

Deneysel Periodontitiste Çoklu Probiyotik Desteğinin Serum Tümör Nekroz Faktör Alfa Seviyelerine Etkisi

The Effect of Multi Probiotic Supplementation on Serum Tumor Necrosis Factor Alpha Levels in Experimental Periodontitis

Burak Doğan¹, Esra Sinem Kemer Doğan¹

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye
Alınış / Received: 18.05.2020 Kabul / Accepted: 23.11.2020 Online Yayınlanma / Published Online: 31.12.2020

Özet

Amaç: Probiyotikler sağlığa yararlı mikroorganizmalar olup immün sistemi ve patojenik florayı etkileyerek periodontal hastalık patogenezinde yer almaktadır. Probiyotik desteğinin klinik periodontal parametreleri iyileştirdiği ve deneysel çalışmalarda alveoler kemik kaybını (AKK) azaltabileceği gösterilmiştir. Tümör nekroz faktör alfa (TNF α) periodontal sert ve yumuşak doku yıkımdan sorumlu anahtar sitokinlerden birisidir. Bu çalışmanın amacı *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* suşlarını içeren çoklu probiyotik desteğinin AKK ve serum TNF α seviyelerine olan etkilerini incelemektir. **Materyal-Metot:** Yirmi dört adet 6-8 haftalık yetişkin Wistar albino rat eşit sayıda (n=8) kontrol (K), ligatürle indüklenen periodontitis (Lig) ve ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği (VSL) gruplarına ayrılmıştır. Bütün ratlar 44 gün süresince standart yem ve su içeren diyetle beslenmiş, VSL grubundaki ratlara ayrıca oral gavajla 1 ml serum içerisinde çoklu probiyotik desteği uygulanmıştır. Deney bitiminden 2 hafta önce Lig ve VSL grubundaki ratların maksillar 2. molar dişlerine ligatür kullanılarak periodontitis indüklenmiştir. AKK histomorfometrik olarak ölçülmüş, serum TNF α seviyeleri ELISA ile incelenmiştir. **Bulgular:** AKK, K grubuna göre ligatürle periodontitis indüklenen gruplarda (Lig ve VSL) artmış, VSL grubunda Lig grubuna kıyasla azalmıştır (p<0,05). Serum TNF α seviyeleri, Lig grubunda K grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yükselmiş, VSL grubunda ise Lig grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05). **Sonuç:** Deneysel periodontitis modelinde çoklu probiyotik desteğinin serum TNF α seviyelerini azaltarak periodontal kemik yıkımını engelleyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Probiyotikler, Deneysel Periodontitis, Tümör Nekroz Faktör Alfa

Abstract

Objective: Probiotics, which are beneficial microorganisms on health, take part in periodontal disease pathogenesis by affecting immune system and pathogenic flora. Probiotic supplementation was shown to improve clinical periodontal parameters and decrease alveolar bone loss (ABL) in experimental studies. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is one of the key cytokines responsible for destruction of periodontal soft and hard tissues. The aim of this study was to evaluate the effects of multi probiotic supplementation containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus* species on ABL and serum TNF α levels. **Material-Method:** Twenty-four 6-8 weeks adult Wistar albino rat were separated equally (n=8) into control (C), ligature-induced periodontitis (Lig), and probiotic administration additionally to ligature-induced periodontitis (VSL). All rats were fed with standard water and diet for 44 days; additionally multi probiotics were supplemented to the rats in VSL group via oral gavage in 1 ml saline. Periodontitis was induced using ligature to the maxillary 2nd molars of the rats in Lig and VSL groups 2 weeks before the end of the study. ABL was measured histomorphometrically and serum TNF α levels were analysed with ELISA. **Results:** ABL increased in the ligature-induced periodontitis groups (Lig and VSL), compared to C group, and decreased in VSL group, in comparison with the Lig group (p<0.05). Serum TNF α levels were significantly higher in Lig group than C group, and significantly lower in VSL group than Lig group (p<0.05). **Conclusions:** We suggest that multi probiotic supplementation could inhibit periodontal bone destruction by decreasing serum TNF α levels in an experimental periodontitis model.

Keywords: Probiotics, Experimental Periodontitis, Tumor Necrosis Factor Alpha

Giriş

Periodontal hastalıklar, mikrobiyal faktörlere karşı periodontal dokuları korumak ve iyileştirmek için konağın verdiği inflamatuvar cevap sonucunda ortaya çıkmaktadır. Oral patojenlere karşı aşırı immün cevap gösteren bireylerde periodontal doku yıkımının olduğu bilinmektedir (1). Periodontal hastalık tedavisinde detertraj ve kök yüzeyi düzleştirmesini (SRP) içeren konvansiyonel yaklaşımlar altın standart olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan bazı bireylerde tek başına mekanik periodontal tedaviye cevap alınmadığı, dolayısıyla ek olarak antimikrobiyal ya da konak modülasyon tedavilerinin kullanılabileceği önerilmiştir (2).

Probiyotikler, yeterli miktarda alındıklarında konak sağlığına yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır (3). İnsan gastrointestinal sisteminde yaklaşık 400 bakteri türü bulunmaktadır. Probiyotiklerin büyük çoğunluğunu laktik asit bakterileri (*Streptococcus*, *Lactobacilli*) oluşturmakla birlikte *Bifidobacterium*, bazı patojenik olmayan *Escherichia coli* suşları ve *Saccharomyces boulardii* gibi mantarlar da probiyotik olarak yer almaktadır (4). Probiyotiklerin bakteriyel çevreyi ve konak yanıtını düzenleyebileceği, antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra birçok hücre üzerinden farklı yollarla aracılığıyla immün sistemi antiinflamatuvar yönde harekete geçirdiği ifade edilmektedir (5).

Tümör nekroz faktör alfa ($TNF\alpha$) proinflamatuvar bir sitokin olup bağ doku ve kemik rezorpsiyonundan sorumlu sekonder inflamatuvar medyatörlerin sentezlenmesinde rol almaktadır (6). Proinflamatuvar özelliğinin yanı sıra, adipoz dokuda adiponektin sentezini değiştirerek (7) inflamatuvar çözülmenin baskılanmasına dolaylı olarak katkı sağlayabileceği öne sürülebilir (8). $TNF\alpha$ 'nın periodontal hastalıkların tespitinde umut verici bir belirteç olduğu belirtilmektedir (9). Periodontitisli bireylerde (10) ve periodontitis indüklenen ratlarda (11) serum $TNF\alpha$ seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gösterilmiştir.

Probiyotik desteğinin konak yanıtını düzenleyerek ve zararlı patojenleri elimine ederek periodontal sağlığa katkı sağlayabileceği ifade edilmiştir (12). Nitekim periodontal tedavide *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) (13) ve *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) (14,15) uygulamalarının periodontal parametreleri iyileştirdiği, *Bacillus subtilis* (16,17), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (18), *L. brevis* (19) ve *Bifidobacterium lactis*'in (20) alveoler kemik kaybını (AKK) azalttığı (16-20) rapor edilmiştir. Ayrıca *S. cerevisiae* (18), *L. brevis* (19) ve *L. reuteri*'nin (21,22) $TNF\alpha$ seviyelerini düşürebileceği de gösterilmiştir.

Literatürde periodontal hastalık patogenezinde genellikle tek tür probiyotik bakterinin etkilerinin incelendiği görülmektedir. Çalışma hipotezimiz, çoklu probiyotik desteğinin sinerjistik etkiyle, ratlarda ligatürle indüklenen periodontitis modelinde AKK seviyelerine daha fazla etki edebileceği üzerine oluşturulmuştur. Bu çalışmanın amacı, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* suşlarını içeren çoklu probiyotik desteğinin AKK üzerine etkilerini incelemek ve serum $TNF\alpha$ seviyelerinin bu ilişkiadaki rolünü ortaya koymaktır.

Materyal-Metot

Çalışmamız için Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05.05.2018 ve 13/06 karar numarasıyla etik onay alınmıştır. Çalışmamızda 24 adet 6-8 haftalık yetişkin Wistar albino rat ($248,17\pm 18,63$ g) (Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Ratlar 7 günlük uyum sürecinin ardından Euro tip IV kafesler içerisinde, 21-23 °C sabit ortam ısı ve %55-60 nem içeren odalarda, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortam sağlanacak şekilde 44 gün süresince tutulmuştur. Ratlar eşit sayıda (n=8) kontrol (K), ligatürle indüklenen periodontitis (Lig) ve ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği (VSL) gruplarına ayrılmıştır. Bütün ratlar deney süresince standart yem ve su içeren ad libitum diyetle beslenmiş, VSL grubundaki ratlara ayrıca oral gavajla probiyotik uygulanmıştır. Deneysel periodontitis indüklenmesi ve 44. gün sakrifikasyon işlemleri için 90 mg/kg ketamin hidroklorid ve 10 mg/kg ksilazin kombinasyonu kullanılmıştır (23).

Periodontitis oluşturulması

Deneyel periodontitis 30. günde 2 hafta süresince (16), sağ ve sol maksillar 2. molar dişlerin dişeti kenarına steril 3.0 ipek sütür yerleştirilerek indüklenmiştir (24). Ligatürler haftalık kontrol edilmiştir ve çıkanlar yeniden yerleştirilmiştir.

Probiyotik uygulaması

VSL grubundaki ratlara 44 gün süresince ad libitum diyete ek olarak Lactobacillus (L. casei, L. plantarum, L. acidophilus ve L. delbrueckii subsp. bulgaricus), Bifidobacterium (B. longum, B. breve ve B. infantis) ve Streptococcus salivarius subsp. thermophilus bakterilerini içeren probiyotik (VSL#3, VSL Pharmaceuticals, Gaithersburg, Maryland, ABD), 13 milyar/kg/gün dozda (25), 1 ml serum fizyolojik içerisinde, günde 1 kere oral gavajla verilmiştir.

Alveoler kemik kaybının ölçülmesi

Formol içerisinde saklanan sağ maksilla örnekleri, 1 gün boyunca %3 hidrojen peroksit içerisinde bekletildikten sonra ve mine-sement sınırının tespiti için distile suyla yıkayıp %1 metilen mavisiyle boyanmıştır (26). Alveoler kemik ve mine-sement arasındaki mesafe stereo mikroskop (Olympus CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) kullanılarak 20X büyütmede tespit edilmiş ve yazılım programı (Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm için 2. molar dişin oklüzal yüzü yer düzlemine dik olacak şekilde yerleştirilmiş, bukkal ve lingual 3 noktadan (mesial-orta-distal), toplamda 6 noktadan kaydedilen değerlerin aritmetik ortalaması alınarak AKK saptanmıştır (27).

Serum TNF α seviyelerinin analizi

Deney sonunda bütün ratların batınları açılarak vena kava inferiordan ortalama 10 cc kan örneği separatör jel içeren tüplere alınmıştır. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen serum analiz zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır. Serum TNF α seviyeleri, sensitivitesi 2,51 ng/L olan ticari kit (Rat Tumor Necrosis Factor Alpha ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Şanghay, Çin) (Katalog no: E0764Ra) kullanılarak ELISA yöntemiyle üretici firmanın öngördüğü protokole göre ölçülmüştür.

Histopatolojik inceleme

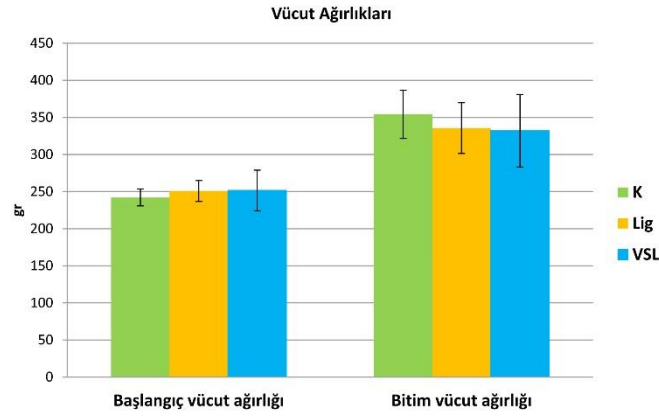
Kas ve yumuşak dokulardan uzaklaştırılan sol maksilla örnekleri %10 nötral formalinde fikse edilmiş ve 0,1 M EDTA solüsyonda 1 hafta süresince dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifiye örnekler parafin bloklara gömülerek dişin uzun aksı boyunca mesio-distal yönde 5 μ m kalınlığında örnekler elde edilmiştir (Leica RM 2155 rotary mikrotom, Leica, Wetzlar, Almanya). Kesitler hematoksilin ve eozin ile boyanmış ve mikroskopta (Olympus CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) incelenmiştir. Histopatolojik skorlama şu şekilde derecelendirilmiştir: 0: İnflamatuvar infiltrasyon yok ya da marjinal gingivada sınırlı ve seyrek inflamatuvar durum, alveoler kemik ve sement sağlam; 1: Hafif hücrel infiltrasyon, hafif alveoler kemik rezorpsiyonu, sement sağlam; 2: Dişeti ve periodontal ligamentde inflamatuvar hücrelerin görüldüğü orta düzeyde hücrel infiltrasyon; 3: Şiddetli hücrel infiltrasyon, alveoler kemikte ve sementte şiddetli yıkım.

İstatistiksel Analiz

Örnek sayısı daha önce yapılan çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir (Messora et al., 2013). Çalışmamızda power analiz programına göre (G*power, v.3.1.9.2 for Windows, University of Kiel, Kiel, Almanya) birincil değişken olan AKK için güç>%99 (effect size=2,31, α =0.05), TNF α için güç>%95 (effect size=0,91, α =0.05) olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları istatistik paket program (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) aracılığıyla değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında nonparametrik Kruskal-Wallis testi yapılmış, gruplar arası farklılığın tespiti için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel farklılık olarak belirlenmiştir.

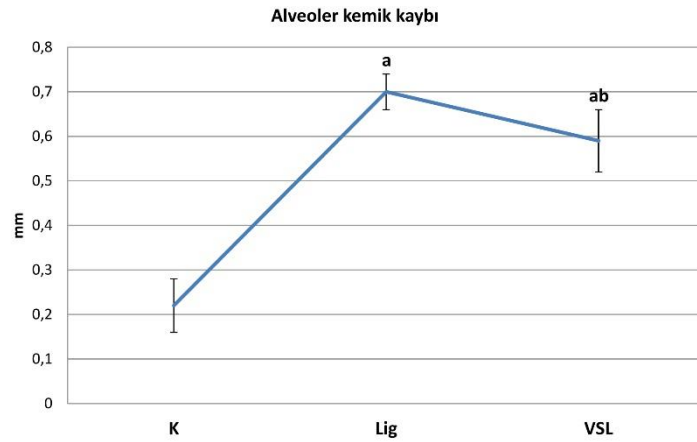
Bulgular

Çalışma 24 ratla tamamlanmıştır. Başlangıç ve çalışma sonu vücut ağırlıkları gruplar arasında benzer seviyededir ($p>0,05$) (Şekil 1).

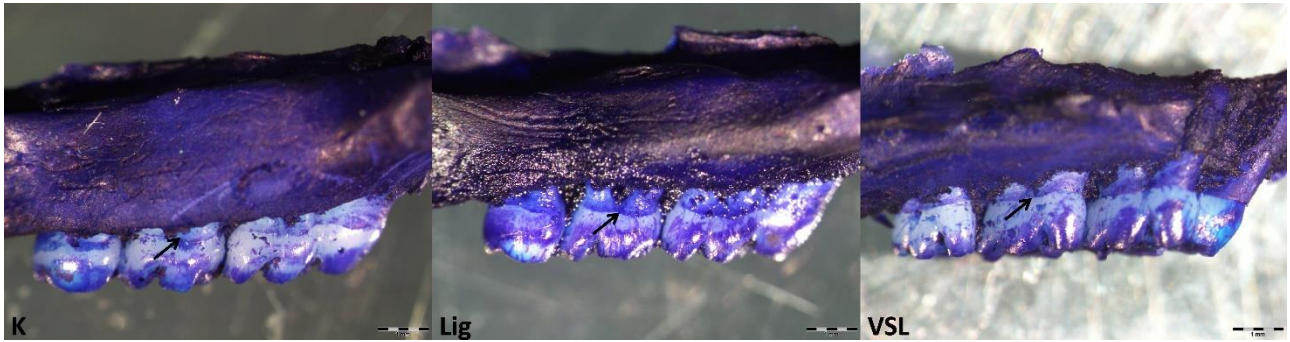


Şekil 1. Başlangıç ve bitim vücut ağırlıkları. K: Kontrol grubu, Lig: Ligatürle indüklenen periodontitis grubu, VSL: Ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği grubu

AKK, K grubuna göre Lig ve VSL gruplarında artmış, VSL grubunda Lig grubuna kıyasla azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 2, 3).

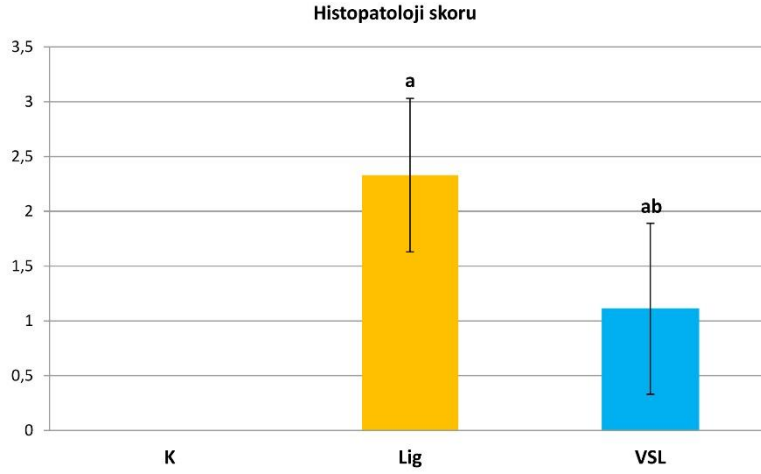


Şekil 2. Alveoler kemik kaybının gruplar arasında karşılaştırılması. K: Kontrol grubu, Lig: Ligatürle indüklenen periodontitis grubu, VSL: Ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği grubu. aK grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$), bLig grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).

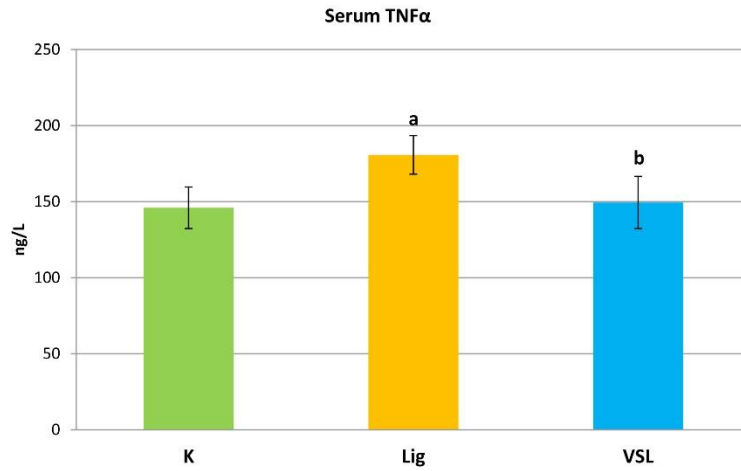


Şekil 3. Histomorfometrik olarak alveoler kemik kaybının ölçülmesi. K: Kontrol grubu, Lig: Ligatürle indüklenen periodontitis grubu, VSL: Ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği grubu. Siyah ok=Minesement sınırı, Bar=1 mm, Büyütme=20X

Histopatoloji skoru (Şekil 4) ve serum TNF α seviyeleri (Şekil 5), Lig grubunda K grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yükselmiş, VSL grubunda ise Lig grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4. Gruplar arasında histopatoloji skorlarının karşılaştırılması. K: Kontrol grubu, Lig: Ligatürle indüklenen periodontitis grubu, VSL: Ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği grubu. aK grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$), bLig grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).



Şekil 5. Serum tümör nekroz faktör alfa (TNF α) seviyelerinin karşılaştırılması. K: Kontrol grubu, Lig: Ligatürle indüklenen periodontitis grubu, VSL: Ligatürle indüklenen periodontitise ek probiyotik desteği grubu. aK grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$), bLig grubuna göre anlamlı farklılık ($p<0,05$).

Tartışma

Literatürde periodontal hastalık patogeneğinde Lactobacillus, Bifidobacterium ve Streptococcus suşlarını içeren çoklu probiyotik desteğinin serum TNF α seviyelerine etkilerini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre ligatürle indüklenen periodontitis modelinde standart diyetle ek çoklu probiyotik desteği AKK ve serum TNF α seviyelerini anlamlı derecede azaltmıştır.

Çalışmamızda ratlarda deneysel periodontitis modeli ligatür kullanılarak oluşturulmuştur. Ratlar molar bölgenin periodontal anatomisi açısından insanlarla bazı benzerlikler içerdiklerinden deneysel periodontitis modelinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (28). Literatürde deneysel periodontitis modellerinde farklı yaklaşımlar tercih edilmesine karşın ligatür modelinin insanlarda görülen periodontitise benzer şekilde kemik kaybını ve inflamasyonu indüklediği, Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) ve Fusobacterium nucleatumla birlikte P. gingivalis oral gavaj yöntemlerine kıyasla inflamasyonu indüklemesi ve AKK açısından daha etkili olduğu belirtilmiştir (29). Ligatür indüklenme sürelerinin çalışmalarda farklılık göstermesine karşın 14 günlük bir sürenin AKK açısından yeterli olduğu gösterilmiştir (11,26). Çalışmamızda periodontitis indüklenen gruplarda (Lig ve VSL), K

grubuna kıyasla hem AKK'nin hem de histopatoloji skorlarının anlamlı şekilde artması kullanılan modelin uygun olduğunu desteklemektedir.

Poinflamatuar bir sitokin olan TNF α periodontal hastalık gelişiminde adezyon moleküllerinin uyarılması, matriks metalloproteinaz stimülasyonu ve kemik rezorpsiyonu gibi birçok olayda rol almaktadır. Periodontal doku yıkımında ortaya çıkan hasarın çoğunun, patojenlere karşı aşırı tepki veren konak yanıtının interlökin 1 beta ve TNF α aktivitesini arttırmasıyla oluştuğu belirtilmiştir (6). Gumus ve ark. (10) periodontitisli bireylerde serum TNF α seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre arttığını rapor etmişlerdir. Yigit ve ark. (11) ligatür indüklü periodontitis modelinde, periodontitis grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek serum TNF α seviyelerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda Lig ve VSL gruplarında K grubuna göre artan serum TNF α seviyeleri, TNF α 'nın periodontal yıkımdaki rolünü ortaya koyan literatürle uyumludur.

İnsan barsak florasının farklı metabolik, fizyolojik ve immünolojik olaylarda rol aldığı ve barsak mikroflora kompozisyon değişikliklerinin doğrudan insan sağlığını etkilediği belirtilmiştir (30,31). Probiyotiklerin zararlı patojenlerin baskılanması, inflamatuvar süreçte rol alan medyatörlerin düzenlenmesi ve oksidatif dengenin sağlanmasını içeren birçok mekanizma üzerinden konak savunma sistemine katkı sağlayabileceği ve metabolik bozuklukların tedavisinde faydalı etkilerinin bulunabileceği ifade edilmektedir (32). Ayrıca probiyotiklerin doku yağ asit kompozisyonunu değiştirebileceği (33,34) ve omega 3 yağ asitleri içerisinde yer alan dokozahekzaenoik asit seviyelerini arttırabileceği ortaya konulmuştur (33). Çalışmamızda insan gastrointestinal sisteminde doğal olarak bulunan 8 adet probiyotik bakteri (Lactobacillus ailesinden L. casei, L. plantarum, L. Acidophilus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, Bifidobacterium ailesinden B. longum, B. breve ve B. infantis ve Streptococcus salivarius subsp. thermophilus) kombinasyonunu yüksek konsantrasyonda içeren probiyotik preparatı kullanılmıştır. Tek tür probiyotik kullanımına kıyasla çoklu probiyotik preparatının farklı suşlar arasında sinerjistik mekanizmalar aracılığıyla daha etkili olabileceği temeline dayanılarak (4) çalışma hipotezimiz oluşturulmuştur.

Periodontal hastalıkta probiyotiklerin rolünün daha ziyade tek bir türün etkinliği üzerinden incelendiği görülmektedir. Ince ve ark. (14) başlangıç periodontal tedaviye ek Lactobacillus reuteri (L. reuteri) desteğinin orta derinlikte cebe sahip hastalarda faydalı olabileceğini göstermişlerdir. Kronik periodontitisli hastalarda L. brevis uygulamasının klinik parametreleri iyileştirdiği ortaya konulmuştur (13). Tekce ve ark. (15) SRP'ye ek L. reuteri kullanımının tek başına SRP'ye kıyasla sondalamada kanama ve cep derinliği gibi periodontal parametreleri azaltabileceğini ve patojenik bakterilerin rekolonizasyonunu yavaşlatabileceğini ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde SRP'ye ek L. reuteri içeren pastil kullanımının cep derinliğini azaltarak ataçman kazancını arttırabileceği ve P. gingivalis seviyelerini düşürebileceği rapor edilmiştir (35). Deneysel periodontitis modellerinde ise Bacillus (16,17), Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) (18), L. brevis (19) ve Bifidobacterium (20) desteğinin AKK'yi anlamlı derecede azaltabileceği rapor edilmiştir. Diğer taraftan gingivitisli bireylerde L. plantarum, L. brevis ve Pediococcus acidilactici içeren çoklu probiyotik uygulamasının klinik parametrelere etki etmediğini rapor edilmiştir (36). L. reuteri desteğinin periodontitisli bireylerde klinik sonuçlara anlamlı etkisinin bulunmadığı da gösterilmiştir (37).

Çalışmamızda da Foureaux Rde et al. (16) çalışmasına benzer şekilde ratlara 44 gün süresince probiyotik desteği uygulanmış ve 30. günde deneysel periodontitis ligatürle indüklenmiştir. Foureaux Rde et al. (16) çalışmasından farklı olarak Lactobacillus, Bifidobacterium ve Streptococcus suşlarını içeren çoklu probiyotik desteği oral gavaj yöntemiyle uygulanmıştır. VSL grubunda Lig grubuna göre azalan AKK seviyeleri, probiyotik desteğinin kemik yıkımını engelleyebileceğini gösteren çalışmalara destek sağlamaktadır.

Probiyotik uygulamalarının periodontal hastalıkta TNF seviyelerine etkisine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Garcia et al. (18) ligatür indüklü periodontitis modelinde SRP'ye ek lokal S. cerevisiae uygulamasının kontrol grubuna kıyasla AKK ve doku TNF α seviyelerini azalttığını ortaya koymuşlardır. Maekawa ve Hajishengallis (19) deneysel periodontitis modelinde topikal L. brevis desteğinin CD2'nin AKK seviyelerini ve dişeti TNF mRNA sentezini azaltabileceğini göstermişlerdir. Gingivitisli bireylerde L. reuteri içeren sakız kullanımının dişeti oluşu sıvısı (DOS) TNF α seviyelerini

azaltabileceği belirtilmiştir (22). Kronik periodontitisli bireylerde ise *L. reuteri* desteğinin DOS TNF α seviyelerini azalttığı belirtilmiştir (21).

Çalışmamızda kullanılan çoklu probiyotik preperatının doku TNF α seviyelerini azalttığı rapor edilmiş (38), alkolik karaciğer sirozu olan bireylerde ise plazma TNF α seviyelerini iyileştirebileceği gösterilmiştir (39). Esposito et al. (25) 4 hafta süresince oral gavajla 13x10⁹/kg/gün dozda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* suşlarını içeren çoklu probiyotik desteğinin karaciğer TNF α aktivitesini anlamlı derecede azalttığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda Esposito et al. (25) çalışmasına benzer şekilde oral gavajla 13x10⁹/kg/gün süresince çoklu probiyotik bakteri içeren preparat kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarımız çoklu probiyotik desteğinin serum TNF α seviyelerini azaltabileceğini doğrulamaktadır.

Sonuç

Çalışma sonuçlarımızı yorumlamamızı zorlaştıran birtakım engeller bulunmaktadır. Literatürde *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* suşlarını içeren çoklu probiyotik desteğinin AKK ve serum TNF α seviyelerine etkilerini inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Kullanılan probiyotiklerin içerikleri, uygulama şekli, dozu, uygulama süreleri ile deneysel periodontitisin uygulama şekli ve süresi çalışmaları arasında farklılık göstermekte olup standardizasyon bulunmamaktadır. Çoklu probiyotik desteğinin immün yanıtla birlikte çalışmamızda incelenmemiş olan patojenik florayı da düzenleyerek sonuçlara etki etmesi olası bir diğer mekanizma olarak açıklanabilir. Diğer taraftan son yıllarda bazı probiyotik suşların antibiyotiklere dirençli genleri taşıyabileceği ve bu genleri patojenik flora horizontal gen transferiyle aktarabileceği endişelerinin arttığı görülmekte olup (40) probiyotik kullanımıyla ilgili dikkatli olunması gerçeği de göz ardı edilmemelidir. Sonuç olarak deneysel periodontitis modelinde çoklu probiyotik desteğinin serum TNF α seviyelerini düşürerek AKK'yi azaltabileceği öngörülmüştür. Probiyotik desteğinin periodontal hastalık gelişimi ve önlenmesinde umut vadeditici olduğu, çalışma sonuçlarımızın gelecekte yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2006;40:144-63.
2. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):36-47.
3. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506-14.
4. Gionchetti P, Lammers KM, Rizzello F, Campieri M. VSL#3: an analysis of basic and clinical contributions in probiotic therapeutics. *Gastroenterol Clin North Am*. 2005;34(3):499-513.
5. Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011;38(Suppl. 11):159-77.
6. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
7. Li L, Yang G, Shi S, Yang M, Liu H, Boden G. The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in vivo. *Cytokine*. 2009;45(1):12-9.
8. Sima C, Paster B, Van Dyke TE. Function of Pro-Resolving Lipid Mediator Resolvin E1 in Type 2 Diabetes. *Crit Rev Immunol*. 2018;38(5):343-65.
9. Gomes FI, Aragao MG, Barbosa FC, Bezerra MM, de Paulo Teixeira Pinto V, Chaves HV. Inflammatory cytokines interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha - novel biomarkers for the detection of periodontal diseases: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7(2):e2.
10. Gumus P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli N. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor-alpha in patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2014;85(2):270-80.
11. Yigit U, Kirzioglu FY, Uguz AC, Naziroglu M, Ozmen O. Is caffeic acid phenethyl ester more protective than doxycycline in experimental periodontitis? *Arch Oral Biol*. 2017;81:61-8.
12. Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2009;51:141-51.

13. Riccia DN, Bizzini F, Perilli MG, Polimeni A, Trinchieri V, Amicosante G, et al. Anti-inflammatory effects of lactobacillus brevis (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007;13(4):376-85.
14. Ince G, Gursoy H, Ipci SD, Cakar G, Emekli-Alturfan E, Yilmaz S. Clinical and biochemical evaluation of lozenges containing lactobacillus reuteri as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2015;86(6):746-54.
15. Tekce M, Ince G, Gursoy H, Dirikan Ipci S, Cakar G, Kadir T, et al. Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: a 1-year follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2015;42(4):363-72.
16. Foureaux Rde C, Messori MR, de Oliveira LF, Napimoga MH, Pereira AN, Ferreira MS, et al. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol.* 2014;85(7):975-83.
17. Messori MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LF, Sordi CG, Alves AJ, et al. Favourable effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2016;66:108-19.
18. Garcia VG, Knoll LR, Longo M, Novaes VC, Assem NZ, Ervolino E, et al. Effect of the probiotic saccharomyces cerevisiae on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2016;51(1):26-37.
19. Maekawa T, Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic Lactobacillus brevis CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):785-91.
20. Oliveira LF, Salvador SL, Silva PH, Furlaneto FA, Figueiredo L, Casarin R, et al. Benefits of bifidobacterium animalis subsp. lactis probiotic in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2017;88(2):197-208.
21. Szkaradkiewicz AK, Stopa J, Karpiński TM. Effect of oral administration involving a probiotic strain of Lactobacillus reuteri on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014;62(6):495-500.
22. Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactobacillus reuteri on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(1):19-24.
23. Kaynak D, Meffert R, Gunhan M, Gunhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.* 2000;71(5):790-6.
24. Kuo PJ, Hung TF, Lin CY, Hsiao HY, Fu MW, Hong PD, et al. Carvacrol ameliorates ligation-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2017;88(7):e120-e8.
25. Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr.* 2009;139(5):905-11.
26. Kirzioglu FY, Ozmen O, Dogan B, Bulut MT, Fentoglu O, Ozdem M. Effects of rosuvastatin on inducible nitric oxide synthase in rats with hyperlipidaemia and periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018;53(2):258-66.
27. Taskan MM, Balci Yuçe H, Karatas O, Gevrek F, Toker H. Evaluation of the effect of oleuropein on alveolar bone loss, inflammation, and apoptosis in experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2019;54(6):624-32.
28. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:754857.
29. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DM, et al. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig.* 2016;20(6):1203-16.
30. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012;489(7415):242-9.
31. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients.* 2015;7(4):2839-49.
32. Yoo JY, Kim SS. Probiotics and prebiotics: present status and future perspectives on metabolic disorders. *Nutrients.* 2016;8(3):173.
33. Joffre C, Dinel AL, Aubert A, Fressange-Mazda C, Le Ruyet P, Laye S. Impact of Lactobacillus fermentum and dairy lipids in the maternal diet on the fatty acid composition of pups' brain and peripheral tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2016;115:24-34.

34. Kaplas N, Isolauri E, Lampi AM, Ojala T, Laitinen K. Dietary counseling and probiotic supplementation during pregnancy modify placental phospholipid fatty acids. *Lipids*. 2007;42(9):865-70.
35. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(11):1025-35.
36. Montero E, Iniesta M, Rodrigo M, Marin MJ, Figuero E, Herrera D, et al. Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2017;44(7):708-16.
37. Pelekos G, Ho SN, Acharya A, Leung WK, McGrath C. A double-blind, parallel-arm, placebo-controlled and randomized clinical trial of the effectiveness of probiotics as an adjunct in periodontal care. *J Clin Periodontol*. 2019;46(12):1217-27.
38. Ulisse S, Gionchetti P, D'Alò S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, et al. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(9):2691-9.
39. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL# 3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(6):540-3.
40. Imperial IC, Ibane JA. Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Front Microbiol*. 2016;7:1983.