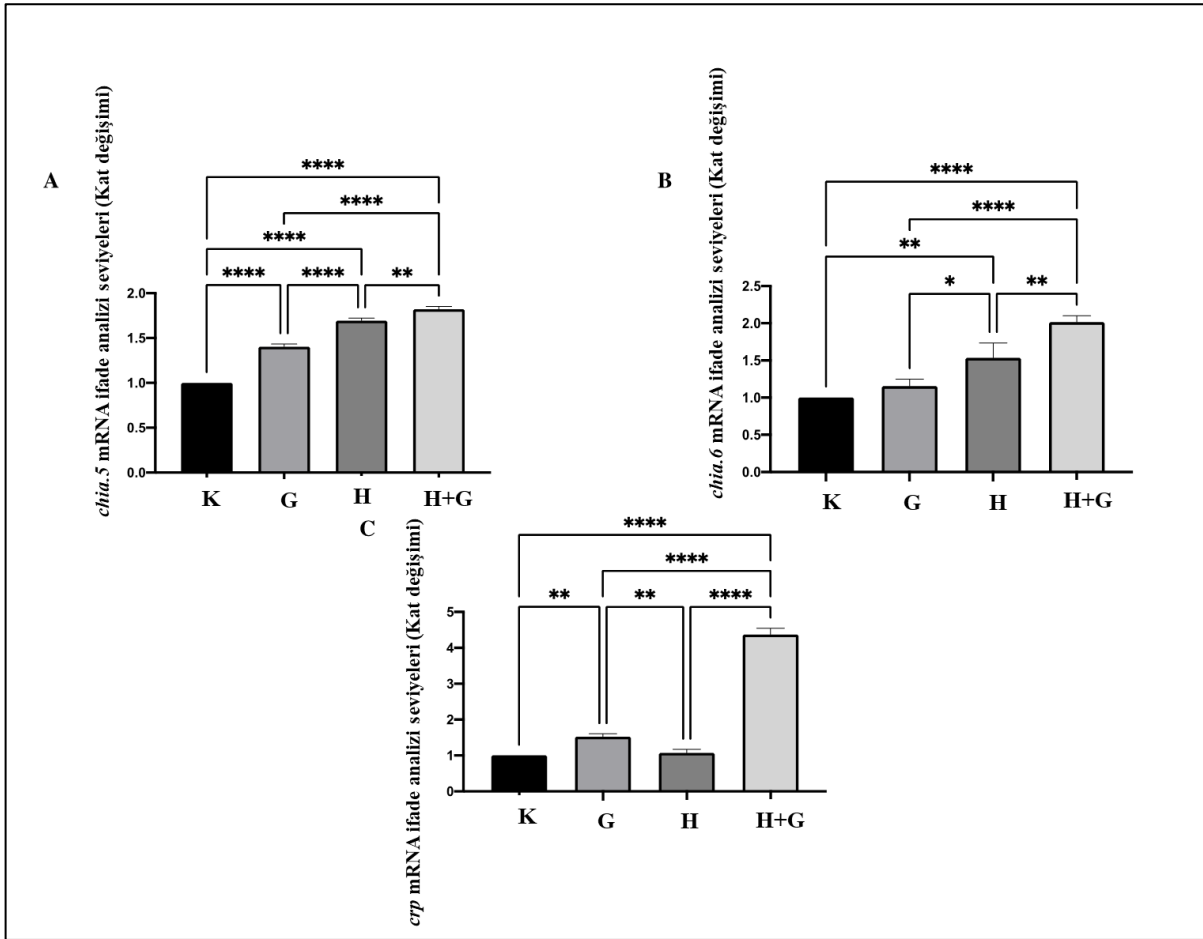
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Housekeeping gen olarak *beta aktin* kullanılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.4.3. Akut faz proteini ilişkili genlerin mRNA ifade analizi sonuçları

Grupların *chia.5*, *chia.6* ve *crp* mRNA ifadelerinin analiz sonuçları grafikleri Şekil 25’de verilmektedir (Şekil 25). Grupların *chia.5* ve *chia.6* genlerinin mRNA ifade analizi seviyelerine bakıldığında gingipain enjeksiyonu hem hiperglisemik grup hem de sağlıklı grup olan H+G ve G gruplarında *chia.5* mRNA ifade seviyesinde artışa neden oldu ($p<0,0001$). Bu artış hiperglisemik grupta yani H+G grubunda G grubuna göre (1,2 kat) daha anlamlıydı. H ve H+G grubunda *chia.6* mRNA ifade seviyesinde anlamlı artış görülürken G grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış görülmedi (Sırasıyla $p<0,01$, $p<0,0001$ ve $p=0,42$). Grupların *crp* mRNA ifade analizi seviyelerine bakıldığında, gingipain enjeksiyonun hiperglisemik grupta sağlıklı gruba göre çok daha yüksek seviyede (4 kat), yani H+G grubunun G grubuna kıyasla anlamlı artışa neden olduğu gösterildi ($p<0,0001$). Tek başına hiperglisemik durumda *crp* seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilemedi, buna karşın *chia.5* ve *chia.6* gen ifade düzeylerinde sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü (sırasıyla $p=0,84$, $p<0,0001$ ve $p<0,01$).



Şekil 25. Grupların RT-PCR ile ölçülen akut faz proteini ilişkili genlerin **A:** *chia.5*; **B:** *chia.6*; **C:** *crp* mRNA ifade değişiklikleri grafikleri

K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

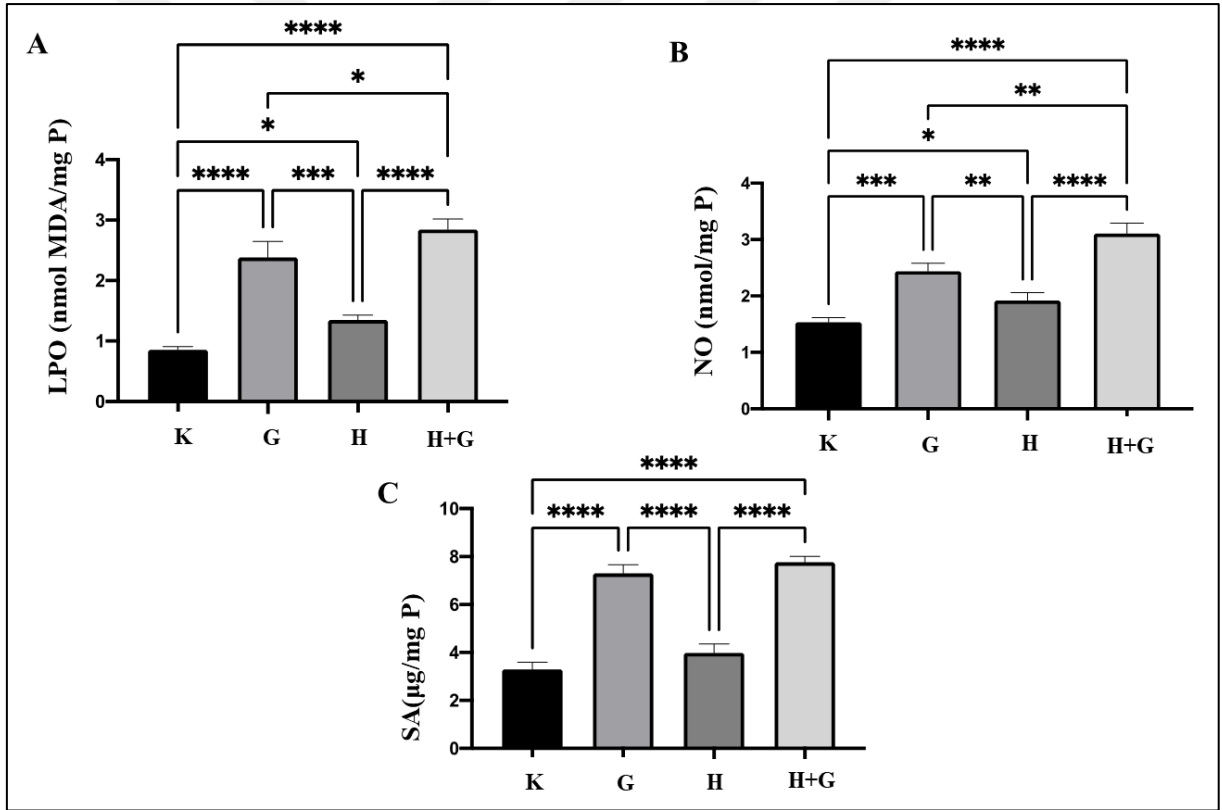
Housekeeping gen olarak *beta aktin* kullanılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.)

6.5. Biyokimyasal Parametrelerin Sonuçları

6.5.1. Grupların lipid peroksidasyon, nitrik oksit ve siyalik asit düzeyleri analiz sonuçları

Gruplar arası LPO, NO ve SA düzeylerinin karşılaştırılma grafikleri Şekil 26’de verilmektedir (Şekil 26). LPO, NO ve SA seviyelerinde gingipain enjeksiyonu sonrası G ve H+G gruplarında yani hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı artış görüldü ($p<0,05$). LPO, NO ve SA düzeylerinin hepsinde H+G grubunda kontrole kıyasla yüksek düzeyde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,0001$). H+G grubunda G grubuna göre LPO ve NO seviyelerinde anlamlı artış görüldü fakat SA seviyesinde ise anlamlı artış tespit edilmedi (Sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p=0,36$). Hiperglisemik grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p=0,11$), hiperglisemik gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında gingipain enjeksiyonuyla birlikte SA seviyesinde anlamlı artış tespit edildi ($p<0,0001$).



Şekil 26. Grupların A: LPO; B: NO; C: SA düzeyleri karşılaştırılması grafikleri

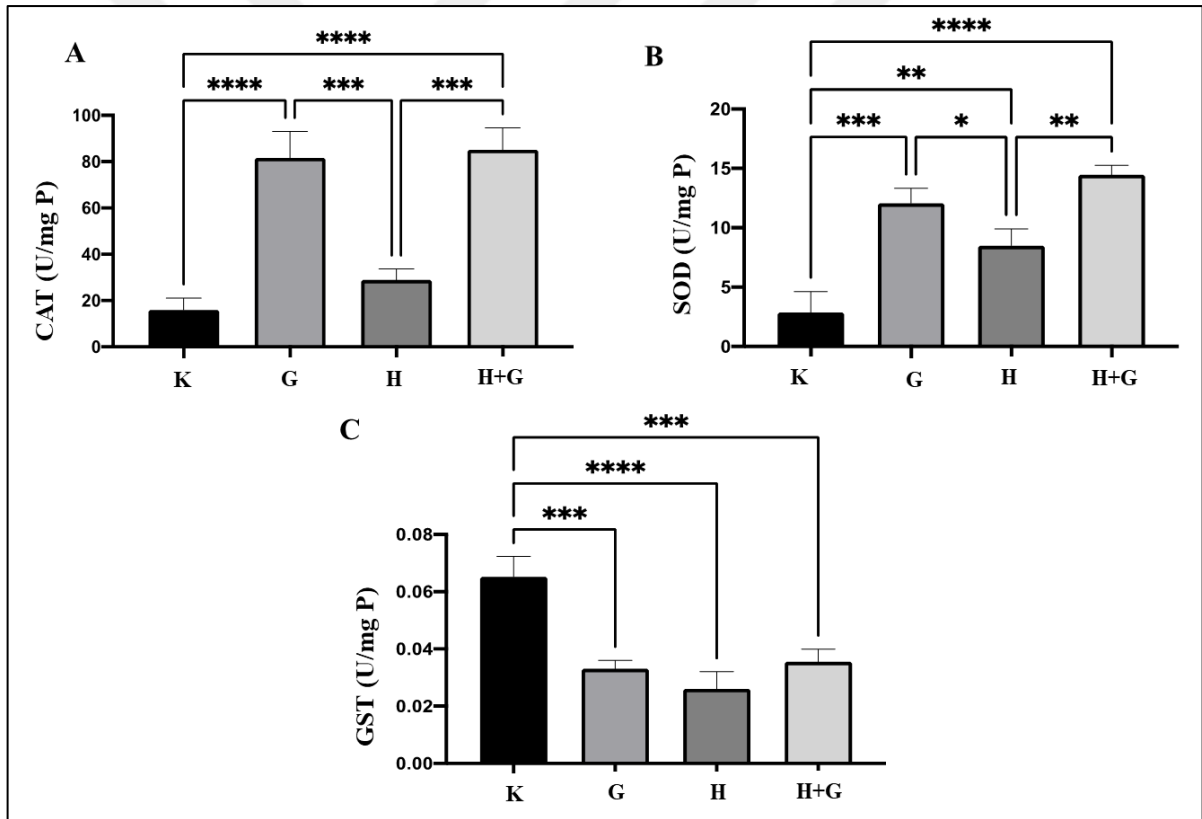
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.5.2. Grupların katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon s-transferaz aktivitelerinin analiz sonuçları

Gruplar arası CAT, SOD ve GST düzeylerinin karşılaştırılma grafikleri Şekil 27’de verilmektedir (Şekil 27). CAT ve SOD aktivitesinde gingipain enjeksiyonu sonrası hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede artış görüldü (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,001$ ve $p<0,001$, $p<0,01$). SOD ve CAT aktivitesinde H+G grubunda G grubuna kıyasla anlamlı artış tespit edilemedi ($p=0,21$ ve $p=0,95$). Hiperglisemik grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış SOD aktivitesi için tespit edilirken CAT için H grubunda K grubuna göre anlamlı artış tespit edilemedi ($p<0,01$, $p=0,28$). GST aktivitelerinde G, H ve H+G gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldi (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,0001$ ve $p<0,001$). H+G grubundaki GST aktivitesinde G grubuna kıyasla anlamlı artış görülmedi ($p=0,93$)



Şekil 27. Gruplar arası A: CAT; B: SOD; C: GST aktiviteleri karşılaştırması grafiği

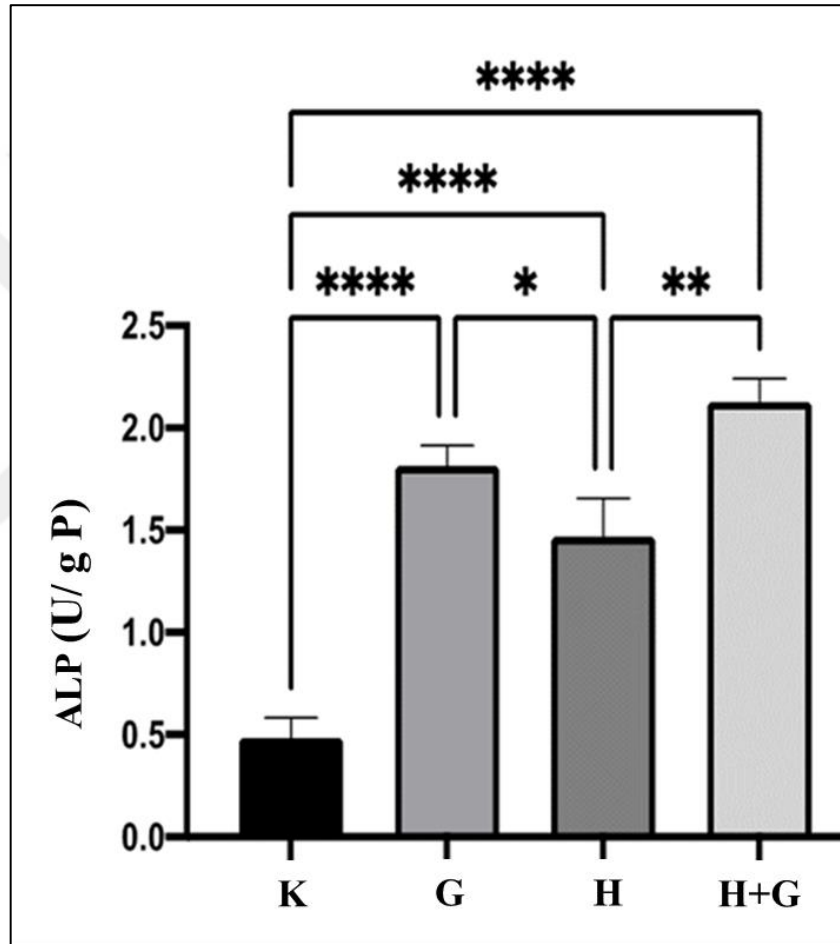
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.5.3. Grupların alkalen fosfataz aktivitelerinin analiz sonuçları

Grupların ALP aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği Şekil 28’de verilmektedir (Şekil 28). Kontrol grubuna kıyasla G, H ve H+G gruplarındaki ALP aktivitelerinde anlamlı artış görüldü (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,0001$). Gingipain enjeksiyonu sonrası ALP aktivitelerinde hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı derecede artış meydana geldi ($p<0,0001$, $p<0,01$).



Şekil 28. Gruplar arası ALP aktiviteleri karşılaştırması grafiği

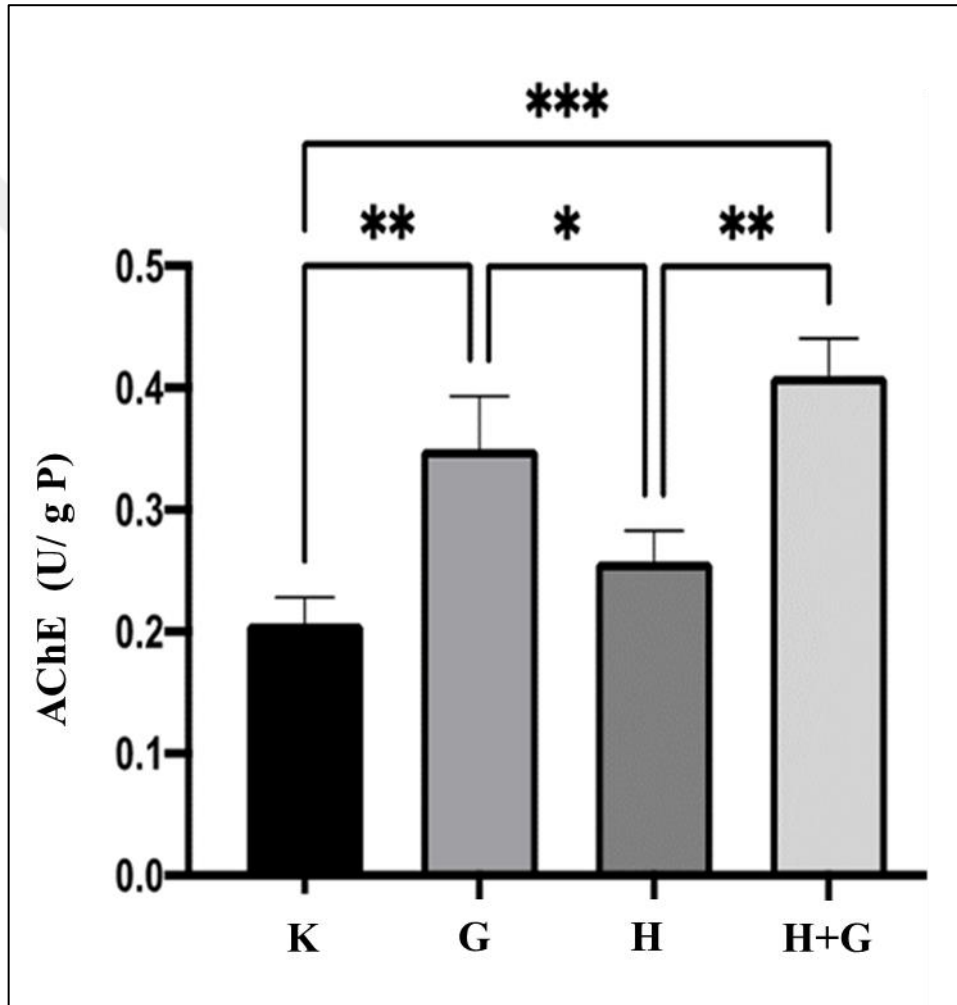
K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

6.5.4. Grupların asetilkolin esteraz aktivitelerinin analiz sonuçları

Grupların AChE aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği Şekil 29’da verilmektedir (Şekil 29). Kontrol grubuna kıyasla G ve H+G gruplarındaki AChE aktivitelerinde anlamlı artış görüldü, H grubunda ise anlamlı artış tespit edilemedi. (Sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p=0,26$). Gingipain enjeksiyonu sonrası AChE aktivitelerinde hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı derecede artış meydana geldi ($p<0,01$ ve $p<0,001$).



Şekil 29. Gruplar arası ALP aktiviteleri karşılaştırması grafiği

K: Kontrol; G: Gingipain; H: Hiperglisemi; H+G: Hiperglisemi + Gingipain

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

(**** $p<0,0001$; *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$.)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Periodontal hastalıklar, diş yüzeyi ve çevresindeki dokularda kolonize olan mikroorganizmalar ve o mikroorganizmaların salgıladıkları ürünler ile onlara karşı gelişen konak cevabı arasındaki hassas dengenin bozulması sonucu meydana gelen kronik, enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklardır (Offenbacher, 1996). Periodontal hastalıkların patogeneğinde rol oynayan mikrobiyal kompleks içerisindeki patojen bakteriler Socransky ve ark. (1998) tarafından bulundukları bölgelere, oluşturdıkları hastalığın gelişim evrelerine ve patojenitelerine göre değişik renk gruplarına ayrılarak sınıflandırılmıştır. Patojenitesi en yüksek olan grup kırmızı kompleks adını almaktadır ve bu kompleks içerisinde *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* ve *P. gingivalis* gibi zorunlu anaerop bakteriler bulunmaktadır (Socransky ve ark., 1998). Kırmızı kompleks bakteriler içerisinde öne çıkan *P. gingivalis*, periodontitiste anahtar rol oynamakta olup sistemik hastalıklarla da yakından ilişkilidir. Bu bakteri vücutta dolaşım yoluyla hareket ettiği, varlığının ve virulans faktörlerinin beyin ve kalp gibi bazı hayati organlarda da saptandığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. (Hajishengallis, 2015; Dominy ve ark., 2019; Bahar ve ark., 2021).

Periodontitis patogeneğinde kilit taşı patojen olarak yer alan *P. gingivalis*'in kommensal bakteri popülasyonunu yeniden düzenleyerek disbiyozise neden olduğu, ayrıca virulans faktörleri aracılığıyla da immün yanıtı kendisi yararına regüle ettiği gösterilmiştir (Hajishengallis, 2015; Olsen ve ark., 2017). Virulans faktörleri arasında LPS, fimbria, kapsül, DZV, proteinazlar, kolejenazlar ve gingipainler sayılmaktadır (Xu ve ark., 2020). Periodontal dokuların yanı sıra vücudun diğer bölgelerinde de tespit edilen bu bakteri ve onun ürünleri Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi sistemik hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (Widziolek ve ark., 2016; Dominy ve ark., 2019; Bahar ve ark., 2021; Bachtiar ve ark., 2022; Bahar ve ark., 2021).

P. gingivalis virulans faktörleri içerisinde en kuvvetli antijenik etkiye sahip enzim, *P. gingivalis* proteazlarından sistein proteinaz yapısında olan ve gingipain adı verilen ekstraselüller enzimlerdir (Jia ve ark., 2019). Gingipainler konağa ait proteinleri denatüre ederler ve immün yanıtı değiştirme kabiliyetine sahip olup periodontitisin gelişmesinde ve ilerlemesinde önem taşırlar (Fitzpatrick ve ark., 2009).

Son yıllarda *P. gingivalis*'in virulans faktörleri içerisinde özellikle gingipainlerin önemini vurgulayan çalışmaların sayısı artmaktadır. Gingipaini öne çıkaran bu çalışmalar genellikle ya canlı *P. gingivalis* kullanıp gingipain blokerleri kullanılarak yapılan ya da gingipain salgılayamayan mutant *P. gingivalis* kullanılan çalışmalardır (Farrugia ve ark., 2021;

Widziolek ve ark., 2016). Doğrudan gingipainin etkisini *in vivo* şartlarda araştıran çalışmalar ise sayıca daha azdır (Gibson III & Genco, 2001; Wilensky ve ark., 2017). Fare modeli üzerinde aşı amaçlı yapılan bir araştırmada sadece doğal *P. gingivalis* veya RgpA ile aşılamanın hayvanların maksiller kemik kaybından korunduğu gösterilmiştir (Gibson III & Genco, 2001). Yine farelerde yapılan bir başka aşı çalışmasında, RgpA ile aşılama sonucu proinflatuar sitokinler içerisinde IL-1 β 'nin üretiminde azalma ve IL-4 gibi anti-inflatuarlar sitokinlerde artış meydana geldiği ortaya konularak immün yanıtın değiştiği gözlenmektedir. Aşılama ile birlikte anti-inflatuar yanıtın gelişmesiyle birlikte gingipainin %50 oranında alveolar kemik kaybını önleyebildiği gösterilmiştir (Wilensky ve ark., 2017). Bu çalışmaların yanında gingipainlerin aynı zamanda kardiovasküler hastalıklar ve Alzheimer gibi hastalıklarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (Widziolek ve ark., 2016; Dominy ve ark., 2019). Widziolek ve ark. (2016), zebra balıklarında kalp endoteliumunda *P. gingivalis*'i göstererek bakterinin perikardiyal ödem ve kardiyak hasara yol açtığını tespit etmişler, gingipainlerin bakteriye ait bu hasarın ortaya çıkmasında major bir role sahip olduğunu vurgulamışlardır (Widziolek ve ark., 2016). Dominy ve ark. (2019) Alzheimer hastalarının beyin lezyonlarında gingipainleri göstererek *P. gingivalis*'in ve daha spesifik olarak gingipainlerin hastalığın gelişiminde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Dominy ve ark., 2019). Bu çalışmalar, araştırmacıların *P. gingivalis* ve daha spesifik olarak gingipainler üzerine yoğunlaştıklarını göstermektedir.

Periodontal hastalıkların sistemik hastalıklarla olan çift yönlü ilişkisi günümüzde artık kabul edilmiş olup periodontal hastalıkların güncel sınıflamasında da hiperglisemiyle karakterize diyabet hastalığı kendine ait bir yer edinmiştir (Tonetti ve ark., 2018). Literatürde toplumda yaygın görülen ve kişinin yaşamını olumsuz etkileyen hastalıklar olarak dikkat çeken periodontal hastalıklar ve hiperglisemiyle karakterize sistemik hastalıklarla ilişkisi geçmişten günümüze araştırmacıların ilgisini çekmekte olup bu konuyla ilgili daha derinlemesine araştırmalar yapılmaktadır (Mirzaei ve ark., 2021; Pamuk & Kantarci, 2022). Örneğin periodontopatojenlerden *P. gingivalis* ve bu bakterinin LPS, kapsül, fimbria, kollejenaz ve gingipain gibi virulans faktörleriyle ilgili araştırmalar literatürde devam etmekte olup bunlar içerisinde LPS ile ilgili araştırmalar daha fazla iken gingipain odaklı araştırmalar nispeten azdır (Morran ve ark., 2009).

Literatürdeki bu eksiklikler dikkate alınarak planlanan çalışmamızda, gingipainlerin doğrudan inflammatuar yanıt üzerindeki etkileri hiperglisemik zebra balığı modeli kullanılarak *in vivo* şartlarda araştırıldı. Bilgimiz dahilinde bu çalışmamız literatürde bir ilktir ve gingipain ile sistemik hastalıklar arasındaki ilişkilerin incelenmesi doğrultusunda gelecekteki çalışmalara rehber olacaktır.

Bu tez çalışmasında, deney hayvan modelleri arasında sahip olduğu çeşitli avantajlar sebebiyle model organizma olarak zebra balıkları tercih edildi. Zebra balıklarının en önemli avantajlarından birisi insan genomuyla büyük oranda homoloji göstermesi ve insanlara ait hastalıklarla ilişkili genlerin %75'inden fazlasına sahip olmasıdır. Bunun yanında laboratuvarda bakımlarının kolay, boyutlarının küçük ve üreme döngülerinin kısa olması da diğer hayvan modellerine kıyasla çok daha avantajlıdır (Howe ve ark., 2013; Karaman ve ark., 2020). Zebra balıkları kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite gibi sistemik hastalıkların araştırılmasında kullanıldığı gibi bakteri kaynaklı meydana gelen konaktaki inflamatuvar durumların ve patogenezin araştırılmasında da kullanılmakta olup, enfeksiyon ve enfeksiyon nedenli hastalıklarda konak ve patojen arasındaki ilişkilerin daha rahat ve daha spesifik incelenmesine olanak sunmaktadır (Miller & Neely, 2004; Widziolek ve ark., 2016; Sullivan ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018).

Zebra balıkları insanlarla benzer glukoz metabolizmasına, reaktif metabolit üretme yollarına ve bunun yanında fizyolojik ve hastalık oluşturan patofizyolojik yollara sahiptir. Hipergliseminin esas rol oynadığı obezite ve diyabet gibi metabolik durumlar ve bunların meydana getirdiği patolojik değişimler zebra balıklarında da benzer şekilde izlenmektedir. Örneğin; yüksek yağlı diyet uygulamasıyla T2DM oluşturulan farelerdeki hiperglisemik durum ve ortaya çıkan komplikasyonlar, zebra balıklarında 6 ay yerine 2 hafta gibi çok daha kısa bir sürede geliştirilebilmektedir (Heckler & Kroll, 2017; Zang ve ark., 2017; Zang ve ark., 2018). Zebra balığı modelinde hiperglisemi oluşturma yöntemleri arasında aşırı beslemenin yanında glikoz inkübasyonu ve streptosizin enjeksiyonu da kullanılabilir (Heckler & Kroll, 2017). 2 hafta besleme protokolü uygulanan ekibimize ait yeni bir çalışmada zebra balıklarında glukoz intoleransı ve hiperglisemi geliştirilmiş ve bu durumun oksidatif stres ürünleri ve sitokinler gibi inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkileri incelenmiştir (Dandin ve ark., 2022).

Zebra balıkları *P. gingivalis* ile kardiyovasküler hastalık ilişkisini araştıran çalışmalarda da model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda zebra balığı kullanımının yanında dikkat çeken bir diğer unsur ise *P. gingivalis* virulans faktörlerinden gingipaini öne çıkarmalarıdır. Bu çalışmalar doğrudan doğal *P. gingivalis* ile birlikte gingipain blokerleri kullanılarak ya da gingipain salgılayamayan mutant *P. gingivalis* kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda bakteriye ait diğer virulans faktörlerini dışlayamadığı için, sadece gingipaine özgü etkileri ispatlamakta yetersiz kalmaktadır (Widziolek ve ark., 2016; Farrugia ve ark., 2021). Çalışmamızda sadece gingipaine bağlı inflamatuvar etkiler üzerinden hiperglisemik durumda oluşan değişiklikler incelendiği için daha spesifik bir biçimde gingipain nedenli patolojilerin açığa çıkarılmasına büyük katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Gingipainin yetişkin zebra balıklarında in vivo şartlarda doğrudan kullanımı literatürde bir ilk olduğu için öncelikle gingipaine karşı gelişen maksimum inflamatuvar yanıtı ölçmeye yönelik doz ve süre belirleme çalışması yapıldı. Gingipaine özgü muhtemel doz hesaplanırken literatürde Wilensky ve ark., (2017)'in yaptığı fare modeli kullanılan çalışma referans alındı. Bu çalışmadaki yaklaşık 15 g ağırlığında fareye özgü gingipain dozu yaklaşık 1 g ağırlığındaki zebra balıklarına uyarlanarak zebra balığına özgü doz hesaplandı (Wilensky ve ark., 2017). Ticari olarak elde edilmiş recombinant RgpA'nın zebra balıklarında 9,3 nmol/L, 93 nmol/L ve 186 nmol/L olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda enjeksiyonlarının sitokin düzeyleri üzerine etkilerinin 3., 6., 15., 24., 48. ve 72. saatlerde incelenmesi sonucu en etkili doz 186 nmol/L ve süre 6. saat olarak belirlendi (Kose ve ark., 2022). Bu verilere dayanarak deneyde kullanılacak olan gingipain enjeksiyonun dozu ve zebra balıkları için enjeksiyonlar sonrası sakrifikasyon zamanları belirlendi. Bu çalışma literatürde ilk olduğu için doz ve zamanlama anlamında karşılaştırabileceğimiz herhangi bir çalışma mevcut değildir. Sakrifikasyon sonrası inceleme yapılacak doku örneği olarak Dandin ve ark. (2022)'in yapmış oldukları çalışma referans alınarak hepatopankreas dokusu tercih edildi. Hem hiperglisemik etkilerin incelenmesinde hem de inflamatuvar durumlarda akut faz proteinleri ve sitokinlerin düzenlenmesinde ve de oksidan antioksidan sistem elemanlarının işleyişinde özellikle karaciğerin görev alması bu tercihteki en önemli etkenlerden biriydi.

Hiperglisemik durum ile iç ve dış etkenler arasındaki etkileşimler literatürde çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır. Bunlar arasında en kontrollü yöntemlerden biri hayvan modelleridir. Rodent modellere alternatif olarak zebra balıkları bir diğer hayvan modeli olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada hiperglisemi ve periodontal hastalıklar arasındaki etkileşimler, meydana getirdikleri inflamasyon açısından, hiperglisemi modeli oluşturulmuş zebra balıklarında periodontal enfeksiyon yerine gingipain enjeksiyonu yapılarak değerlendirildi. Bu sebeple deneyimizde yetişkin zebra balıklarına aşırı besleme protokolü uygulanarak hiperglisemi modeli oluşturuldu. 2 hafta sonunda değerlendirilen vücut ağırlıklarındaki önemli ölçüdeki artış, yüksek açlık kan şekeri ve OGTT seviyeleri, zebra balıklarının hiperglisemik olduklarını doğruladı. Elde edilen bu bulgular Zang ve ark. (2013) ve Dandin ve ark. (2022) yapmış olduğu çalışmaların verileriyle uyumluydu. (Dandin ve ark., 2022; Zang ve ark., 2013).

Gingipain enjeksiyonuyla yaratılan periodontal patojen endotoksini kökenli inflamasyon, fazla beslenerek elde edilmiş hiperglisemi grubunda (H+G) daha yüksek açlık kan şekeri seviyelerine yol açtı ($p<0,0001$). Ek olarak, bu grupta OGTT değerlerinin 60 ve 120 dakikalarda önemli ölçüde artmış olduğu gösterilerek glukoz intoleransının geliştiği tespit edildi. Ayrıca, glukoz değerlerine paralel olacak şekilde H+G grubundaki *ins* mRNA ekspresyon seviyeleri de tüm

gruplar arasında en yüksek bulundu ($p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,05$). Bu bulgular periodontal hastalıkların varlığında glisemik kontrolün zorlaştığını bildiren literatürdeki araştırmalarla uyumluydu (Engebretson ve ark., 2004; Aemaimanan ve ark., 2013).

Bu çalışmada meydana gelen inflamatuvar durum RT-PCR yöntemi kullanılarak mRNA seviyesinde pro-inflamatuvar sitokinlerden *il-1 β* ve *tnf- α* ifade düzeyleriyle belirlendi. Buna ilave olarak, gingipain ile yaratılan sistemik inflamasyona karşı gelişen akut faz yanıtı *crp* ve YKL-40 analogu *chia.5* ve *chia.6* ifade düzeyleriyle tespit edildi.

Bu bulgular incelendiğinde gingipain enjeksiyonu hem hiperglisemik grupta hem de sağlıklı grupta *il-1 β* ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu ($p<0,05$ ve $p<0,001$). Bu artışın hiperglisemik grupta sağlıklı gruba göre çok daha yüksek seviyede gerçekleştiği görüldü ($p<0,0001$). Bu bulgu hiperglisemi ve periodontal hastalığın birlikte görüldüğü durumlardaki artmış IL-1 β seviyesini destekler nitelikteydi (Engebretson ve ark., 2004; Preshaw ve ark., 2020).

Diğer bir pro-inflamatuvar sitokin olan *tnf- α* ifade düzeylerine bakıldığında ise, gingipain enjeksiyonu gerek hiperglisemik gerek sağlıklı grupta *tnf- α* ifade düzeylerinde de anlamlı artışa neden oldu ($p<0,001$). Bu artış hiperglisemik grupla sağlıklı grup karşılaştırıldığında anlamlı değildi ($p=0,8$). Bu sonuç, gingipain ile oluşturulan inflamasyonun *tnf- α* ifade düzeyini çok yüksek seviyelere çıkardığı ve organizmadaki hiperglisemik statünün bu durumu etkilemediği şeklinde yorumlanabilir, ya da hiperglisemik durumlarda *tnf- α* 'nın inflamatuvar durumu belirlemede doğru bir belirteç olmayabileceği fikrini destekler bir sonuç ortaya koyar ki, bu bulgu Engebretson ve ark., (2007) ve Mohamed ve ark., (2015)'ın bulgularıyla paraleldir (Engebretson ve ark., 2007; Mohamed ve ark., 2015).

Hiperglisemiyle karakterize DM gibi hastalıklarda periodontal hastalığın varlığının vücuttaki inflamatuvar yanıtı daha şiddetli hale getirdiği çeşitli derlemelerde bildirilmiştir (Polak & Shapira, 2018; Graves ve ark., 2020). Bu çalışmada, gingipain enjeksiyonu sonucunda elde edilen *il-1 β* 'ya ait mRNA ifade düzeyleri, hiperglisemi ve periodontal hastalıklardaki inflamatuvar etkilerin araştırıldığı derlemelerde ortaya konulan genel görüş ile tutarlıydı (Polak & Shapira, 2018; Graves ve ark., 2020). Buna karşın, *tnf- α* 'ya ait mRNA ifade düzeyinde elde edilen bulgular, *tnf- α* 'ya kıyasla *il-1 β* 'nın özellikle hiperglisemik koşullarda inflamasyon seviyesini belirlemede daha hassas bir belirteç olduğu fikrini desteklemektedir (Engebretson ve ark., 2007; Jiang ve ark., 2013; Mohamed ve ark., 2015).

CRP, inflamasyon ile birlikte artış eğilimi gösteren ve araştırmalarda sıklıkla tercih edilen önemli bir pozitif akut faz proteindir. CRP seviyeleri, inflamatuvar sürecin ve bununla ilişkili hastalığın teşhisi, izlenmesi ve tedavisi için bilgi sağlar (Ebersole & Cappelli, 2000). CRP ve periodontitis arasındaki ilişkinin incelendiği sistematik derlemede, kesitsel çalışmalarda plazma CRP miktarının periodontitisli hastalarda kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu ve periodontal tedavinin CRP düzeylerini düşürmede etkili olduğu gösterilmiştir (Paraskevas ve ark., 2008). DM ve obezitede oluşan inflamatuvar yanıtta artış CRP seviyelerindeki değişikliklerle izlenebilir (Ford, 1999; Rathcke ve ark., 2006). Metabolik sendromun görüldüğü hiperglisemik ve periodontitisli hastaların CRP serum seviyelerinde de artış saptanmıştır (Polak & Shapira, 2018). Ancak, bizim bulgularımız tek başına hiperglisemik durumlarda *crp*'ye ait mRNA ifade düzeylerinde anlamlı bir artış göstermemiştir ($p=0,84$). Buna karşın, gingipain enjeksiyonu bu artışı son derece anlamlı hale getirmiş ve 4 kat artış sağlamıştır ($p<0,0001$). Bu sonuç *crp* ifade düzeyindeki bu artışın hiperglisemik durumdan ziyade inflamatuvar durumla ilgili olduğu şeklinde yorumlanabilir.

YKL-40 (CHI3L1), hem akut hem de kronik inflamasyonda rol oynayan önemli bir akut faz proteindir ve araştırmalarda nispeten daha az çalışılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve T2DM gibi inflamasyon ile karakterize hastalıklarda sağlıklı bireylere göre vücut sıvılarındaki YKL-40 düzeyinin arttığı gösterilmiştir. (Nielsen ve ark., 2008; Tizaoui ve ark., 2022). Ayrıca gingivitis ve periodontitise sahip bireylerden alınan serum ve dişeti oluğu sıvısı örneklerinde YKL-40 düzeylerinin sağlıklı bireylerden alınanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Keles ve ark., 2014).

Koch ve ark. (2014), zebra balığındaki kitinazları ve kitinaz benzeri proteinleri tanımlamış ve bunları CHIA.1-6 olarak adlandırmış ve özellikle CHIA.4, CHIA.5 ve CHIA.6'nın esas olarak karaciğerde bulunduğunu bildirmiştir (Koch ve ark., 2014). İlerleyen araştırmalarında kitinazların inflamatuvar hastalıklardaki rolünü değerlendirmede diğer geleneksel modellerin yanında zebra balıklarının da kullanabileceğini rapor etmişlerdir (Koch ve ark., 2015). Çalışmamızda hiperglisemik grupta, gingipain enjeksiyonu sonrası YKL-40 analogları olan *chia.5* ve *chia.6*'lara ait mRNA ifade düzeylerinde *crp*'ye paralel şekilde artış görüldü ($p<0,0001$). Stockhammer ve ark. (2009), *S. Typhimurium* enfeksiyonunun zebra balıklarındaki *chia.6* seviyesinde artış meydana getirdiğini göstererek zebra balığı kitinaz gen ailesinin, hem bakteriyel hem de fungal enfeksiyonlara karşı immünolojik yanıtlarda rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdi (Stockhammer ve ark., 2009). Bizim bulgularımızda da gingipain enjeksiyonu *chia.5* mRNA ifade düzeyinde dramatik bir artışa neden oldu ($p<0,0001$). Buna ilave olarak, sadece hiperglisemik durum (H grubu) *chia.5* ve *chia.6* seviyelerinde anlamlı artışa sebep oldu

($p<0,0001$ ve $p<0,01$). Bu sonuçlar Tüten ve ark. (2022)'ın gestasyonel diyabetli hastalarda elde ettikleri yüksek YKL-40 sonuçları ile uyumluydu (Tüten ve ark., 2022).

YKL-40'ın hipergliseminin hakim olduğu diyabetik durumlarda CRP'e alternatif bir belirteç olarak kullanılabileceği görüşü üzerine bu çalışmada zebra balığındaki YKL-40 analog genleri *chia.5* and *chia.6* ile birlikte *crp* düzeyleri araştırıldı. (Nielsen ve ark., 2008). Literatürde bazı araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarda, CRP düzeylerinin hiperglisemik durumların varlığında arttığı tespit edilse de çalışmamızda hiperglisemik zebra balıklarında *crp*'ye ait mRNA ifade düzeyleri etkilenmemiş, ancak gingipain enjeksiyonunun hiperglisemik grupta (H+G) *crp* mRNA ekspresyonlarını önemli ölçüde arttırdığı bulundu (Pfützner & Forst, 2006; Seo & Shin, 2021). Bu çalışmanın sonuçları hiperglisemik durumlarda gingipain enjeksiyonu olsun ya da olmaksızın akut faz proteini genleri içerisinde *chia.5* geninin öne çıktığını göstermektedir. Bu doğrultuda verilerimiz Nielsen ve ark. (2008) 'ın yapmış olduğu çalışmada olduğu gibi hiperglisemik durumlarda YKL-40 analogu olan *chia.5* geninin *crp*'den daha doğru bir belirteç olabileceğini destekler nitelikteydi (Nielsen ve ark., 2008). Ayrıca, bu çalışmada gingipain varlığında yüksek seviyelere ulaşan YKL-40 analogları, *chia.5* ve *chia.6* genleri, YKL-40'ın periodontitisle ilgili inflamatuvar durumun belirlenmesinde ve periodontal tedaviye verilen yanıtın izlenebilmesinde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği görüşü ile paralellik göstermektedir (Keles-Yucel ve ark., 2020).

İnflamatuvar durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, oksidan ve antioksidanlar arasındaki hassas dengenin bozulmasıyla meydana gelmektedir. Bu dengenin bozulmasıyla birlikte organizmada hücresel antioksidanların üretiminde azalma görülür. Aşırı miktarda üretilen serbest radikaller, hücre zarındaki yağ asitleri ve proteinlerle reaksiyona girerek hücre zarında hasara yol açarak hücreleri görevlerini yerine getiremeyecek şekilde kalıcı olarak etkiler (Khansari ve ark., 2009). Periodontitis ve diyabet gibi hastalıkların patogenezinde reaktif oksijen türevlerinin artmasına bağlı meydana gelen oksidatif stres hasarı karşımıza çıkmaktadır (Iova ve ark., 2021; Oktay ve ark., 2019). Serbest radikallerin vücutta doku hasarına sebep olduğu bilindiği gibi periodontal doku hasarında rol oynadıkları da gösterilmiştir (Amarnath & Nellore, 2011). LPO ürünlerinin üretilmesi yoluyla diyabet, mikrobiyal kaynaklı kronik inflamatuvar süreci şiddetlendirebilir. LPO, DNA hasarı, enzim oksidasyonu, pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu ve dejeneratif değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli yollarla doku hasarına neden olabilir (Bastos ve ark., 2012). Bu tez çalışmasının bulgularında, LPO seviyelerinde gingipain enjeksiyonu sonrası G ve H+G gruplarında yani hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı artış görüldü ($p<0,0001$). H+G grubunda G grubuna göre LPO seviyelerinde anlamlı artış görüldü ($p<0,0001$). Bu bulgular, Bastos ve ark. (2012) çalışması ile uyumluydu ve hiperglisemik

durumlarda periodontal enfeksiyon varlığıyla mevcut inflamatuvar cevabın şiddetinin arttığını konseptini destekledi (Bastos ve ark., 2012).

Toksik bir serbest radikal olan NO, inflamasyon durumunda aşırı üretilip endotele bağlanır ve nötrofil kemotaksisin inhibisyonunda rol oynar (Kim ve ark., 2004). İnflamatuvar hücreler inflamasyon sırasında bakteriler ve LPS gibi ürünlere cevap olarak çeşitli formlarda NO üretirler. NO üretimiyle ilgili bu tür değişiklikler DM ve periodontal hastalıkların patofizyolojisinde de görülmektedir (Skaleric ve ark., 2006). Bu çalışmada, NO seviyelerinde gingipain enjeksiyonu sonrası hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta yani G ve H+G gruplarında anlamlı artış görüldü ($p<0,001$ ve $p<0,0001$). H+G grubunda G grubuna göre NO seviyelerindeki artış daha anlamlıydı ($p<0,01$). Bu bulgular, Skaleric ve ark. (2006) çalışmaları ile uyumluydu (Skaleric ve ark., 2006).

Süperoksit serbest radikallerini hidrojen peroksit katalize eden SOD antioksidan bir enzimdir. Serbest oksijen radikallerini hücre ortamından uzaklaştırmak ve hücreyi bu moleküllerin yıkıcı etkilerinden korumak ile yükümlüdür. Bu tez çalışmasında, SOD aktivitesinde gingipain enjeksiyonu sonrası hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede artış görüldü ($p<0,001$ ve $p<0,01$). SOD aktivitesinde H+G grubunda G grubuna kıyasla meydana gelen artış anlamlı değildi ($p=0,21$). Oktay ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada periodontal enfeksiyon varlığında ratlarda SOD aktivitesinin artmakta olduğunu gösterdiler ve bu bulgular bu tez çalışmasının bulgularıyla uyumluydu (Oktay ve ark., 2015).

Organizmadaki savunma sisteminin bir diğer antioksidan enzimi CAT, SOD etkisiyle oluşan hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesine yardımcı olur ve periodontal hastalıklarda ortaya çıkan oksidatif stresin elimine edilmesinde rol oynar. Bu tez çalışmasında, CAT aktivitesinde gingipain enjeksiyonu sonrası hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede artış görüldü (sırasıyla $p<0,0001$ ve $p<0,001$). CAT aktivitesinde H+G grubundaki artış G grubuna kıyasla anlamlı değildi ($p=0,95$). Periodontitiste SOD ve CAT aktivitelerinin arttığını gösteren çalışmalar gingipain uygulandığında bu enzimlerin aktivitelerinde artış tespit edilen bu tez çalışmasının bulgularıyla uyumluydu (Panjamurthy ve ark., 2005; Oktay ve ark., 2015; Oktay ve ark., 2019).

GST, glutatyon transferazlar ailesi içerisinde yer alan önemli bir detoksifiye edici enzim olup, bu enzimin aktivitesi ve periodontitis ile ilişkili çalışmalar literatürde mevcuttur (Fabrini ve ark., 2014; Oktay ve ark., 2019). Bunlardan, Borges ve ark. (2007) yaptığı çalışmada periodontitis hastalarında dişeti örneklerinden tespit edilen GST aktivitelerinin kontrol grubuna

göre arttığını, Amarnath & Nellore (2011) ise tükürük örneklerinde bu enzimin aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir (Amarnath & Nellore, 2011; Borges ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında, GST aktivitelerinde G, H ve H+G gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldi (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,0001$ ve $p<0,001$). H+G grubundaki GST aktivitesindeki artış G grubuna kıyasla anlamlı değildi ($p=0.93$).

Bu çalışmada hiperglisemiyle ortaya çıkan inflamasyonla birlikte LPO ve NO seviyelerinde artış görüldü. Hiperglisemik gruplardaki gingipain enjeksiyonunu takiben (G ve H+G grubu) LPO ve NO seviyelerinin diğer gruplara kıyasla en yüksek seviyelere ulaştığı tespit edildi. Gingipain enjeksiyonu sonrası LPO ve NO gibi oksidatif stres elamanlarının organizmada seviyesinin yükselmesine cevap olarak antioksidan savunma sisteminin parçası olan enzimler CAT ve SOD aktivitelerinde de paralel artış meydana geldiği görüldü. Aynı zamanda bulgularımızdaki hiperglisemik durumda ve gingipain uygulamasıyla da (H+G grubu) tespit edilen bu oksidan ve antioksidan sistem elemanlarının seviye ve aktivitelerindeki artış diyabetli hastalarda yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bozulmuş oksidan/antioksidan dengesi bulgularıyla uyumluluk gösterdi (Bastos ve ark., 2012; Thomas ve ark., 2014; Iova ve ark., 2021).

GST aktivitelerinde ise sağlıklı gruba kıyasla hiperglisemi oluşturulan ve gingipain uygulanan gruplarda azalma meydana geldiği görüldü. Bulgularımız, sağlıklılara kıyasla hiperglisemik T2DM hastalarda GST aktivitelerinde azalma meydana geldiğini gösteren çalışmalarla uyumludur (Dinçer ve ark., 2002; Verma ve ark., 2013). Bu tez çalışmasının bulgularına benzer şekilde fazla besleme protokolü uygulanarak hiperglisemik zebra modeli oluşturulan bir başka çalışmada ise bulgularımızla benzer şekilde hiperglisemik grupta kontrole kıyasla daha düşük GST aktivitesi tespit edilmiştir (Dandin ve ark., 2022). Sağlıklı gruplarda, dengede olan oksidan-antioksidan sistem şartlarında GST seviyeleri yüksek düzeylerde bulunurken, inflamatuvar durumlarda bu düzey sağlıklı duruma göre azalarak denge yıkım yönünde bozulmaktadır (Panjamurthy ve ark., 2005; Oktay ve ark., 2015; Oktay ve ark., 2019). Bu dengeyi tekrar sağlamak içinse SOD ve CAT gibi diğer antioksidan enzimler inflamatuvar yanıtındaki aktivitelerinde fazlaca artış göstererek serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını hedefleyerek oksidatif hasarın kontrol altına alınmasına katkı sağlayabilir yorumu yapılabilir.

SA, hücre membranlarının bir komponenti olup damar endotelinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve özellikle mikrovasküler hasar oluşturan hastalıklarda serum SA seviyelerinde artış meydana gelir (Prajna ve ark., 2013). Akut faz reaktanlarından olan bu molekülün kandaki seviyelerinin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarda arttığı tespit

edilmiştir (Cheeseman ve ark., 2021). Serum SA seviyelerinin yükselmesi, mikro damarlanmanın yoğun olduğu retinada, böbreklerde, kalpte ve beyinde ciddi yaralanma olduğu anlamına gelmektedir (Nayak ve ark., 2008; Prajna ve ark., 2013). SA, aynı zamanda hücreleri bakteri proteazları gibi yıkıcı enzimlerin saldırılarına karşı korumaktadır. Periodontitis patogeneğinde konak cevabı kadar önemli yer tutan bakteriyel patojenler için iyi bir karbon kaynağı olan bu molekül periodontal patojenlerin kolonizasyonunda önemli role sahiptir. Bakteriyel agregasyonun artmasında rol oynar ve plak oluşum sürecine katılır (Stafford ve ark., 2012). SA'nın serum içerisindeki yüksek seviyelerinin periodontal hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu hastalıkların belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olarak görev alabileceği öne sürülmüştür (Oktay ve ark., 2020; Varki, 2008). Bu çalışmada, hiperglisemik grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında SA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p=0,11$), hiperglisemik gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında gingipain enjeksiyonu ile birlikte SA seviyesinde anlamlı artış tespit edildi ($p<0,0001$). Bulgularımızda elde edilen periodontal enfeksiyon varlığıyla artan SA seviyeleri bulgusu, Oktay ve ark. (2020) araştırmalarında elde edilen periodontitis hastalarının serum tükürük örneklerinden elde edilen yüksek SA seviyesi sonuçlarıyla uyumluydu.

Çalışmamızda beklenilenin aksine SA seviyesinde hiperglisemik durumda istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamayan bir artış tespit edildi. Gingipain enjeksiyonu ise gerek hiperglisemik gerek normal balıklarda SA'da dramatik bir artışa sebep oldu. Bu sonuç SA seviyesinin organizmanın metabolik seviyesinden bağımsız olarak mikrobiyal etkilere karşı oluşan cevapta kullanılabilecek bir belirteç olabileceğini desteklemektedir.

ALP enzimi yüksek pH'ta optimal olarak etki eden ve konak tarafından üretilen bir hidrolaz olup, çeşitli moleküllerden fosfat gruplarının koparılmasını sağlar. ALP'nin ana kaynağı karaciğer, böbrek, kemik, bağırsak ve plasenta olduğu gibi nötrofiller, osteoblastlar, fibroblastlar dahil olmak üzere periodonsiyumun birçok hücresinde bulunur. Esas olarak inflamasyon bölgesine göçleri sırasında polimorfonükleer nötrofillerden, kemik oluşumu sırasında osteoblastlardan ve periodontal rejenerasyon sırasında periodontal ligamentteki fibroblastlardan salınırlar. ALP periodontal hastalıklarda kemik rezorpsiyonu ve dişeti iltihabıyla ilişkilendirilmiştir. De ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, T2DM ve periodontitise sahip hastalardan alınan serum ve tükürük örneklerinde ALP seviyelerinde artış görülmüştür (De ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında, gingipain enjeksiyonu sonrası ALP aktivitelerinde hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı derecede artış meydana geldi ($p<0,0001$, $p<0,01$). Çalışmamızda elde edilen, sadece gingipain etkisiyle artan ALP aktivitesi bulgusu, gingipainin tek başına inflamatuvar yanıtı arttırabildiğini destekler niteliktedir. Khattak ve ark. (2009), sadece diyabete sahip fakat periodontitisi olmayan hastalarda ALP aktivitesinin yükselmesine karşın periodontitise sahip diyabetli hastalarda anlamlı düzeyde bir farkla aktivitede artış göstermişlerdir. Aynı çalışmada, diyabet ve kronik periodontitise sahip hastalarda sadece periodontitise sahip hastalara kıyasla daha yüksek düzeyde ALP aktivitesi tespit edilmiştir (Khattak ve ark., 2009). Bu bulgularla uyumlu şekilde araştırmamızda da hiperglisemik durumda uygulanan gingipain enjeksiyonu sonrası zebra balıklarındaki ALP aktivitesinde artışın daha anlamlı olduğu görüldü ($p<0,0001$).

ACh serotonin, dopamin ve diğer nöropeptitlerin seviyelerini ve aktivitelerini düzenleyerek konağın hem immün yanıtını hem de nörotransmisyon işlevini kontrol eden bir nörotransmitterdir. AChE, ACh'yi asetil ve koline ayrıştırmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda DM, insülin direnci ve hiperlipidemisi olan hastalarda AChE'nin plazma ve doku aktiviteleri daha yüksek bulunmuştur. Bu artışın bir sonucu olarak plazma ve doku ACh düzeylerinin düşük olması beklenmektedir. AChE aynı zamanda ACh'yi inaktive ederek mevcut inflamasyonu arttırabilir. Buradan yola çıkarak obezite, insülin direnci, DM ve hipertansiyon gibi hiperglisemiyle ilişkilendirilmiş çeşitli klinik durumlarda, plazma ve dokularda artmış AChE aktivitesinin artmış inflamatuvar durumda rol oynadığı belirtilmiştir (Pavlov & Tracey, 2006; Das, 2007). Bunun yanında, ACh periodonsiyumda görülebilmektedir ve dişeti oluşu sıvısı, tükürük ve serum gibi vücut sıvılarındaki AChE aktiviteleriyle ilişkilendirilmektedir (Meriç ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında, AChE aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla G ve H+G gruplarında anlamlı artış görüldü, H grubunda ise anlamlı artış tespit edilemedi. (Sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p=0,26$). Gingipain enjeksiyonu sonrası AChE aktivitelerinde hem sağlıklı hem de hiperglisemik grupta anlamlı derecede artış meydana geldi ($p<0,01$). Zebra balıklarına uygulanan gingipain enjeksiyonu AChE'nin aktivitesinde dramatik bir artışa yol açmıştır. Periodontal hastalıklar ve kolinerjik mekanizmalar arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda sağlıklı ve periodontal hastalıklara sahip bireylerden toplanan dişeti oluşu sıvısı ve tükürük örneklerinde, araştırmamızda gingipain enjeksiyonu sonrası elde edilen bulgulara benzer şekilde, sağlıklı bireylere kıyasla periodontal hastalıklara sahip bireylerde artmış AChE aktivitesi tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda periodontal hastalıklarda artmış AChE aktivitesine eşlik eden bulgular arasında artmış inflamatuvar durumu destekler nitelikte artmış sitokin seviyeleri de gösterilmiştir (Apatzidou ve ark., 2018; Meriç ve ark., 2019).

Gingipain enjeksiyonu sonrası tüm akut faz proteinlerinin seviyelerinde meydana gelen anlamlı artış ise *P. gingivalis* 'e ait bu kuvvetli endotoksinin bakteri ve onun diğer bileşenleri olmaksızın tek başına inflamatuvar yanıtı arttırabildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, çalışmada değerlendirilen akut faz proteinlerinin yanı sıra oksidan ve antioksidan parametreler de dahil olmak üzere ALP ve AChE aktivite değerleriyle de desteklendi. Hiperglisemi varlığında uygulanan gingipain enjeksiyonu ise çalışmamızda incelenen ve bahsi geçen tüm bu değerlerde dramatik değişikliklere sebep olmuştur. Bu durum diyabet, obezite gibi hastalıkların varlığında periodontal hastalıklarda oluşan artmış inflamatuvar yanıtın patogenezinde *P. gingivalis* ve daha da spesifik olarak gingipainlerin rolünü ön plana çıkarmaktadır.

Doğal ve kazanılmış bağışıklığa sahip olan zebra balıkları, insanlarda meydana gelen hastalıklara benzer şekilde sistemik hastalık modellemesine izin vermesinin yanında *in vivo* şartlarda *P. gingivalis* 'e ait gingipainin tek başına bir endotoksin olarak inflamatuvar etkisini incelemeye olanak tanınması, bu sahada çalışma yapan araştırmacılara büyük avantaj sağlamaktadır. Etik nedenler dolayısıyla insanlarda tek başına bir endotoksinin doğrudan etkisinin araştırılmasının mümkün olmayışı, rodentlere kıyasla daha kolay çalışma şartlarının olması nedeniyle, bu araştırmada zebra balıkları tercih sebebi olmuştur. Literatürde periodontoloji alanındaki araştırmalarda bugüne kadar çok az sayıda kullanılmış olan zebra balıkları, özellikle periodontal hastalıkların patogenezindeki bilinmeyen noktaların aydınlatılmasında araştırmacılara büyük katkı sağlayabilecektir (Widziolek ve ark., 2016; Farrugia ve ark., 2021).

Bu çalışmada gerek proinflamatuvar sitokinler (*il-1 β* , *tnf- α*) gerekse akut faz proteinlerindeki (*crp*, *chia.5* ve *chia.6*) inflamatuvar yanıt mRNA düzeyinde analiz edilmiş olup protein düzeyindeki analizler ise klinik seviyede biyokimyasal yöntemlerle oksidan-antioksidan parametreler, ALP ve AChE enzim aktivite analizleri yapılarak değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında mRNA düzeyinde analizleri yapılan sitokinlere ait protein seviyesinde yapılabilecek incelemelerin olmaması bir eksiklik gibi görünmesine rağmen amacımız inflamatuvar yanıtın klinik düzeyde değerlendirilmesi olduğu için, bu nokta bir eksiklik olarak değil de bir başka çalışmanın konusu olarak önerilebilir.

Bu tez çalışmasının sonuçları özetlenecek olursa;

Çalışmamız hiperglisemik zebra balıklarında *P. gingivalis* 'e bağlı inflamatuvar etkilerin incelenmesinde bakterinin kendisinin yerine, doğrudan ve sadece gingipainlerin kullanıldığı, bilğimiz dahilinde literatürdeki ilk çalışmadır. Bu tür çalışmalarda nispeten yeni bir hayvan

model olan zebra balıkları, deneysel olarak obezite ve diyabet gibi hastalık modellemesine uygun olması nedeniyle, bu sahada çalışan araştırmacılara geniş olanaklar sağlayacaktır.

Zebra balıkları bakteriyel toksinlere karşı gelişen inflamatuvar yanıtın ölçülmesinde kullanılabilecek uygun bir hayvan modelidir. 2 haftalık aşırı besleme protokolünün uygulanması zebra balıklarında hiperglisemik model oluşturmak için yeterlidir.

Tek başına gingipain kullanılması gerek mRNA düzeyinde gerekse protein düzeyinde zebra balıklarında inflamatuvar yanıtta istatistiksel olarak önemli derecede artışlara sebep olmuştur. Bu sonuç periodontal hastalıklarda meydana gelen yüksek sistemik inflamasyon seviyesindeki gingipainin rolünü destekler niteliktedir.

Gingipain kullanılarak meydana getirilen sistemik inflamatuvar durum, hiperglisemi oluşturulmuş zebra balıklarında *il-1 β* mRNA ifadelerinde, hiperglisemik olmayan gruba göre çok daha şiddetli olarak kaydedildi. Bu durum hiperglisemik durumun gingipaine bağlı yaratılan inflamasyon üzerinde artırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Bunun aksine *tnf- α* ifade düzeylerinde ise hiperglisemik durum bir değişiklik yaratmadı ve gingipain enjeksiyonu ile oluşan *tnf- α* ifade düzeyindeki anlamlı artış hiperglisemik durumdaki ile benzerdi. Bu sonuç bir proinflamatuvar sitokin olarak *il-1 β* 'nin *tnf- α* 'ya göre hiperglisemik durumlarda daha doğru bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

Zebra balıklarında akut faz yanıtının değerlendirilmesinde, sadece aşırı besleme ile meydana gelen hiperglisemik durum, *crp*'ye ait mRNA seviyesinde bir artışa neden olmazken, sadece gingipain enjeksiyonu kontrole göre %50 daha yüksek ifade seviyesine sahipti. Bu iki etken birlikte oluşturulduğunda, *crp* ile ölçülen akut faz yanıtı kontrole oranla 4-5 kat fazla gerçekleşti. Bu sonuçlar hiperglisemik durumlarda akut faz yanıtının belirlenmesinde *crp* kullanımını sorgulanır hale getirmiştir.

Akut faz yanıtının YKL-40'a ait mRNA ifadesi ile değerlendirildiğinde ise sadece hiperglisemik durumda YKL-40 analoglarının ifadelerinde 2 kat artış gözlemlendi. Sadece gingipain enjeksiyonunda bu analoglardan *chia.5*'te anlamlı artış gerçekleşmişken *chia.6*'da ki artış ise anlamlı değildi. Hiperglisemik balıklardaki gingipain enjeksiyonuna karşı gelişen yanıtındaki artış ise her iki analogda yaklaşık 3 kat gerçekleşti. Bu sonuçlar hiperglisemik durumlarda akut faz yanıtının değerlendirilmesinde belki de YKL-40 proteinlerinin CRP'ye göre daha doğru bir belirteç olduğunu göstermektedir. Bu sonuç YKL-40 ile ilgili daha ileri araştırmaların önünü açacaktır.

Zebra balıklarında aşırı beslemeyle oluşturulmuş hiperglisemik durum ve gingipain enjeksiyonuna karşı meydana gelen oksidatif stres belirteçlerinin incelendiği deneyler, beklenildiği şekilde SA, LPO ve NO düzeylerinde artışa neden olmuş ve bu durum, organizmanın antioksidan sistemleri de devreye sokarak, oluşan oksidatif stresin nötralize edilmesine yönelik CAT ve SOD enzim düzeylerinde artışlar ile sonuçlanmıştır, tam tersi olacak şekilde GST miktarlarında da azalma kaydedilmesi biyokimyasal anlamda beklenen şekilde gerçekleşmiştir. Özellikle balıklar hiperglisemik durumdayken gingipaine maruz kaldıklarında SA, LPO ve NO seviyeleriyle ölçülen oksidatif stres seviyesi anlamlı derecede kat be kat artmıştır. Bu da kontrol altında olmayan diyabetik hastalarda periodontitis durumunda artmış sistemik ve lokal periodontal yanıt bulgularıyla paraleldir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada zebra balıklarında tek başına hiperglisemik durum ALP aktivitesinde 3 kat artışa neden olurken tek başına gingipain uyarımı ile meydana gelen ALP aktivitesindeki artış 4 kata yaklaşmıştır. Hiperglisemik durumda yapılan gingipain enjeksiyonu ise bu artışı 5 katına yaklaştırmıştır. Bu veriler, balıklardaki hiperglisemik durumun gingipain kaynaklı oluşan inflamatuvar durumun daha şiddetli gerçekleşmesine neden olduğunu göstermekte olup, kontrolsüz diyabete sahip periodontitis hastalarında meydana gelen hızlı doku yıkımının nedenlerinden birinin de artmış ALP aktivitesi olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Tek başına hiperglisemik durum AChE seviyesinde anlamlı bir artışa neden olmazken sadece gingipaine maruziyet AChE seviyesinde 2 kata yakın artışa neden olmuş, bu artış hiperglisemik balıklarda 3 kata yaklaşmıştır. Bu sonuçlar, hiperglisemik durumda meydana gelen gingipain maruziyetinde, organizmanın nörolojik olarak inflamatuvar yanıt üzerindeki kontrol edici rolünün azaldığı yönündedir. Bu sonuç, hiperglisemik durumun organizmanın inflamasyon kontrolünü zayıflattığı ve düşük dereceli kronik inflamatuvar sürece yatkınlık gösterdiği düşüncesiyle uyumludur.

Sonuç olarak, hiperglisemik durumlarla ilgili sistemik hastalıklarla periodontal hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırılmasında zebra balıklarının hayvan modeli olarak kullanılması ve periodontal hastalıklarda oluşan bakteriyel endotoksin kökenli inflamasyonun modellenmesinde bilginiz dahilinde literatürde ilk defa gingipainlerin kullanılabilmesi, bu konulardaki aydınlatılamamış birçok nokta üzerinde daha detaylı araştırmalara yön verecektir. İnaniyoruz ki bakteriyel endotoksin olarak gingipainin kullanıldığı bu yöntem, periodontal hastalıklarda rolü olduğu düşünülen diğer faktörlerin de araştırılmasına olanak sağlayarak, artık inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanan periodontal hastalıkların, sistemik inflamatuvar hastalıklarla

ilişkilendirilmesindeki mekanizmaların araştırılmasında ve patogenezinin daha kolay ve detaylı incelenmesinde rehber olacaktır.



8. KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1974). Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2(1), 673-684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Aemaimanan, P., Amimanan, P., & Taweechaisupapong, S. (2013). Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe*, 22(1), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.010>
- Ainamo, J., Lahtinen, A., & Uitto, V. J. (1990). Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes. A report of 2 cases. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(1), 22–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1990.tb01042.x>
- Aleksijević, L. H., Aleksijević, M., Škrlec, I., Šram, M., Šram, M., & Talapko, J. (2022). *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and clinical significance in periodontal disease and coronary artery diseases. *Pathogens*, 11(10), 1173. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101173>
- Afacan, B., Öztürk, V. Ö., Paşalı, Ç., Bozkurt, E., Köse, T., & Emingil, G. (2019). Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α levels in periodontal health and disease. *Journal of Periodontology*, 90(7), 788-797. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0412>
- Akalın, F. A., Baltacıoğlu, E., Alver, A., & Karabulut, E. (2007). Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(7), 558-565. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01091.x>
- Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., & Khan, M. Z. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 587-591. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>
- Alić, B., Gurbeta, L., & Badnjević, A. (2017). Machine learning techniques for classification of diabetes and cardiovascular diseases. *6th mediterranean conference on embedded computing*, 1-4, <https://doi.org/10.1109/MECO.2017.7977152>.
- Amano, A. (2010). Host–parasite interactions in periodontitis: Microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontology 2000*, 54(1), 9-14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00376.x>
- Amarnath, K., & Nellore, J. (2011). Antioxidant potential of phytonanoparticles in an emerging biofluid (saliva) of periodontitis patients. *International conference on nanoscience, engineering and technology*, 401-407. <https://doi.org/1109/ICONSET.2011.6167989>.
- Aoyama, N., Suzuki, J.-i., Kobayashi, N., Hanatani, T., Ashigaki, N., Yoshida, A., Shiheido, Y., Sato, H., Izumi, Y., & Isobe, M. (2018). Increased oral *Porphyromonas gingivalis* prevalence in cardiovascular patients with uncontrolled diabetes mellitus. *International Heart Journal*, 59(4), 802-807. <https://doi.org/10.1536/ihj.17-480>
- Apatzidou, D. A., Iskas, A., Konstantinidis, A., Alghamdi, A. M., Tumelty, M., Lappin, D. F., & Nile, C. J. (2018). Clinical associations between acetylcholine levels and cholinesterase activity in saliva and gingival crevicular fluid and periodontal diseases.

- American Diabetes Association. (2017). 8. Pharmacologic approaches to glycemic treatment. *Diabetes Care*, 40(1), 64-74. <https://doi.org/10.2337/dc17-S011>
- Bachtiar, B. M., Bachtiar, E. W., Kusumaningrum, A., Sunarto, H., Soeroso, Y., Sulijaya, B., Apriyanti, E., Theodorea, C. F., Pratomo, I. P., & Efendi, D. (2022). *Porphyromonas gingivalis* association with inflammatory markers and exosomal miRNA-155 in saliva of periodontitis patients with and without diabetes diagnosed with COVID-19. *The Saudi Dental Journal*, 35(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2022.12.002>
- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G., Isamitt, Y., Pino, P., & Gamonal, J. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science*, 28, e20190248. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-024828>
- Bahar, B., Kanagasingam, S., Tambuwala, M. M., Aljabali, A. A., Dillon, S. A., Doaei, S., Welbury, R., Chukkapalli, S. S., & Singhrao, S. K. (2021). *Porphyromonas gingivalis* (W83) infection induces Alzheimer's disease-like pathophysiology in obese and diabetic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(3), 1259-1275. <https://doi.org/10.3233/JAD-210465>
- Bastos, A. S., Graves, D. T., Loureiro, A. P., Rossa Júnior, C., Abdalla, D. S., Faulin, T.doE., Olsen Câmara, N., Andrianakaja, O. M., & Orrico, S. R. (2012). Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(8), E1353–E1362. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3397>
- Bastos, A. S., Graves, D. T., Loureiro, A. P., Rossa Júnior, C., Abdalla, D. S., Faulin Tdo, E., Olsen Câmara, N., Andrianakaja, O. M., & Orrico, S. R. (2012). Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(8), E1353-E1362. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3397>
- Belser, M., Cansız, D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Dandin, E., Ak, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Bisphenol A reveals its obesogenic effects through disrupting glucose tolerance, oxidant–antioxidant balance, and modulating inflammatory cytokines and fibroblast growth factor in zebrafish. *Toxicology and Industrial Health*, 38(1), 19-28. <https://doi.org/10.1177/07482337211054372>
- Beverly, J. K., & Budoff, M. J. (2020). Atherosclerosis: Pathophysiology of insulin resistance, hyperglycemia, hyperlipidemia, and inflammation. *Journal of Diabetes*, 12(2), 102-104. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12970>
- Borges, I., Jr., Moreira, E. A., Filho, D. W., de Oliveira, T. B., Da Silva, M. B., & Fröde, T. S. (2007). Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of Inflammation*, 2007, 45794. <https://doi.org/10.1155/2007/45794>
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615-1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>

- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asadi, H., & Ojcius, D. M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical journal*, 42(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
- Bullon, P., Morillo, J., Ramirez-Tortosa, M. C., Quiles, J., Newman, H., & Battino, M. (2009). Metabolic syndrome and periodontitis: Is oxidative stress a common link? *Journal of Dental Research*, 88(6), 503-518. <https://doi.org/10.1177/0022034509337479>
- Cafiero, C., Spagnuolo, G., Marenzi, G., Martuscelli, R., Colamaio, M., & Leuci, S. (2021). Predictive periodontitis: The most promising salivary biomarkers for early diagnosis of periodontitis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), 1488. <https://doi.org/10.3390/jcm10071488>
- Canakçi, C. F., Çiçek, Y., & Canakçi, V. (2005). Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)*, 70(6), 619-628. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0161-9>
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57-80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Chapple, I. L., Genco, R., & working group 2 of the joint EFP/AAP workshop (2013). Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *Journal of Periodontology*, 84, S106–S112. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340011>
- Chapple, I. L., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., & Goldstein, M. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Journal of Periodontology*, 89, S74-S84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>
- Cheeseman, J., Kuhnle, G., Stafford, G., Gardner, R. A., Spencer, D. I., & Osborn, H. M. (2021). Sialic acid as a potential biomarker for cardiovascular disease, diabetes and cancer. *Biomarkers in Medicine*, 15(11), 911-928. <https://doi.org/10.2217/bmm-2020-0776>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chen, C., Liang, Y., Zhang, Z., Zhang, Z., & Yang, Z. (2020). Relationships between increased circulating YKL-40, IL-6 and TNF- α levels and phenotypes and disease activity of primary Sjögren's syndrome. *International Immunopharmacology*, 88, 106878. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106878>
- Cutando, A., Montero, J., Gómez-de Diego, R., Ferrera, M.-J., & Lopez-Valverde, A. (2015). Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(5), e628. <https://doi.org/10.4317/jced.52604>

- Çakır, E., Çakal, E., Özbek, M., Şahin, M., & Delibaşı, T. (2013). Polycystic ovary syndrome and the relationship of cardiovascular disease risk. *Turkish Journal of Endocrinology & Metabolism*, 17(2), 33-37. <https://doi.org/10.4274/tjem.2071>
- D'aiuto, F., Nibali, L., Parkar, M., Patel, K., Suvan, J., & Donos, N. (2010). Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1241-1246. <https://doi.org/10.1177/0022034510375830>
- Damodar, S., & Mehta, D. S. (2018). Effect of scaling and root planing on gingival crevicular fluid level of YKL-40 acute phase protein in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes mellitus: A clinico-biochemical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(1), 40-44. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_95_17
- Dandin, E., Üstündağ, Ü. V., Ünal, İ., Ateş-Kalkan, P. S., Cansız, D., Beler, M., Ak, E., Alturfan, A. A., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Stevioside ameliorates hyperglycemia and glucose intolerance, in a diet-induced obese zebrafish model, through epigenetic, oxidative stress and inflammatory regulation. *Obesity Research & Clinical Practice*, 16(1), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2022.01.002>
- Darveau, R. P., Pham, T.-T. T., Lemley, K., Reife, R. A., Bainbridge, B. W., Coats, S. R., Howald, W. N., Way, S. S., & Hajjar, A. M. (2004). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*, 72(9), 5041-5051. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5041-5051.2004>
- Das, U. N. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 13(12), RA214-221.
- De, A., Puttannavar, R., Rahman, F., Adak, A., Sahoo, R., & Prakash, B. S. R. (2018). Estimation of salivary and serum alkaline phosphatase level as a diagnostic marker in type-2 diabetes mellitus with periodontal health and disease: A clinico-biochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(3), 445. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_212_18
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>
- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 122-128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Dias, I. H., Marshall, L., Lambert, P. A., Chapple, I. L., Matthews, J. B., & Griffiths, H. R. (2008). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase the chemotactic and respiratory burst-priming properties of the 77-amino-acid interleukin-8 variant. *Infection and Immunity*, 76(1), 317-323. <https://doi.org/10.1128/IAI.00618-07>
- Dinçer, Y., Alademir, Z., İlkova, H., & Akçay, T. (2002). Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: Effect of glycemic control. *Clinical Biochemistry*, 35(4), 297-301. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00317-x](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00317-x)

- Dixon, D., & Darveau, R. (2005). Lipopolysaccharide heterogeneity: Innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *Journal of Dental Research*, 84(7), 584-595. <https://doi.org/10.1177/154405910508400702>
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., & Griffin, C. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1), eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>
- Dong, Z., Lv, W., Zhang, C., & Chen, S. (2022). Correlation analysis of gut microbiota and serum metabolome with *Porphyromonas gingivalis*-induced metabolic disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(1), 858902. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.858902>
- Ebersole, J. L., & Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology 2000*, 23(1), 19-49. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2230103.x>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Engelbreton, S., Chertog, R., Nichols, A., Hey-Hadavi, J., Celenti, R., & Grbic, J. (2007). Plasma levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(1), 18-24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01017.x>
- Engelbreton, S. P., Hey-Hadavi, J., Ehrhardt, F. J., Hsu, D., Celenti, R. S., Grbic, J. T., & Lamster, I. B. (2004). Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of Periodontology*, 75(9), 1203–1208. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.9.1203>
- Fabrini, R., Bocedi, A., Camerini, S., Fusetti, M., Ottaviani, F., Passali, F. M., Topazio, D., Iavarone, F., Francia, I., Castagnola, M., & Ricci, G. (2014). Inactivation of human salivary glutathione transferase P1-1 by hypothiocyanite: A post-translational control system in search of a role. *Public Library of Science One*, 9(11), e112797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112797>
- Faillaci, F., Milosa, F., Critelli, R. M., Turola, E., Schepis, F., & Villa, E. (2018). Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(4), 255-265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ame2.12042>
- Farrugia, C., Stafford, G. P., Potempa, J., Wilkinson, R. N., Chen, Y., Murdoch, C., & Widziolek, M. (2021). Mechanisms of vascular damage by systemic dissemination of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 288(5), 1479-1495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.15486>

- Fitzpatrick, R. E., Wijeyewickrema, L. C., & Pike, R. N. (2009). The gingipains: Scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future microbiology*, 4(4), 471-487. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.18>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*, 93(1), 137-188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Ford, E. S. (1999). Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among US adults. *Diabetes care*, 22(12), 1971-1977. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.12.1971>
- Fowler, E. B., Breault, L. G., & Cuenin, M. F. (2001). Periodontal disease and its association with systemic disease. *Military Medicine*, 166(1), 85-89. <https://doi.org/10.1093/milmed/166.1.85>
- Friedewald, V. E., Kornman, K. S., Beck, J. D., Genco, R., Goldfine, A., Libby, P., Offenbacher, S., Ridker, P. M., Van Dyke, T. E., Roberts, W. C (2009). The american journal of cardiology & journal of periodontology editors' consensus: Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, 80(7), 1021–1032. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.09700>
- Gavin, J. R., Alberti, K. G. M. M., Davidson, M. B., DeFronzo, R. A., Drash, A., Gabbe, S. G., Genuth, S., Harris, M. I., Kahn, R., Keen, H., Knowler, W. C., Lebovitz, H., Maclaren, N. K., Palmer, J. P., Raskin, P., Rizza, R. A., & Stern, M. P. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26(1), S5-S20. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.2007.s5>
- Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F., & Murayama, Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology*, 76(11S), 2075-2084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2075>
- Gibson III, F. C., & Genco, C. A. (2001). Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. *Infection and Immunity*, 69(12), 7959-7963. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7959-7963.2001>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391-401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Graves, D. T., Ding, Z., & Yang, Y. (2020). The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 82(1), 214-224. <https://doi.org/10.1111/prd.12318>
- Graves, D. T., Kang, Y. M., & Kose, K. N. (1994). Growth factors in periodontal regeneration. *The Compendium of Continuing Education in Dentistry*, (18), S672–S717.
- Grossi, S. G., & Genco, R. J. (1998). Periodontal disease and diabetes mellitus: A two-way relationship. *Annals of Periodontology*, 3(1), 51-61. <https://doi.org/10.1902/annals.1998.3.1.51>
- Guo, Y., Nguyen, K.-A., & Potempa, J. (2010). Dichotomy of gingipains action as virulence factors: From cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontology 2000*, 54(1), 15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00377.x>

- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hakala, B. E., White, C., & Recklies, A. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 268(34), 25803-25810. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74461-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74461-5)
- Haraszthy, V., Zambon, J., Trevisan, M., Zeid, M., & Genco, R. (2000). Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *Journal of periodontology*, 71(10), 1554-1560. doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1554.
- Heckler, K., & Kroll, J. (2017). Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 2002. <https://doi.org/10.3390/ijms18092002>
- Hegde, R., & Awan, K. (2019). Effects of periodontal disease on systemic health. *Disease-a-Month*, 65(6), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.09.011>
- Herath, T. D., Wang, Y., Seneviratne, C. J., Lu, Q., Darveau, R. P., Wang, C. Y., & Jin, L. (2011). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(8), 694-701. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01741>
- Houle, M. A., Grenier, D., Plamondon, P., & Nakayama, K. (2003). The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Letters*, 221(2), 181-185. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00178-2)
- How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hung, S.-L., Lee, N.-G., Chang, L.-Y., Chen, Y.-T., & Lai, Y.-L. (2014). Stimulatory effects of glucose and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the secretion of inflammatory mediators from human macrophages. *Journal of Periodontology*, 85(1), 140-149. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130009>
- Iova, G. M., Calniceanu, H., Popa, A., Szuhaneck, C. A., Marcu, O., Ciavoi, G., & Scrobota, I. (2021). The antioxidant effect of curcumin and rutin on oxidative stress biomarkers in

experimentally induced periodontitis in hyperglycemic wistar rats. *Molecules*, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051332>

- Ishikawa, M., Yoshida, K., Okamura, H., Ochiai, K., Takamura, H., Fujiwara, N., & Ozaki, K. (2013). Oral *Porphyromonas gingivalis* translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(12), 2035–2043. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.012>
- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
- Jiang, Z. L., Cui, Y. Q., Gao, R., Li, Y., Fu, Z. C., Zhang, B., & Guan, C. C. (2013). Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Disease Markers*, 34(5), 295-304. <https://doi.org/10.3233/dma-130974>
- Karaman, G. E., Emekli-Alturfan, E., & Akyüz, S. (2020). Zebrafish; an emerging model organism for studying toxicity and biocompatibility of dental materials. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 66(8), 41-46. <https://doi.org/10.14715/cmb/2020.66.8.7>
- Katz, J., Ward, D., & Michalek, S. (1996). Effect of host responses on the pathogenicity of strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(5), 309-318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1996.tb00187.x>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Kazakova, M. H., Batalov, A. Z., Mateva, N. G., Kolarov, Z. G., & Sarafian, V. S. (2017). YKL-40 and cytokines - a new diagnostic constellation in rheumatoid arthritis? *Folia Medica*, 59(1), 37-42. <https://doi.org/10.1515/folmed-2017-0013>
- Keles Yucel, Z. P., Afacan, B., Emingil, G., Tervahartiala, T., Kose, T., & Sorsa, T. (2020). Local and systemic levels of a MMP-8 in gingivitis and stage 3 grade C periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 55(6), 887-894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jre.12781>
- Keles Yucel, Z. P., Keles, G. C., Avci, B., & Cetinkaya, B. O. (2020). Nonsurgical periodontal therapy reduces salivary and gingival crevicular fluid YKL-40 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *Oral Health and Preventive Dentistry*, 18(1), 815-822. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a45086>
- Keles, Z. P., Keles, G. C., Avci, B., Cetinkaya, B. O., & Emingil, G. (2014). Analysis of YKL-40 acute-phase protein and interleukin-6 levels in periodontal disease *Journal of Periodontology*, 85(9), 1240-1246. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130631>
- Khader, Y. S., Dauod, A. S., El-Qaderi, S. S., Alkafajei, A., & Batayha, W. Q. (2006). Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: A meta-analysis. *Journal of Diabetic Complications*, 20(1), 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2005.05.006>

- Khansari, N., Shakiba, Y., & Mahmoudi, M. (2009). Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 3(1), 73-80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>
- Khattak, S., Khattak, A. M., Kamal, A., Jaffari, S., & Sher, A. (2009). Serum alkaline phosphatase level in type-2 diabetes mellitus and its relation with periodontitis. *Khyber Medical University Journal*, 1(2), 51-54.
- Khumaedi, A. I., Purnamasari, D., Wijaya, I. P., & Soeroso, Y. (2019). The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(2), 1675-1678. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.03.023>
- Kido, J., Bando, Y., Bando, M., Kajiura, Y., Hiroshima, Y., Inagaki, Y., Murata, H., Ikuta, T., Kido, R., Naruishi, K., Funaki, M., & Nagata, T. (2015). YKL-40 level in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis and type 2 diabetes. *Oral Diseases*, 21(5), 667-673. <https://doi.org/10.1111/odi.12334>
- Kim, S. C., Kim, O. S., Kim, O. J., Kim, Y. J., & Chung, H. J. (2010). Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 40(4), 164-171. <https://doi.org/10.5051/jpis.2010.40.4.164>
- Kim, S. J., Ha, M. S., Choi, E. Y., Choi, J. I., & Choi, I. S. (2004). Prevotella intermedia lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Periodontal Research*, 39(6), 424-431. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00757.x>
- Kırzioğlu, F. Y., Fentoğlu, Ö., Bulut, M. T., Doğan, B., Özdem, M., Özmen, Ö., Çarsancaklı, S. A., Ergün, A. G., & Orhan, H. (2016). Is a cholesterol-enriched diet a risk factor for alveolar bone loss? *Journal of Periodontology*, 87(5), 529-538. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150509>
- Koch, B. E., Stougaard, J., & Spaink, H. P. (2014). Spatial and temporal expression patterns of chitinase genes in developing zebrafish embryos. *Gene Expression Patterns*, 14(2), 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.01.001>
- Koch, B. E., Stougaard, J., & Spaink, H. P. (2015). Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research. *Glycobiology*, 25(5), 469-482. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv005>
- Kocher, T., König, J., Borgnakke, W. S., Pink, C., & Meisel, P. (2018). Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontology* 2000, 78(1), 59-97. <https://doi.org/10.1111/prd.12235>
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643. <https://doi.org/10.1038/35007508>
- Kornman, K. S. (2008). Mapping the pathogenesis of periodontitis: A new look. *Journal of Periodontology*, 79, 1560-1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>

- Kose, K., Gündüz, G., Beler, M., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Inflammatory gene expression in response to gingipain in zebrafish. *Journal of Clinical Sciences (Abstracts), The 26th International Congress of Turkish Dental Association, September 8-11, (Supplements), 11(3):596-597.*
- Kumar, M., Mishra, L., Mohanty, R., & Nayak, R. (2014). Diabetes and gum disease: The diabolic duo. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 8(4), 255-258. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.022>
- Kushner, I., & Mackiewicz, A. (2020). The acute phase response: An overview. *Acute Phase Proteins Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications* (pp. 3-19). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003068587>
- Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of Periodontology*, 89 (Suppl 1), S9-S16. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0517>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., & Kadziółka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *International Journal of Clinical Chemistry*, 155(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)
- Leong, X.-F., Ng, C.-Y., Badiah, B., & Das, S. (2014). Association between hypertension and periodontitis: Possible mechanisms. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/768237>
- Lepiller, S., Franche, N., Solary, E., Chluba, J., & Laurens, V. (2009). Comparative analysis of zebrafish *nos2a* and *nos2b* genes. *Gene*, 445(1-2), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.05.016>
- Levine, R. S. (2013). Obesity, diabetes and periodontitis – a triangular relationship? *British Dental Journal*, 215(1), 35-39. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.627>
- Li, B., Li, W., Li, X., & Zhou, H. (2017). Inflammation: A novel therapeutic target/direction in atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 23(8), 1216-1227. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161230142931>
- Li, N., & Collyer, C. A. (2011). Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - complex domain structures confer diverse functions. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 1(1), 41–58. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.1.2011.1.7>
- Lowry, O. (1951). Protein determination with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Löe, H. (1993). Periodontal disease: The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 16(1), 329-334. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.1.329>
- Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., & Mikolajczyk, T. P. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(6). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>
- Machado, V., Escalda, C., Proença, L., Mendes, J. J., & Botelho, J. (2020). Is there a bidirectional association between polycystic ovarian syndrome and periodontitis? a

- systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1961. <https://doi.org/10.3390/jcm9061961>
- Malhotra, R., Grover, V., Kapoor, A., & Kapur, R. (2010). Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker. *Indian Journal of Dental Research*, 21(4), 531. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74209>
- Marcelino, S. L., Gaetti-Jardim Jr, E., Nakano, V., Canônico, L. A., Nunes, F. D., Lotufo, R. F., Pustiglioni, F. E., Romito, G. A., & Avila-Campos, M. J. (2010). Presence of periodontopathic bacteria in coronary arteries from patients with chronic periodontitis. *Anaerobe*, 16(6), 629-632. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.08.007>
- Martínez-García, M., & Hernández-Lemus, E. (2021). Periodontal inflammation and systemic diseases: An overview. *Frontiers in Physiology*, 12, 709438. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.709438>
- Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X., & Chen, L. (2020). *Porphyromonas gingivalis* and its systemic impact: Current status. *Pathogens*, 9(11), 944. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110944>
- Meriç, P., Buduneli, N., Kanmaz, B., Gürlek, Ö., Çömlekoğlu, E., Calvert, G., Lappin, D. F., & Nile, C. (2019). Cholinergic signalling mechanisms and early implant healing phases in healthy versus generalized aggressive periodontitis patients: A prospective, case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(11), 1155-1163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcpe.13185>
- Miller, J. D., & Neely, M. N. (2004). Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis. *Acta Tropica*, 91(1), 53-68. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.020>
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Mirzaei, A., Shahrestanaki, E., Daneshzad, E., Heshmati, J., Djalalinia, S., Asayesh, H., Mahdavi-Gorabi, A., Heshmat, R., & Qorbani, M. (2021). Association of hyperglycaemia and periodontitis: An updated systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 20(2), 1327-1336. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00861-9>
- Mohamed, H. G., Idris, S. B., Ahmed, M. F., Åström, A. N., Mustafa, K., Ibrahim, S. O., & Mustafa, M. (2015). Influence of type 2 diabetes on local production of inflammatory molecules in adults with and without chronic periodontitis: A cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 15(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0073-z>
- Morran, M. P., Alexander, L. A., Slotterbeck, B., & McInerney, M. F. (2009). Dysfunctional innate immune responsiveness to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in diabetes. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(4), 331-339. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00522.x>
- Moshage H. (1997). Cytokines and the hepatic acute phase response. *The Journal of Pathology*, 181(3), 257–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199703\)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U)

- Mouri, M., & Badireddy, M. (2022). Hyperglycemia. *StatPearls*. StatPearls Publishing LLC.
- Myloie, A. A., Collins, H., Umbles, C., & Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(3), 512-520. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(86\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(86)90286-3)
- Nayak, B. S., Duncan, H., Lalloo, S., Maraj, K., Matmungal, V., Matthews, F., Prajapati, B., Samuel, R., & Sylvester, P. (2008). Correlation of microalbumin and sialic acid with anthropometric variables in type 2 diabetic patients with and without nephropathy. *Vascular health and Risk Management*, 4(1), 243-247. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2008.04.01.243>
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2011). *Carranza's clinical periodontology*. (12th edition). Elsevier health sciences.
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & de Bittencourt Jr, P. I. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24), 4527-4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- Nielsen, A. R., Erikstrup, C., Johansen, J. S., Fischer, C. P., Plomgaard, P., Krogh-Madsen, R., Taudorf, S., Lindegaard, B., & Pedersen, B. K. (2008). Plasma YKL-40: A BMI-independent marker of type 2 diabetes. *Diabetes*, 57(11), 3078-3082. <https://doi.org/10.2337/db08-0182>
- Nielsen, A. R., Plomgaard, P., Krabbe, K. S., Johansen, J. S., & Pedersen, B. K. (2011). IL-6, but not TNF- α , increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine*, 55(1), 152-155. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.014>
- Offenbacher, S. (1996). Periodontal diseases: Pathogenesis. *Annals of Periodontology*, 1(1), 821-878. <https://doi.org/10.1902/annals.1996.1.1.821>
- Ohlrich, E., Cullinan, M., & Seymour, G. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54(1), S2-S10. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01139.x>
- Oktay, S., Bal, Ö. Ö., Kuru, L., Yarat, A., & Noyan, Ü. (2020). Is sialic acid a promising marker for periodontal diseases? *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 23(5), 603-609. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_499_19
- Oktay, S., Chukkapalli, S. S., Rivera-Kweh, M. F., Velsko, I. M., Holliday, L. S., & Kesavalu, L. (2015). Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives. *Journal of Periodontology*, 86(1), 137-145. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.140302>
- Oktay, S., Ozoner, O., Alturfan, E. E., & Noyan, U. (2019). Determination of oxidative stress parameters and tissue factor activity in the saliva of patients with periodontitis. *European Journal of Biology*, 78(2), 63-68. <https://doi.org/10.26650/EurJBiol.2019.0002>
- Olsen, I., Lambris, J. D., & Hajishengallis, G. (2017). *Porphyromonas gingivalis* disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1), 1340085. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1340085>

- Ozcebebi, H., Ari, F., & Dere, E. (2021). Glutathione S-Transferase activity in tissues of rats exposed to fenarimol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200751>
- Özcan, E., Özdemir, A., & Çanakçı, C. F. (2011). Periodontal doku yıkımında reaktif oksijen türlerinin rolü. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011(3), 255-261.
- Page, R. C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 26(1), 230-242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb01649.x>
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontology 2000*, 14(1), 9-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Pamuk, F., & Kantarci, A. (2022). Inflammation as a link between periodontal disease and obesity. *Periodontology 2000*, 90(1), 186-196. <https://doi.org/10.1111/prd.12457>
- Panjamurthy, K., Manoharan, S., & Ramachandran, C. R. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10(2), 255-264.
- Paraskevas, S., Huizinga, J. D., & Loos, B. G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(4), 277-290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x>
- Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2006). Controlling inflammation: The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), 1037–1040. <https://doi.org/10.1042/BST0341037>
- Pereira, K. K. Y., Jara, C. M., Antunes, G. L., Gomes, M. S., Rösing, C. K., Cavagni, J., & Haas, A. N. (2022). Effects of periodontitis and periodontal treatment on systemic inflammatory markers and metabolic profile in obese and non-obese rats. *Journal of Periodontology*, 93(9), 1411-1420. <https://doi.org/10.1002/jper.21-0575>
- Pereira, S. S., & Alvarez-Leite, J. I. (2014). Low-grade inflammation, obesity, and diabetes. *Current Obesity Reports*, 3(4), 422-431. <https://doi.org/10.1007/s13679-014-0124-9>
- Petersen, P. E., & Baehni, P. C. (2012). Periodontal health and global public health. *Periodontology 2000*, 60(1), 7-14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00452.x>
- Pfützner, A., & Forst, T. (2006). High-sensitivity C-reactive protein as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 8(1), 28-36. <https://doi.org/10.1089/dia.2006.8.28>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(9499), 1809-1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Polak, D., & Shapira, L. (2018). An update on the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2), 150-166. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12803>

- Polepalle, T., Moogala, S., Boggarapu, S., Pesala, D. S., & Palagi, F. B. (2015). Acute phase proteins and their role in periodontitis: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic research*, 9(11), ZE01–ZE5. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/15692.6728>
- Pop-Busui, R., Ang, L., Holmes, C., Gallagher, K., & Feldman, E. L. (2016). Inflammation as a therapeutic target for diabetic neuropathies. *Current Diabetes Reports*, 16(3), 29. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0727-5>
- Prajna, K., Kumar, A., Rai, S., Shetty, S. K., Rai, T., Begum, M., & Shashikala, M. (2013). Predictive value of serum sialic acid in type-2 diabetes mellitus and its complication (nephropathy). *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(11), 2435-2437. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6210.3567>
- Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2019). Periodontitis and diabetes. *British Dental Journal*, 227(7), 577-584. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0794-5>
- Preshaw, P. M., Taylor, J. J., Jaedicke, K. M., De Jager, M., Bikker, J. W., Selten, W., Bissett, S. M., Whall, K. M., van de Merwe, R., Areibi, A., Jitprasertwong, P., Al-Shahwani, R., Weaver, J., Taylor, R., & Wassall, R. R. (2020). Treatment of periodontitis reduces systemic inflammation in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(6), 737–746. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13274>
- Rathcke, C. N., Johansen, J. S., & Vestergaard, H. (2006). YKL-40, a biomarker of inflammation, is elevated in patients with type 2 diabetes and is related to insulin resistance. *Inflammation Research*, 55(2), 53-59. <https://doi.org/10.1007/s00011-005-0010-8>
- Rathcke, C. N., & Vestergaard, H. (2009). YKL-40-an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, 8(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-61>
- Sanz, M., Marco del Castillo, A., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D’Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., & Graziani, F. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(3), 268-288. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13189>
- Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A. P., Koch, M. H., Rietschel, E. T., & Seydel, U. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *European Journal of Biochemistry*, 267(7), 2008-2013. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01204.x>
- Seo, Y.-H., & Shin, H.-Y. (2021). Relationship between hs-CRP and HbA1c in diabetes mellitus patients: 2015–2017 korean national health and nutrition examination survey. *Chonnam Medical Journal*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.4068/cmj.2021.57.1.62>
- Seyama, M., Yoshida, K., Yoshida, K., Fujiwara, N., Ono, K., Eguchi, T., Kawai, H., Guo, J., Weng, Y., Haoze, Y., Uchibe, K., Ikegame, M., Sasaki, A., Nagatsuka, H., Okamoto, K., Okamura, H., & Ozaki, K. (2020). Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165731. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165731>

- Shahvali, S., Shahesmaeili, A., Sanjari, M., & Karami-Mohajeri, S. (2020). The correlation between blood oxidative stress and sialic acid content in diabetic patients with nephropathy, hypertension, and hyperlipidemia. *Diabetology International*, 11(1), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s13340-019-00395-9>
- Shetty, N., Thomas, B., & Ramesh, A. (2008). Comparison of neutrophil functions in diabetic and healthy subjects with chronic generalized periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 12(2), 41–44. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.44089>
- Simon, K., & Wittmann, I. (2019). Can blood glucose value really be referred to as a metabolic parameter? *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20, 151-160. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09504-0>
- Skaleric, U., Gaspirc, B., McCartney-Francis, N., Masera, A., & Wahl, S. M. (2006). Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease. *Infection and Immunity*, 74(12), 7010-7013. <https://doi.org/10.1128/IAI.00071-06>
- Socransky, S., Haffajee, A., Cugini, M., Smith, C., & Kent Jr, R. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Stafford, G., Roy, S., Honma, K., & Sharma, A. (2012). Sialic acid, periodontal pathogens and *Tannerella forsythia*: Stick around and enjoy the feast! *Molecular Oral Microbiology*, 27(1), 11-22. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00630.x>
- Stewart, A., Cachat, J. M., Suci, C., Hart, P. C., Gaikwad, S., Utterback, E., DiLeo, J., & Kalueff, A. V. (2011). Intraperitoneal injection as a method of psychotropic drug delivery in adult zebrafish. *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*, 169-179. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-953-6_14
- Stockhammer, O. W., Zakrzewska, A., Hegedüs, Z., Spaink, H. P., & Meijer, A. H. (2009). Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to Salmonella infection. *The Journal of Immunology*, 182(9), 5641-5653. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900082>
- Stream, A., & Madigan, C. A. (2022). Zebrafish: An underutilized tool for discovery in host–microbe interactions. *Trends in Immunology*, 43(6), 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.03.011>
- Sullivan, C., Matty, M., Jurczyszak, D., Gabor, K., Millard, P., Tobin, D., & Kim, C. (2017). Infectious disease models in zebrafish. *Methods in Cell Biology*, 138, 101-136. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.10.005>
- Taylor, J. J., Preshaw, P. M., & Lalla, E. (2013). A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(Suppl 14), S113–S134. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12059>
- Teeuw, W. J., Gerdes, V. E., & Loos, B. G. (2010). Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(2), 421-427. <https://doi.org/10.2337/dc09-1378>

- Thomas, B., Rao, A., Prasad, B. R., & Kumari, S. (2014). Serum levels of antioxidants and superoxide dismutase in periodontitis patients with diabetes type 2. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(4), 451-455. <https://doi.org/10.4103/0972-124x.138686>
- Tizaoui, K., Yang, J. W., Lee, K. H., Kim, J. H., Kim, M., Yoon, S., Jung, Y., Park, J. B., An, K., & Choi, H. (2022). The role of YKL-40 in the pathogenesis of autoimmune diseases: a comprehensive review. *International Journal of Biological Sciences*, 18(9), 3731–3746. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67587>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, S159-S172. <https://doi.org/10.1002/jper.18-0006>
- Tüten, N., Koray, G., Kucur, M., Açıkgoz, A. S., Oncul, M., & Tüten, A. (2022). Gestasyonel diabetes mellituslu gebelerde serum YKL-40 düzeyi. *Sakarya Tıp Dergisi*, 12(1), 92-97. <https://doi.org/10.31832/smj.948949>
- Ünal, İ., & Emekli-Alturfan, E. (2019). Fishing for parkinson's disease: A review of the literature. *Journal of Clinical Neuroscience*, 62, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.015>
- Üstündağ, F. D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V., Cansız, D., Beler, M., Alturfan, A. A., Tiber, P. M., & Emekli-Alturfan, E. (2022). Morphine ameliorates pentylentetrazole-induced locomotor pattern in zebrafish embryos; mechanism involving regulation of opioid receptors, suppression of oxidative stress, and inflammation in epileptogenesis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 33(2), 151–160. <https://doi.org/10.1080/15376516.2022.2105182>
- Van Dyke, T. E. (2008). The management of inflammation in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 79(8S), 1601-1608. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080173>
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(8), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.002>
- Verma, S., Sagar, N., Vats, P., Shukla, K., Abbas, M., & Banerjee, M. (2013). Antioxidant enzyme levels as markers for type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Bioassays*, 2(4), 685-690. <https://doi.org/10.21746/IJBIO.2013.04.0023>
- Villegas Vilchez, L. F., Ascencios, J. H., & Dooley, T. P. (2022). GlucoMedix®, an extract of *Stevia rebaudiana* and *Uncaria tomentosa*, reduces hyperglycemia, hyperlipidemia, and hypertension in rat models without toxicity: A treatment for metabolic syndrome. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03538-9>
- Walter, K., & Schutt, C. (1974). Acid and alkaline phosphatase in serum. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2, 856-860.
- Wang, P.-L., & Ohura, K. (2002). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts—CD14 and Toll-like receptors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 132-142. <https://doi.org/10.1177/154411130201300204>

- Wang, Y., Andrukhov, O., & Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, 910. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
- Warren, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 234, 1971-1975. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69851-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69851-5)
- Widziolek, M., Prajsnar, T. K., Tazzyman, S., Stafford, G. P., Potempa, J., & Murdoch, C. (2016). Zebrafish as a new model to study effects of periodontal pathogens on cardiovascular diseases. *Scientific Reports*, 6(1), 36023. <https://doi.org/10.1038/srep36023>
- Wilensky, A., Potempa, J., Houry-Haddad, Y., & Shapira, L. (2017). Vaccination with recombinant RgpA peptide protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 52(2), 285-291. <https://doi.org/10.1111/jre.12393>
- Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 120, 45-84. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>
- Yi-June, L., Cheing-Meei, L., Man-Ying, W., Lein-Tuan, H., & Wei-Kuei, C. (1999). Interleukin 1 β -secreting cells in inflamed gingival tissue of adult periodontitis patients. *Cytokine*, 11(8), 626-633. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0448>
- Yıldırım, H. S., Katı, G. T., Ağralı, Ö. B., Noyan, Ü., Kuru, L., & Kuru, B. Hiperlipidemi ve periodontitis arasında bir ilişki var mı? *7tepe Klinik Dergisi*, 13(3), 15-24. <https://doi.org/10.5505/yeditepe.2017.91300>
- Yuan, J. S., Wang, D., & Stewart Jr, C. N. (2008). Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnology Journal*, 3(1), 112–123. <https://doi.org/10.1002/biot.200700169>
- Yuen, L., Saeedi, P., Riaz, M., Karuranga, S., Divakar, H., Levitt, N., Yang, X., & Simmons, D. (2019). Projections of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy in 2019 and beyond: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157(1), 107841. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107841>
- Zang, L., Maddison, L., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(1), 91. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>
- Zang, L., Shimada, Y., & Nishimura, N. (2017). Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>
- Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2013). A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. *Zebrafish*, 10(3), 425-432. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0862>

- Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2015). Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments* (102), e53272. <https://doi.org/10.3791/53272>
- Zenobia, C., Hasturk, H., Nguyen, D., Van Dyke, T. E., Kantarci, A., & Darveau, R. P. (2014). *Porphyromonas gingivalis* lipid A phosphatase activity is critical for colonization and increasing the commensal load in the rabbit ligature model. *Infection and immunity*, 82(2), 650-659. <https://doi.org/10.1128/IAI.01136-13>
- Zhang, Z., Liu, D., Liu, S., Zhang, S., & Pan, Y. (2021). The role of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles in periodontal disease and related systemic diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 585917. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.585917>