

KONU 72

Porphyromonas (*P. gingivalis*)

Şöyle refere edilir:

Aydin M. *Porphyromonas gingivalis*. Ed. Cengiz, Misirligil, Aydin. *Tip ve dis hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji*. Konu 72. Sa:633-644. Günes yayinevi, Ankara, 2004.

SINIFLANDIRMA:

1994'te *Bacteroidaceae* üyelerinin 16S ribozomal protein ünitelerindeki baz sıralamasına bakılarak *Porphyromonas* genusu *Bacteroidaceae* ailesi içerisinde ayrılmış 6-8 üyeden ibaret ayrı bir genus haline getirilmiştir. *Bacteroides levii*, *B. macacae* ve *B. forsythus* isimli bakteriler *Porphyromonas* üyeleri ile benzer biyokimyasal özellikler göstermesine rağmen baz sıralaması farklı olduğu için *Porphyromonas* genusuna dahil edilmemiştir. Bu genusun en bilinen üyeleri: *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. circumdentaria* ve *P. salivosa*'dır. Geri kalan *Porphyromonas* üyeleri ya insanda hastalık yapmaz veya klinik önemi azdır. Kedi, köpek jaguar ve rakun dişeti oluştuktan 104 farklı *Porphyromonas* türü elde edilmiştir fakat bunların hiçbirisi insan ağız florasına tespit edilememiştir. İnsan ağız florasında bulunabilen ve hastalık yapabilen *Porphyromonas*ların ortak özellikleri katalaz olumlu olmalarıdır. Buna rağmen insan patojeni olan iki tane *P. gingivalis* suşu katalaz olumsuzdur. İki tane de katalaz olumlu olmasına rağmen insan patojeni olmayan hayvan kökenli *P. gingivalis* suşu tespit edilmiştir.

En iyi bilinen periodontal patojen suşlar *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* 17A3 ve *P. gingivalis* W83 tür. Bunlardan 17A3 suşu 1979 da bir bayanın periodontitinden, W83 ise 1967 de yine bir insanın periodontitinden elde edilmiş stoklanarak günümüze kadar saklanmıştır. Ayrıca WPH35, HG184, HG189, 11834, A7436, HW11D-5, RB 46D-1 ve 381 suşları da iyi birer periodontal patojendir. Bunların genomik DNA sekansları tespit edilmiş olup standart suş olarak saklanmaktadır.

Porphyromonas ve başka bazı *Bacteroides*ler üredikleri besiyerinde siyah renkli pigmente benzer bir madde yapabilirler. Yakın tarihlere kadar "siyah pigmentli *Bacteroides*" sınıflaması *Porphyromonas*'lar için ayırdedici bir sınıflama olarak kabul ediliyordu. Artık bu gün biz biliyoruzki, bu sınıflama *Bacteroides*ler için yeterince ayırdedici değildir. Çünkü, bu pigment siyah olmayabilir. Bireysel yoruma açık olarak kiremit kırmızısı, kahverengi, yeşilimsi, koyu sarı renklerde olabilir. Aslında beklendiği gibi melanin değil, protohemin yapısında bir maddedir. Siyah pigment yapımı için besiyeri içerisinde at veya tavşan kanı bulunması, 7-10 gün kadar uzun bir süre inkube edilmesi zorunludur.

Ayrıca, herhangi bir bakteri herhangi bir zamanda siyah pigment kodlayan geni transdüksiyon ile bir başka bakteriden edinebilir veya delesyon yolu ile mevcut siyah pigment yapabilme yeteneğini kaybedebilir. Eski terminolojiye göre siyah pigmentli *Bacteroides* terimi ile kastedilen bakteriler (*Bacteroides levii*, *B. macacae*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. gingivalis* ve *P. endodontalis*, *Prevotella corporis*, *P. loeschii*, *P. denticola*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens* ve diğerleri) arasında belirgin bir DNA homolojisi bulunmaz. Bu sebeple artık "siyah pigmentli anaerobik basil" terimi kullanılmakta ve bu siyah pigment özelliği identifikasyonda kriter olarak kabul edilmemektedir.

GENEL ÖZELLİKLER:

Porphyromonas genusuna ait bakteriler Gram negatif, anaerop, hareketsiz, bazıları dağınık dizilmiş kokobasil, bazıları uçları yuvarlak sonlanan çomaklar halindedir. Bağırsak, dış genital organ ve ağız florasında yer alırlar. Sıklıkla kapalı organ apselerinden, sinüzit, apandisit, diş ve dişeti infeksiyonlarından izole edilirler, bakteriyemi yoluyla endokardit sebebi olabilirler. *Porphyromonas gingivalis* (eski adı ile *Bacteroides gingivalis*) bu hastalıklardan en sık sorumlu tutulan bakteridir.

Porphyromonas'ların büyük bir kısmı proteinleri degrade ederek enerji temin eder. Bu sebeple asakkarolitik *Bacteroides* sınıfına girer. Buna rağmen içlerinde karbonhidratları kullananları da vardır. Üredikleri ortama süksinat, format, alkalın fosfataz, *N-acetyl-B-glucosaminidase*, proteazlar, H₂ ve CO₂ salarlar. Eh potansiyelinin -100 mV dan düşük olduğunda daha bol ürerler. vit K₁ ve hemin hem üremelerini hem de virulanslarını artırır.

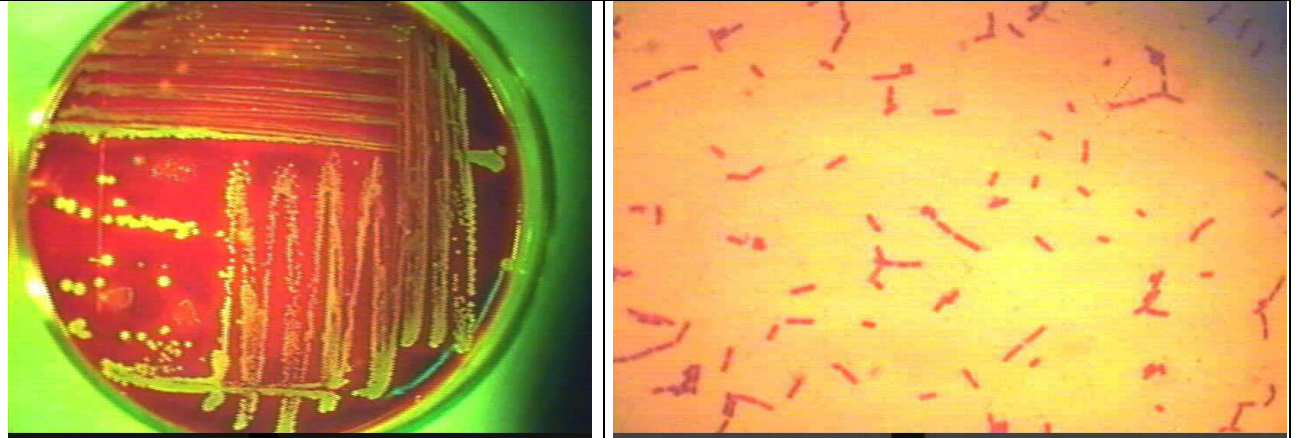
PORPHYROMONAS GİNGİVALİS:

MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ:

Hareketsiz, sporsuz ve anaeroptur. Boyu 0.5 µm ile 1.5 µm arasında olup kokobasil görünümündedir. Cerahat veya dişeti oluşu sıvısı içerisinde tek tek duran, kapsüllü ve birbirinden farklı büyüklükte kısa kok zincirleri veya kokobasil kümeleri halinde görülebilir. Anaeroplardan tamamı gibi Gram pozitif boyanmaya eğilimi vardır ancak Gram negatiftir (Şekil71-1).

Hücre morfolojisi besiyerinin hemin (ferriprotoporphyrin IX) konsantrasyonuna sıkıca bağlıdır. Hemin bulunmayan besiyerinde ovoid kok görünümündedir, fimbriaları bulunmaz ve ekstraselüler vezikül formasyonu görülür. Veziküller Gram olumsuz boyanır. Besiyerinde 0.5 µg/ml ye kadar hemin bulunduğu 1.5 µm uzunluğunda dolgun çomaklar şeklinde görünür, fimbriaları bulunur ve çevresine vezikül üretmez. Besiyerine 0.5 µg/ml 'den daha fazla hemin ilavesi üremeyi ve patojeniteyi artırmaz (Şekil 71-2).

Organizmadan ilk izole edildiklerinde, geniş ve tipe özgül bir kapsülleri bulunur. Kapsülü en iyi *reuthenium red* boyası ile boyanır. İlerleyen pasajlarında bu kapsül kaybolur.



Şekil-72.1 *P. gingivalis* kolonileri, CDC anaerop kanlı agar içerisinde 8 günlük saf kültürde zayıfca hemoliz ve gri renkli pigment yaparlar. Daha sonra bu renk siyahlaşır (solda). PYG buyyon içerisinde 6 günlük saf kültürden Gram boyama immersiyon objektifinde 1000x. (Sagda)

Fotoğraf: Aydın M. Çukurova Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ab D.1997

KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ:

CDC anaerop kanlı agar, vankomisin kanlı agar ve BHI kanlı agar, BM agar ve Brucella kanlı agarda, anaerop koşullarda 4-6 günlük inkübasyondan sonra ürer. Bu bakteri bilhassa ilk izolasyonda hemin ve vit K₁ gereksinir. Daha sonraki pasajlarında bu gereklilik daha azdır. Heminin üremeyi artırıcı etkisi, vit K₁ den fazladır. İlk izolasyondan sonra PYG buyyon veya zenginleştirilmiş THIO buyyon içerisine pasajlanırsa bolca üretilebilir. Bunlar bu bakteriyi kısa süreli (haftalar) stoklamak

amacıyla kullanılan besiyerleridir. Daha uzun süre stoklamak gerekirse besiyerine %20 oranında yağsız süt ilave edilip -70 derecede dondurulabilir.

Optimal üreme ısısı 36-37 derecedir. pH 7.3-7.7 arasında daha bol ürer. Agar kolonileri 1-2 mm çapında ve konvekstir. Besiyeri uygunsa, 7-10.uncu günde pigment yaparlar. Bu pigment ilk günlerde siyah olmayabilir, daha sonra siyahlaşabilir. Bilinen suşlarının üçte biri pigment yapmaz.

DİRENÇLİLİK:

Oksijene fevkalade duyarlıdır. Pek çok *P. gingivalis* türleri anti-anaerobik antibiyotiklere, penicillin+β laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Tetrasiklinlerden *doxycycline*'e daha duyarlıdır. Ortamda kalsiyum iyonu yoksa, *Doxycycline* (3 µM) bakterinin gingipain R enzimini %50 oranında bloke eder. *Doxycycline* konsantrasyonu 10 µM olduğunda ortamda kalsiyum bulunsa bile gingipain R tamamen bloke olur. *Doxycycline*'in gingipain K üzerine etkisi yoktur veya azdır. *Minocycline* ve diğer tetrasiklinlerin gingipainler üzerine etkisi yoktur.

Cerahat veya kan içerisinde ve oda ısısında günlerce canlı kalabilir. Mikrobiyolojik boyalara ve kuruluğa duyarlıdır, metronidazol (5 µg/ml), safra (% 0.1-0.5), jansiyen moru (1:100.000), brilant yeşili (1:80.000) üremeyi engeller, kolistin (10 µg/ml), kanamicin (1000 µg/ml)'e bütün aminoglikozit ve kinolonlara dirençlidir. Hücre membranı üzerinde xepCAB geni tarafından kodlanan iyon pompaları vardır. Bunlar aracılığı ile bir çok antimikrobiyal maddeyi (rifampin, puromycin ve ethidium bromide) hücre dışına pompalayarak uzaklaştırır.

P. gingivalis, oluşturduğu ekstraselüler veziküller sayesinde fagositozdan korunabilir. Ayrıca konakta glikokaliks yapısında bir kapsül oluşturarak fagositik kabiliyetteki konak hücrelerinden korunabilir. Nötrofil kemotaksisini engelleyen enzimleri vardır.

P. gingivalis 30 µg/ml den düşük konsantrasyonlarda chlorhexidine (CHX) içerisinde bile üreyebilir. Bazı yazarlara göre hücre gövdesinin ve veziküllerin enzimatik aktiviteleri kullanılan CHX den hiç etkilenmemektedir. Tam aksine, düşük konsantrasyonda (<30 µg/ml) CHX ile muamele edilen bakteriler, membran geçirgenlikleri bozulduğu için ortama daha fazla vezikül, tripsin benzeri proteazlar, *alkaline phosphatase*, ve *N-acetyl-B-glucosaminidase* gibi enzimler salarlar. Fakat bu veziküllerinin ve enzimlerinin litik etkileri büyük ölçüde kayıp olur. Bütün bu sebeplerle, bu bakteri üzerine CHX kullanılacaksa 30 µg/ml konsantrasyondan daha yoğun kullanılmalı ve sadece profilaktik amaçlarla kullanılmalıdır. Basit bir mantık yürütme ile şu senaryoya ulaşmak mümkündür: klorheksidin içeren antiseptik bir gargara ağıza alındığından sonra ağzın muhtelif noktalarına yayılan chx konsantrasyonu elbette farklı olacaktır. Muhtemelen ağzın belirli köşelerindeki chx konsantrasyonu 30 ug/ml den düşük olabilecektir. İşte bu ağızdaki bu noktalar *P. gingivalis* için en uygun rezervuarlar olacaktır. Bunu istemeyiz.

Tetradecyl-4-ethyl-pyridinium chloride (TDEPC) bir dördümlü amonyum bileşiğidir kimyasal kompozisyonu *cetylpyridium chlorid* gibidir. Bu madde CHX gibi doz bağımlı olarak *P. gingivalis*in üremesini inhibe eder. Lipofilik etkisi sebebiyle Gram negatif bakteri duvarındaki lipopolisakkarit tabakasını bağlayarak hücre duvarında yırtıklar ve sitoplazmik sızıntılara sebep olur. TDEPC düşük konsantrasyonda (<10 µg/ml) kullanıldığında *P. gingivalis*in hücre gövdesinde ve veziküllerindeki *alkaline phosphatase* aktivitesini artırır, *N-acetyl-B-glucosaminidase* aktivitesini azaltır. Bu antiseptik ile temas eden bakterinin vezikül proteazlarının volümü artar, ama litik aktiviteleri azalır. Bu sebeple sadece yüksek dozlarda (>10 µg/ml) ve profilaktik amaçlarla kullanımı uygundur.

Bu bakteriye yapılabilecek antibiyotik duyarlılık testleri için NCCLS (National Comitee for clinical Laboratory Standards) değerleri kullanılmalıdır. Bu standartlara göre agar dilüsyon metoduyla duyarlılık testleri yapılır, antibiyotik ilave edilmiş 4 mm kalınlığındaki Brucella kanlı agara 10⁵ CFU ekim yapılır, N₂ (%90), CO₂ (%5), H₂ (%5) atmosferde 37 derecede en az 4 gün inkube edilir. Bu bakteri için, E testi ile antibiyotik duyarlılığı, ciprofloxacın hariç diğer bütün antibiyotikler için kabul edilebilir bir metottur.

METABOLİZMASI:

Hemin zengin besiyerinde ürettiğinde, ortama propionat ve butirat gibi sitotoksik artıklar salar. Hemin bulunmayan besiyerinde ise ortama amonyum salar. Ancak diğer bakteroideslerden farklı olarak, ürettiği ortama valerik, kaproik, izokaproik veya süksinik asit salmaz. Çünkü metabolizması karbonhidrat fermentasyonuna dayanmaz. Daha çok aminoasit degradasyonu ile enerji temin eder. Enerji kaynağı olarak *arginin*, *cystine*, *histidin*, *serine*, *tryptophan* gibi aminoasitleri kullanır. Ayrıca hemin bulunmayan ortamda hiç kullanmadığı *isoleucine*, *leucine*, *methionine* ve *phenylalanine* gibi aminoasitleri hemin zengin ortamda bir enerji kaynağı olarak kullanabilir. *P. gingivalis* aminoasitlerden başka enerji kaynağı olarak heme gibi oligopeptit yapısındaki ITPP (Iron-Transporting Plasma Proteins) lerini de kullanır.

P. gingivalis ve diğer hemin gereksinen bakteroidesler, üreme dönemlerinde ortamda hemin bulduklarında, katalaz aktivitelerini artırarak zorunlu anaerop olmaktan çıkıp daha aerotoleran hale gelmektedirler (bu özellik, *Bacteroides distasonis*' te, *P. gingivalis*'ten daha daha belirgindir).

ANTİJEN YAPISI:

P. gingivalis, diğer bütün patojen bakterilerdeki gibi bir kapsül polisakkarite sahiptir. Fakat *P. gingivalis*'in kapsül polisakkariti diğer Gram negatif bakterilerden biraz farklıdır. Kapsülün yapısındaki şeker çekirdeğinde *2-keto-3-deoxyoctulosonic acid* ve *heptose* bulunmaz, onun yerine yağ asitlerine bağlı olarak *B-hydroxymyristic acid* bulunur, lipopolisakkarit yapısındadır. Bu molekül lipit A tabiatındadır ve kuvvetli bir antijendir.

Bakterinin dış duvarının jel elektroforezi ve kromatografik incelemelerinde bazı yazarlara göre 5, diğer bazılarına göre 3 majör protein antijen derivatı tespit edilir.

Bunlardan birincisi 69 kDa ağırlığında bir proteindir, membrana bağlıdır, yapısında eser miktarda karbonhidrat ve daha az miktarda kloroformda çözünebilen lipitler bulunur. Dış duvardaki bu fraksiyon bakterinin agregasyonunu ve böylece immün hücrelerden korunmasını temin eder.

Dış duvardan elde edilen ikinci fraksiyon ise büyük oranda lipopolisakkarit tabiatında olup çok az miktarda protein (41.5 kDa) içerir. Bu fraksiyon porin üzerinde bulunur, bakterinin hemaglutinasyon özelliğinden sorumludur.

Bir diğer antijeni ise 22 kDa ağırlığında bir fimbrillindir. Bu fimbrillin proteini saflaştırılıp deney hayvanlarına verildiğinde hemaglutinasyon yapmaktadır, kuvvetli immunojenidir. Fimbrillinin aminoasit sekanslarına göre FimA-I...FimA-V olarak 5 farklı tipi ayırt edilir. En antijenik olanları A gurubu olan fimbrillinlerdir (FimA). Dişeti epitelindeki fibroblastlara ve epitel hücrelerine tutunmayı ve internalizasyonu sağlarlar. FimA-II fimbrillinleri, periodontit patogenezinden birebir sorumludur. Çünkü bu grup fimbrillinler salyada bulunan ve konak savunmasını sağlayan PRP (proline-rich protein) den etkilenmezler. Fimbrillinlerin hepsi dişeti epitel hücrelerinden IL-8 salgılanmasını indükler.

P. gingivalis yukardaki antijenlerden başka, tiol protezlar salgılayarak serumun öldürücü etkisinden korunabilmektedir. Ayrıca daha birçok *hyaluronidase*, *chondroitinase*, *DNA-ase*, *RNA-ase*, *collagenase*, *mucopeptidase* ve sitotoksik enzim salgılar.

P. gingivalis ATCC 33277 nin bakteri gövdesinden ekstrakte edilebilen 21 tane farklı proteaz tespit edilmiştir. 17A3 suşunda 16, W83 suşunda ise 20 farklı proteaz bulunur. Bunlardan 15 tanesinin yapıları birbirine çok yakındır ve genus seviyesinde ortakdır. Hayvan kökenli suşlarda ise ortalama 12 tane farklı proteaz tespit edilmiştir. İnsan kökenli suşlarda bulunup hayvan kökenli suşlarda bulunmayan proteazlar serin proteaz yapısındadır.

Bir proteaz hangi protein veya aminoasiti daha kolay parçalıyorsa o protein veya aminoasitin ismi ile ifade edilir. Örneğin *P. gingivalis* proteazlarından en antijenik olanları *cysteine* proteazlardır ve bunlara **gingipain** adı verilir. Gingipain isimli proteazlar ekstraselüler enzimlerdir. Patogeneze iştirak eden en önemli 2 tane gingipain bulunur.

1. *Lysine* spesifik *cystein* proteinaz (**gingipain K**, Kgp): Bu madde, *cystein* dışında *lysine* de parçalayabilir. Konak eritrositlerinden açığa çıkan hemoglobin, hemopexin, haptoglobin ve transferrini parçalamaktan sorumludur. Fakat haptoglobin molekülünün yapısında bulunan β zincirleri üzerine etkisizdir.

2. *Arginine* spesifik *cystein* proteinaz (**gingipain R**): Bu madde *cystein* dışında *arginin* de parçalayabilir. Hemagglütinasyon etkisi azdır. Serum içerisindeki hemopexin ve transferrini parçalar. Ortamda *doxycycline* ($>3 \mu\text{M}$) bulunduğunda bu etkisi kaybolur.

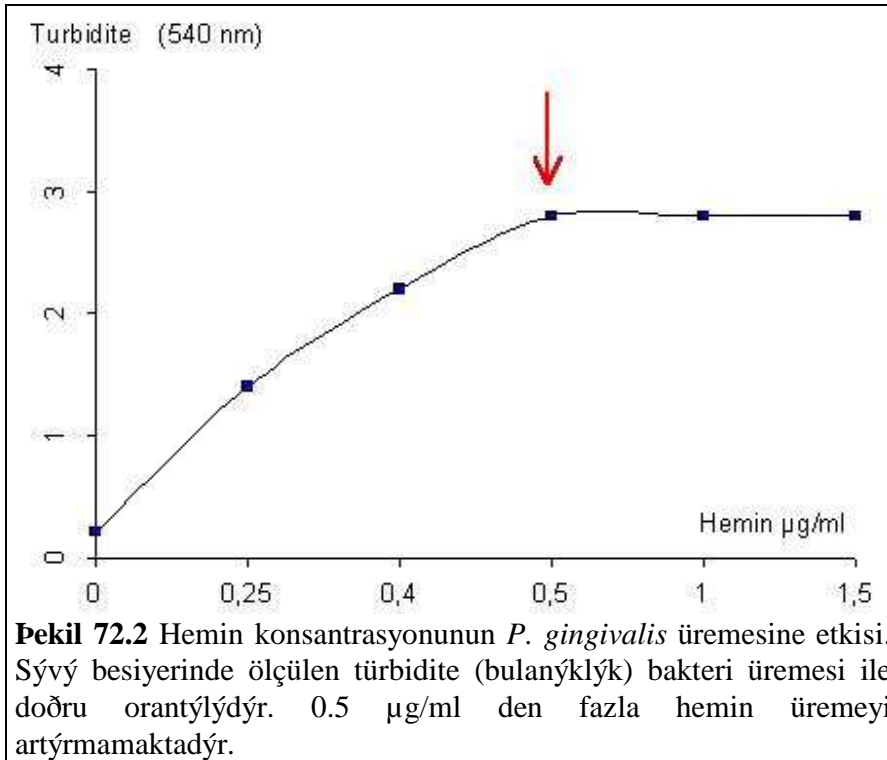
P. gingivalis 382 suşunun sitoplazmasında varlığı gösterilen *arginine carboxypeptidase* enzimi gingipain R ile birlikte bulunduğunda daha fazla antijeniktir. Bu maddenin moleküler yapısı memeli hücrelerinde bulunan çinko-karboksi-peptidaz enzimine benzer ve ortamdaki metal iyonlarını kuvvetle kendisine bağlayarak inaktive olur. Bu sebeple bu antijenin etkisi kısa sürelidir.

PATOJENİTE:

Her bakteri gibi *P. gingivalis*'in de konakta hastalık yapabilmesi için ilkönce konak dokuya tutunabilmesi gerekir. Konakta dişeti epitel hücrelerine, fimbriaları aracılığı ile tutunur ve hücrenin içerisine girer. Epitel hücrelerinin yüzeylerinde bulunan 50 ve 40 kDa luk 2 protein bu fimbrialar için reseptör görevi görür. Bunlardan 50 kDa luk protein aynı zamanda epitel hücresinin keratin bağlayan reseptörüdür. Dolayısıyla bu tutunma *trypsin* ile inaktive edilebilir. Salya kaplanmış hidroksil apatit yüzeylere, konak sert dokularına, epitele, PRP ve statherine de fimbrialarıyla tutunabilir. Konağa tutunması bazen ekstraselüler vezikülleri aracılığı ile de olabilir. Bu tutunma serum ile ve dişeti oluğu sıvısı ile inhibe edilebilir. *P. gingivalis* genellikle Gram pozitif bir bakteri aracılığıyla dişlerin yüzeylerine tutunmayı tercih eder. Bu özellik *P. gingivalis*in ekolojik kimliğinin bir kısmını oluşturur. Tutunmasına aracılık eden bakteri genellikle *Streptococcus salivarius* veya adezinleri ile tutunabilen *Actinomyces viscosus* gibi bir başka Gram pozitif bakteridir.

Bu bakteri için ortamda hemin bulunması patojeniteyi fevkalade artırır. Hiç hemin içermeyen besiyerinde üretilen *P. gingivalis* kültür süzüntülerinden (5×10^9 CFU) deney hayvanlarına kasıktan injeksiyon ile verildiğinde hayvanlarda hastalık oluşturulamaz. Aynı deney 0.33 $\mu\text{g/ml}$ hemin içeren besiyerinde üretilen *P. gingivalis* suşları ile tekrarlandığında deney hayvanlarının %20 si ölür. Hemin konsantrasyonu 0.4 $\mu\text{g/ml}$ ye çıkarıldığında deney hayvanlarındaki mortalite %50 ye çıkar. Hemin konsantrasyonu 0.5-5.0 $\mu\text{g/ml}$ arasında olduğunda mortalite %100 dür ve bu durumda en uzun yaşayan deney hayvanı ancak 2 gün yaşayabilir. Halbuki *P. gingivalis* dışında başka *Bacteroides* türlerinde aynı miktar bakteri inokülasyon deneylerinin sonucu ölümle bitmez.

Hemin zengin ortamda üretilse bile belirli bir hücre sayısının altında yapılan injeksiyonlar ile deney hayvanlarında hastalık oluşturulamaz. Demekki *P. gingivalis*in virulansı doza bağımlıdır. *P. gingivalis* injeksiyonları ile hastalandırılan deney hayvanlarının histolojik incelemelerinde injeksiyon bölgesinde lokal reaksiyonlar ve submuköz inflamasyon sahaları görülür. İnokülasyon dozu arttırıldığında injeksiyon bölgesinde lokal nekrozlar görülür. Yüksek dozlarda injeksiyon bölgesinde kılların dökülmesi, kas dokusunda ödem, yaygın bağ doku nekrozları, deride dekolmanlar ve lokalize apseler görülür. Deney hayvanlarının otopsilerinde karaciğerlerinde herhangi bir patolojik değişime rastlanmamıştır, ancak akciğerde lokosit infiltrasyonu, ödem ve alveoler kollaps tespit edilmiştir. Bu deneylerde bakterinin üretildiği ortama vit K₁ ilavesi mortaliteyi arttırmaktadır.



Hemin varken bakterinin ortama saldýğı butirik asit diseti dokusunda IL-6, IL-8, IL-11 salinmesini artırir ve T lenfositleri için toksiktir, T lenfositlerinin apoptosisini artırir, diseti fibroblastlarını doza bağli olarak suprese eder.

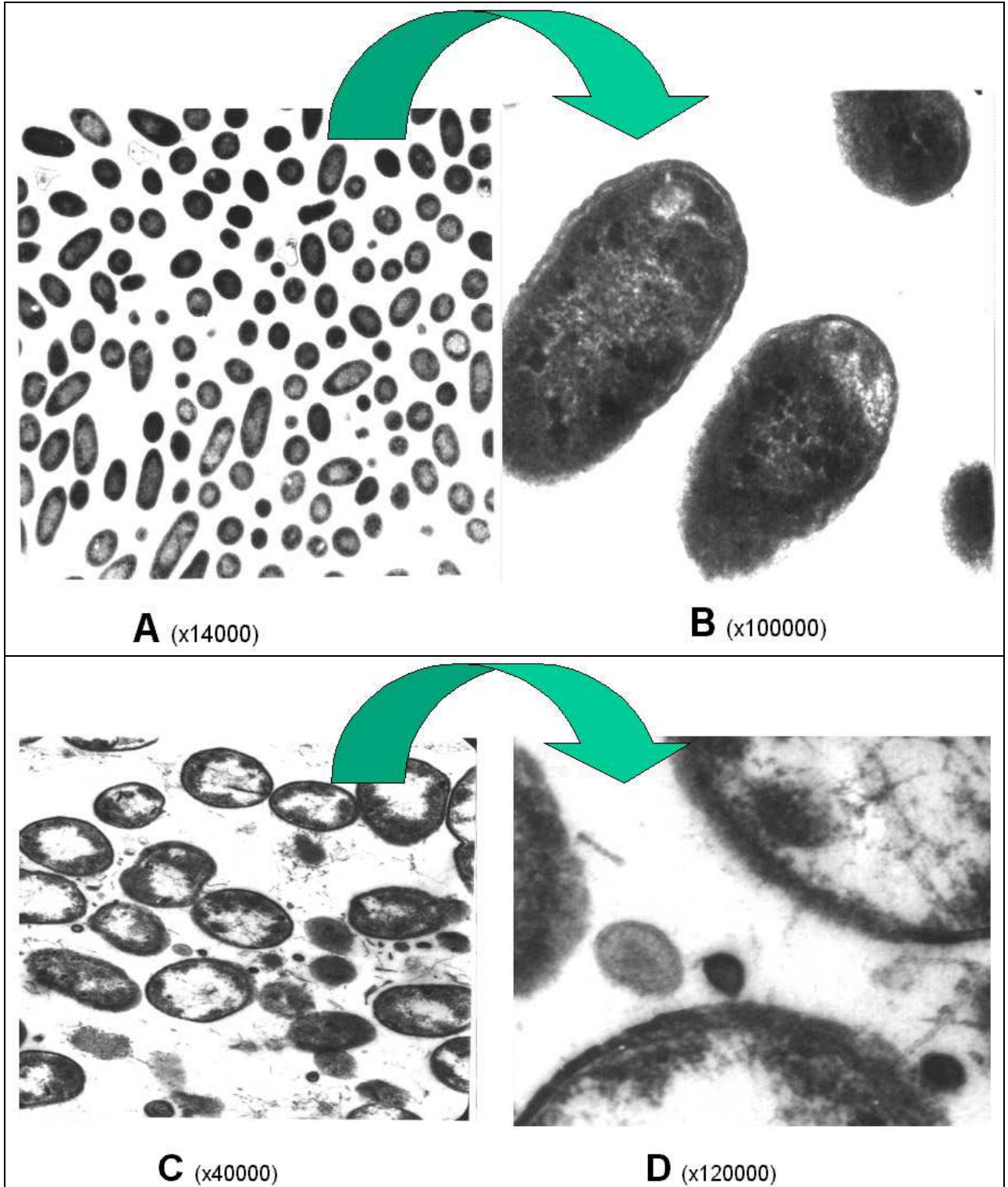
Ađız boşluđunun dođal sıvı ve sekresyonlarında ne hemin ne de vit K₁ bulunur. Bu bakterinin patojenite kazanabilmesi için 2 türlü hemin kaynađý vardýr: Birincisi *Camphylobacter*, *Veillonella* ve *Wolinella* üyelerinin katabolik atýklarýdır (kommensal iliþki). Florada bulunabilecek *Wolinella recta* hemin sentezi yaparak *P. gingivalis*in hemin

kaynađý görevini üstlenir. *P. gingivalis*in ikinci hemin kaynađý ise konađýn kendisidir. Konađýn eritrositlerini parçalayarak hemin elde eder. Bunu yapabilmek için ekstraselüler veziküllerinin içerisindeki litik enzimlerini kullanýr.

EKSTRA SELÜLER VEZİKÜLLERİ:

Ekstraselüler Veziküllerin yapısı:

P. gingivalis konakta hemin temin edemediği durumlarda (belkide hemin bulmak için) yaklaşık 20-150 nm çapında ovoid şekilde ekstraselüler veziküller oluşturur. Her bakteri hücresi kendi çevresine 50-100 tane ekstraselüler vezikül salabilir. Bunlar hücreye ait dýþ duvardan tomurcuklanma ile meydana gelen, lipopolisakkarit bir membran ile çevrilmiþ, litik enzim paketleridir ve Gram negatif boyanır. Ekstraselüler vezikül formasyonu bu bakterinin fenotipik adaptasyon motifidir. Veziküller canlı hücre değildir, kültürü yapılamaz. Evaporasyon, amonyum sulfat presipitasyonu, ultrafiltrasyon, sukrozda diferansiyel gradyant santrifüjü ile ve kloroformda ayrıştırma gibi yöntemlerle saf olarak elde edilebilen yapılardır. Elektron mikroskopunda vezikülü çevreleyen bir sitoplazmik membran görülmez, bir peptidoglikan tabaka da görülmez, veziküller 25-30 nm kalınlığında bakteri hücresi dýþ duvarına benzeyen 3 tabakalı bir duvar ile çevrilidir (Þekil 72-3).



Şekil-72.3 Hemin yokluğunda ekstraselüler vezikül oluşumu. Hemin varlığında (CDC anaerop kanlı agar 7 günlük kültür) kokobasil şeklindedir (A ve B), hemin bulamadığında (BHI agar 14 günlük kültür) dış duvardan tomurcuklanan veziküller yapar (C ve D).

TEM fotoğraflar: Aydın M. Çukurova Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ab D.

Chloramphenicol ile bu bakterinin dış duvar proteinlerini etkilemeden hücrenin sadece ribozomal protein sentezi durdurulduğunda vezikül formasyonunun azalması beklenirken tam aksine artarak devam ettiği görülür. Bu durum, vezikül formasyonunun bakterinin protein metabolizmasından nispeten bağımsız olarak devam edebildiğini ifade eder.

Vezikülün yapısında oranları suşlara göre değişmekle birlikte protein (%16.9), fosfolipit (%40.7), lipopolisakkarit (%42.4) bulunur. Halbuki bakteri dış duvarında protein oranı sadece %8 dir. Bu kompozisyon, vezikülleri bakteri gövdesinden daha immunojen yapar. Veziküllerdeki protein profili incelendiğinde, hidrofilik aminoasitler (45.67 mol%), bakteri dış duvarındakilerden (36.55 mol%) daha fazladır. Dışduvarda ve vezikül duvarındaki nötral ve hidrofobik aminoasit oranları, yağ asiti ve lipit oranları ortaktır. İlave olarak, vezikül çeperinde hepsi kuvvetli antijen tabiatında olan i15:0 (*13-methyltetradecaonic*), ai15:0 (*12-methyltetradecanoic*), 16:0 (*hexadecanoic*), 3(OH)i17:0 (*3-hydroxy-15-methyl-hexadecanoic*) yağ asitleri bulunur. Hepsisi antijeniktir.

Ortamda hemin bulunmayışı *P. gingivalis* için vezikül formasyonunu indükleyen bir stres oluşturur. Azocoll'u süratle degrade etmesinden anlaşılmaktadır ki vezikül muhteviyatı kuvvetli proteolitikdir. Vezikül fraksiyonlarında tespit edilen 50 kDa luk bir proteaz kazein'i degrade edebilmektedir. Ayrıca vezikül içeriğinde 14-82 kDa ağırlığında 28 farklı polipeptit antijen rapor edilmiştir. Hemin bulunmayan ortamda üretilen *P. gingivalis* veziküllerinin proteolitik aktiviteleri 2 katı, enzimatik aktiviteleri 3.2 katı artar.

Konak eritrositlerini bulup aglutine ve hemoliz edip onlardan yeterli miktarda hemin temin ettiğinde *P. gingivalis* vezikül formasyonu henüz bilinmeyen bir feedback mekanizması ile kaybolur veya azalır.

P. gingivalis, çevresine ekstraselüler vezikül salan yegane bakteri değildir. Örneğin *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endotoksin ve lökotoxin içeren, alveol kemiğini rezorbe edebilen veziküller salar. *Capnocytophaga* ve *cytophaga* türlerinin fosfataz aktivitesi bulunan ekstraselüler vezikülleri vardır. *Bacteroides uniformis*in vezikülleri bakteriyosin tabiatındadır. *Bacteroides succinogenes*, *Bacteroides fragilis* ve *Porphyromonas endodontalis*'in de *P. gingivalis*'e benzer ekstraselüler vezikülleri vardır. Ayrıca oral patojen olmayan *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*, *Brucella melitensis*, *Neisseria* türleri de ekstra selüler vezikül salarlar. Bu bakterilerin veziküllerinde bulunan lipopolisakkaritler defektiftir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*nın ekstraselüler veziküllerindeki lipopolisakkarit kompleksin içerisinde yer alan sakkarit zincirler normalden kısadır, daha az immünojendir. *Salmonella typhimurium*un veziküllerinde somatik O zincirleri mevcut değildir. *Bacteroides succinogenes* vezikülleri sadece ortama selüloz eklendiğinde ortaya çıkar ve bakteriyel aderans ile bir ilişkisi yoktur. *Pseudomonas fragii* sadece kas dokusunda hastalık yaptığında vezikül salar. Diğer *Pseudomonas*lar bakteri hücresi yaşlandığında fosfat zengin veziküller salarlar. Bu bakterilerden hiçbirisinin ekstraselüler vezikülleri *P. gingivalis* vezikülleri kadar özel değildir ve patogeneze böylesine kuvvetle iştirak etmez. Halbuki *P. gingivalis* dokuda hemagglütinasyon yapan adezyona iştirak eden veziküller üretir.

Ekstraselüler Veziküllerin Özellikleri:

1. HEMAGLÜTİNASYON:

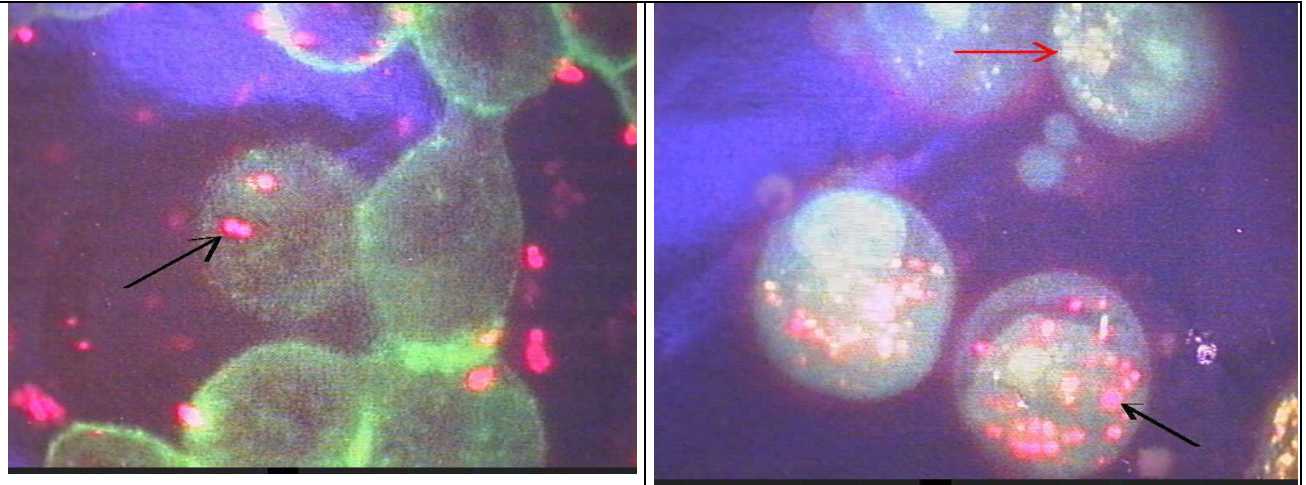
Veziküller, formalinlenmiş insan eritrositleri ile muamele edildiğinde hemagglütinasyon yapar. İlk bakışta bu hemagglütinasyon bir sürpriz değildir. Ancak başka bakterilerin hemagglütinasyonlarından farklı olarak bu veziküllerin yaptığı hemagglütinasyon şaşırtıcı seviyede iddialıdır. Örneğin *glycosidase* ve *phospholipase* ortama ilave edildiğinde hemagglütinasyonu durdurması beklendiği halde *P. gingivalis* veziküllerinin yaptığı hemagglütinasyon bu yöntemle durdurulamaz. Ayrıca ortama hemagglütinasyonu durdurması beklenen *D-glucose*, *D-galactose*, *D-mannose*, *N-acetyl-D-glucosamin*, *lactose*, *sucrose*, *rhamnose*, *N-acetyl-D-galactosamine*

konulduğunda ve hatta bunların miktarı 100 mM seviyesine çıkarıldığında bile veziküllerin hemagglütinasyonu engellenmemektedir. Ortama *L*-aminoasit ilavesi de faydasızdır. Ortamda *alanine*, *asparagine*, *serine*, *proline*, *leucine*, *lysin* ve *arginin* normalden 5 katı fazla miktarda bulunsa bile bu veziküllerin hemagglütinasyonu durdurulamamaktadır.

Pigment yapmayan *P. gingivalis* türlerine (mesela W50 suşunun BE1 mutantına) ait veziküller hemagglütinasyon yapmazlar. O halde hemagglütinin pigment proteinleri ile bir ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. Vezikül süspansiyonu kuvvetli proteazlarla muamele edilip pigment proteinleri uzaklaştırıldıktan sonra hemagglütinasyon deneyi tekrarlandığında hemagglütinasyonun yine durmadığı görülür. Veziküllerin hemagglütinasyon mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır ama buradan çıkan sonuç bu veziküllerde bulunan hemagglütininlerin protein veya glikoprotein yapısında olmadığıdır. Fakat serum ve tiol bloke edici maddeler (mesela 2,2'-dipyridyldisulphide) hemagglütinasyonu makul seviyede engellemektedir.

2. ADERANS:

Bu veziküllerin yüzeyinde hidroksilapatit kaplı yüzeylere ve salya ile örtülü hidroksilapatit yüzeylere tutunabilecek reseptörler bulunur. Ayrıca başta *Streptococcus sanguis* olmak üzere birçok streptokok bu reseptörlere kolayca tutunabilir. Ağızda bakteriyel aderans modellerinden bir tanesi bu veziküllerin diş sert dokularına tutunması ve streptokokların bu veziküllere indirekt tutunması şeklindedir. Veziküller önceden ısıtılırsa veya arginin ile muamele edilirse streptokok-vezikül tutunması durdurulabilir. Ama streptokoklar ısı ile muamele edildiğinde bu tutunma engellenmez. Demekki aktif adezinler streptokoklarda değil, vezikülün yüzeyinde bulunurlar.



Beşil-72.4 Epitel hücrelerine adezyon ve penetrasyon yeteneđi.

- P. gingivalis* KB epitel hücre kültürüne inoküle edildikten 5 dakika sonra epitel hücrelerine yapılabılır. Bir membran boyası olan DiO membrandaki internalizasyonu göstermektedir (Siyah ok).
- Rodamin ile kırmızı boyanan bakteriler, fagolizozomal membranları (kırmızı ok) yırtarak epitel hücrenin içerisinde perinükleer yerleşirler (siyah ok).

Fotoğraflar 9 numaralı kaynaktan alınmıştır.

3. KOAGREGASYON :

Veziküller hem birbirleri üzerine hem diğer bakteriler arasında agrege olmaya meğillidir. Normal koşullarda birbirlerine tutunamayan *Eubacterium saburreum* ve *Capnocytophaga ochracea* gibi oral patojenler ortama *P. gingivalis* vezikülleri ilave edildiğinde, veziküllere tutunarak çökelirler ve böylece fagositozdan korunmaları daha mümkündür. Veziküller deneyden önceden ısıtıldığında bu agregasyon etkisi kaybolmaz. Koagregasyon etkisi geniş bir pH değişiminde (4.5-8.5) bile kalıcıdır. Ortamda şekerler ve *uronic acid* bulunduğunda durması veya azalması beklenen koagregasyon etkisi,

100 mM *uronic acid* ilavesiyle bile engellenemez. Ancak *L-arginin* (2.5 mM) veya *L-Lysine* (50 mM) koagregasyon etkisini kısmen bloke edebilir.

4. HEMOLİZ:

Bakteri gövdesinin hemolitik aktivitesi bulunmadığı halde veziküllerinin koyun eritrositlerini kısmen hemolize etmesi *P. gingivalis*'i daha da sıradışı yapar. Hemolizin yapısındaki maddenin vezikülde bulunan bir *cystein-protease* olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterinin hemolizini eritrosit membranındaki spectrin isimli yapısal proteini degrade ederek tam hemoliz yapmasa bile eritrositten dışarıya hemoglobin sızıntısına sebep olur. Bu sebeple bu bakterinin yaptığı hemoliz, tiol bloke edici maddeler (mesela *2,2'-dipyridyldisulphide*) ile durdurulabilir.

5. HEMİN BAĞLAMA:

Konak eritrositlerinden sızan yegane demirli madde hemoglobin değildir. Demir taşıyan molekül, albumin, hemopexin, haptoglobulin-hemoglobin kompleksi de olabilir. Bütün bu bileşiklerin içerisinde bu bakterinin ihtiyacı olan hemin bulunur. Fakat bu bileşiğin içerisinde heminin nasıl kopartıldığı tam olarak bilinmemektedir. Bu aşamada akla gelebilecek bir soru: ortamdaki heminin bakterinin hangi komponentine bağlandığıdır.

Hemin bulunmayan ortamda üretilen *P. gingivalis* hücrelerinin dış duvarlarında, normalde bulunmayan 2 farklı protein bulunduğu gösterilmiştir. Bunlar 51 ve 32 kDa ağırlığında olup HBPs (Hemin Binding Proteinler) adını alır. Bu proteinler hücre gövdesindeki HmuR isimli hemin bağlayan reseptörü oluşturur. Bu reseptör *protoporphyrin*, *mesoporphyrin*, *deuteroporphyrin*, *metalloporphyrins*, *hematoporphyrin* ve diğer demir bileşiklerine kuvvetli afinite gösterir. Ortamda hemin varken çoğalan hücrelerde bu reseptörler bulunmaz veya azdır.

Kontrollu hemin ilave edilmiş besiyerinden toplanan *P. gingivalis* ATCC 33277 örnekleri üzerinde yapılan selüler ekstraksiyon çalışmaları göstermiştir ki, ortamdaki hemin bakterinin dışduvarına dönüşümsüz olarak bağlanmakta ve lipopolisakkarit kompleksin yapısına dahil olarak lipit A-demir kompleksi oluşturmaktadır. Ortamdaki hemini ilk yakalayan HBP lerdir. Bu mekanizmanın siderofor aracılıklı tutunma olduğu düşünülmektedir. Kuru ağırlığı 1 mg olan hücre dış duvarı yaklaşık olarak $5.86 \pm 1.9 \mu\text{g}$ hemin bağlamaktadır. Üstelik bağlanan hemin, Tris buffer içerisinde ultrasantrifüjasyon ile yerinden koparılamamaktadır. Benzer bir özellik *Shigella flexneri* dış duvarındaki 101 kDa luk hemin bağlayan proteinde de vardır ve bakterinin dokuya invazyonu buna bağlıdır. Muhtemelen *P. gingivalis*in hemin bağlama özelliği de periodontal dokulara invazyon yeteneğini artırmaktadır. Siyah pigment yapmayan *P. gingivalis* suşları daha az hemin bağlarlar.

Ekstraselüler Veziküllerin Enzimatik Aktiviteleri:

Vezikül muhteviyatındaki enzimlerin teker teker neler oldukları tam olarak tespit edilememiştir. Üstelik bu enzimler sayı ve kimyasal yapı bakımından suştan suşa değişiklikler göstermektedir. Veziküldeki enzimler degradatif ve digestiftir. Aktivitelerine bakılarak şöyle gruplanır:

1. Proteolitik aktivite: Bu özelliğe sahip olan enzimlerin 29 - 110 kDa ağırlığında toplam 7 gurup enzimden oluştuğu gösterilmiştir. Bir kısmı *cysteine* proteaz ve serin proteazdır, bunlar tiol bloke edicilerden etkilenir. Hepsi, periodontal dokudaki ölü hücre sayısı arttığında ve Eh düştüğünde daha yıkıcı olurlar. Bu özellik periodontitin neden progresif bir prognozu olduğunu kısmen açıklar. Vezikül proteazları şu bileşikleri parçalayabilir: *azozoll*, *a-1-antitrypsin*, sığır serum albumini, *casein*, *collagen* (tip-1), eritrosit membran proteinleri, fibronectin, fibrinogen, jelatin, hemogloblin, IgA, IgG, transferrin ve daha bir çok proteinöz yapı. Bunların içerisinde kollajen periodontal dokunun en önemli interselüler elementi olup ortadan kalkması durumunda periodontal doku bütünlüğü bozulur. Vezikül içerisinde kollajeni parçalayan spesifik bir tek enzim tespit edilememiştir. Kollajen yıkımı nonspesifiktir.

Hem salya hem de dişeti oluğu likitinde bulunan fibronektin, periodontal ataşman tamirinde rol alır, ayrıca monositik aktivite için gereklidir ve nonspesifik olarak streptokoklara bağlanarak opsonin görevi görür. Vezikül proteazları fibronektini parçaladığında sadece periodontal tamir işlevini geciktirmekle kalmaz aynı zamanda streptokoklara karşı yürütülmekte olan immun savunmayı da bozar.

Hem *P. gingivalis* hücre ekstraktlarında hem dışduvar fraksiyonlarında hem de vezikül fraksiyonlarında *glycylprolyl dipeptidase* isimli bir aminopeptidaza rastlanmıştır. Bu enzim kollajenin alfa zincirlerini ve *gly-pro* aminoasit köprüleri ihtiva eden diğer başka polipeptitleri de depolimerize eder. Periodontal doku yıkımında kollajenaz aktivitesine benzer bir rol üstlenir. Etkisi 20 mM *dithiothreitol* veya serin proteaz inhibitörleri ile engellenebilir. Periodontal dokuda Eh düştüğünde daha yıkıcıdır.

2. Osteoklastik aktivite: *P. gingivalis*in gövdesinde (periplazmik boşlukta) alkalin fosfataz bulunur ve bu bakteri bu enzimi kendisine enerji temin etmek için, sitoplazmik membranın fosforla yüklenmesini engellemek ve kendi membranındaki fosforu uzaklaştırmak için kullanır. Buradaki alkalin fosfataz enzimi muhtemelen vezikül formasyonu sırasında yanlışlıkla vezikül çeperine dahil olur. Veziküldeki alkalin fosfataz, vezikülün dış duvarının hemen altında bulunur. Vezikül ile birlikte periodontal dokulara yayıldığında konak dokuda mineralize dokuyu defosforilize ederek kemik organik matriksinin yıkılmasını sağlar.

Ayrıca bu bakterinin hem veziküllerinde hem de hücre gövdesinde *N-acetyl-B-glucosaminidase* enzimi bulunur. Bu enzim aslında proteinlere bağlı glukozu yerinden koparmak için bakteriler tarafından kullanılan bir enzimdir. Fakat asakkarolitik doğası sebebiyle *P. gingivalis* bu enzimi glukoprotein kompleksinin içerisinde protein koparmak için kullanır. Bu enzimin kemik dokusundaki organik matriksin üzerine de yıkıcı bir etkisi bulunmaktadır.

3. Koruyucu etki: Veziküller serumun bakterisidal etkisinden bakteriyi korurlar. Bilindiği üzere, serumun içerisinde kompleman, nonspesifik immunglobulin ve transport proteinler bulunur ve bu sebeple serumun bakteriler üzerine engelleyici bir etkisi vardır. İçerisinde %1 serum bulunan besiyerinde birçok oral patojen mesela *Capnocytophaga ochrace* ve *Prevotella loescheii* üremediği halde eğer besiyerine 0.3 µg/ml konsantrasyonda *P. gingivalis* vezikülleri ilave edilirse serumun inhibitör etkisi ortadan kalkar ve bu bakterilerin üremesi (%104 oranında) artar. Veziküllere bu özelliği veren birisi termolabil ve birisi de termostabil olan iki enzim bulunduğu gösterilmiştir. Termolabil enzim 70 derecede 30 dakika veya 100 derecede 5 dakika kaynatmayla etkisini kaybeder. Termostabil enzim kaynatmayla inaktive olmaz ve ancak yüksek konsantrasyonlarda (1.5 µg/ml) etkili olur. Veziküllerin duvarında bulunan lipopolisakkaritler de termostabildir ve çok yüksek konsantrasyonlarda (75 µg/ml) serumun bakterisidal etkisini engeller. Ayrıca bu lipopolisakkaritler, *C. ochrace* yüzeyinde komplemanın C3 parçasının tutunacağı reseptöre yapışarak bu bakterinin opsonizasyonunu engeller.

4. Sitotoksik aktivite: Veziküller insan lökositlerinin canlılığı ve kemotaksis kabiliyetleri üzerine olumsuz etki ederler. Agaroz jel içerisine konan nötrofiller *P. gingivalis* hücre gövdesine kemotaksis yapabildikleri halde ekstraselüler veziküllere doğru kemotaksis hareketleri sınırlıdır veya hiç yoktur. Veziküllerin nötrofil kemotaksisini engelleyen bu özelliği her konsantrasyonda (10^{-3} - 10^3 µg/ml) görülür. Muhtemelen bu sebeple vezikül fagozitozu henüz gösterilememiştir.

YAPTIĞI HASTALIKLAR:

P. gingivalis pek çok anaerop infeksiyondan (otit, sinüzit, apandisit, derin abdominal apseler) izole edilebilir ancak sıklıkla periodontal dokularda iltihaplanmalara ve periodontal kemik yıkımına sebep olur. Erişkin periodontitinden yapılan kültürlerin %75.8 inden *P. gingivalis* elde edilir. İnfekte kök kanalından izole edilme sıklığı ise %12 dir. Dolayısıyla bir endodontik patojen

olmaktan daha çok bir periodontal patojendir. Monoinfeksiyon halinde olduğunda periodontal infeksiyonlar tekrarlamaya daha müsaittir. Eğer *P. gingivalis* infeksiyonu üzerine CMV (sitomegalo virus) infeksiyonu eklenirse prognoz daha ağır olmaktadır.

Dişeti epiteli, ağız florası ile konak dokuları birbirinden ayıran önemli bir bariyerdir. *P.gingivalis* dişeti epitel hücrelerine internalize olma özelliğine sahiptir. İnternalizasyonun ilk basamağına ekstraselüler veziküller öncülük eder. Bakteri, epitel hücrelerine girdiğinde epitel hücrelerinin nükleusuna yakın yerleşir ve burada fagositozdan korunarak rahatça çoğalabilir (Şekil 71-4). Böyle infekte olmuş dişeti epitel hücrelerinden ve monositlerden bir konak sinyali olarak *mitogen activated protein kinase* enzimi salgılanır. Bu enzimatik aktivasyondan *P. gingivalis* lipopolisakkaritleri sorumludur.

P. gingivalis epitel hücrelerinin birbirlerine tutunma yüzeylerinde yer alan *E-cadherin* isimli proteini önce hidrolize ve sonra degrade edip epitel örtünün bütünlüğünü bozarak bağ dokusuna geçebilirler. Bu etkiden gingipain K sorumludur, düşük (250 mM) konsantrasyonda bile epitel örtüyü parçalayabilir. Ayrıca bakteri gövdesinden sonikasyon ile elde edilen ekstraktlar 0-2 µg/ml konsantrasyonda bile kuvvetli (%45-70 oranda) osteolitikdir.

Periodontal dokulara sızan bakterinin, buradan bakteriyemi yoluyla sistemik dolaşıma geçerek endokardit sebebi olabileceği veya ateroskleroza sebep olabileceği gösterilmiştir. Aort, kalp ve insan göbek kordon veninden alınan endotel hücreleri bu bakterinin 381 ve A7436 suşları ile muamele edildiğinde endotel hücrelerinde interselüler ve vasküler adezyon sitokinleri ayrıca *P* ve *E-selectin*'leri salgılandığı gösterilmiştir. Ayrıca endotelden IL-8 ve *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) salınmasını da indükler. Bunlar damar çeperinde aterom plakları oluşturabildiğinin kanıtıdır. Bu etki *cytochalsin D* ile bloke edilebilir. Damar endoteline harabiyetin mekanizması gingipain K ve fimbria proteinlerine bağlıdır. Noninvazif suşlar ve fimbria defektli suşlar endotel hücrelerinde bu sitokinleri oluşturamazlar.

EPİDEMİYOLOJİ VE DÜNYADA YAYGINLIĞI:

Onüç yaşından büyük 160 milyon gönüllünün diş plağı florası incelenmiş ve %90'ında bu bakterinin kolonize olduğu tespit edilmiştir. Ancak hastalık yapabilmesi, periodontit sebebi olabilmesi veya bakteriyemi ile sistemik hastalıklara sebep olması için konağın duyarlı olması ve başka bazı bakterilerle birlikte bulunması, konak dokuda Eh potansiyelinin yeteri kadar düşük olması, diştışı gibi hazırlayıcı sebeplerin bulunuyor olması, konağın immun savunmasının azalmış olması gerekir. Ancak literatürde bu bakteri ile ilgili spekülatif yayınlar vardır. Örneğin: hiçbir bakteri ile kontrol grubu karşılaştırması yapılmaksızın, sadece 26 periodontitli, 25 sağlıklı bireylerin serumları karşılaştırılmış. Periodontitli bireylerin serum kolesterol ve trigliserit seviyeleri ve antikorların *P.gingivalis* ile reaksiyon vermeleri arasında ilişki anlamlı bulundu diye periodontit ve hiperlipidemi arasında ilişki olduğu söylenmiştir. (Cutler CW, 1999) Bu çalışmanın kurulumu böyle bir hüküm vermeye müsait değildir. *P.gingivalis* ve kan yağları arasındaki ilişkiyi gösterir. Ayrıca kontrol grubunda başka bakteri kullanılmadığı için bu çalışmada elde edilen bilgi hükümsüzdür.

40 tane serebral infarktı olan orta yaş hastanın 16 tane periodontitli ve infarktlı bireylerde *P. gingivalis* karşı oluşan serum IgG seviyesi 11.06 ± 1.49 bulunurken sağlıklı bireylerde 9.15 ± 1.70 bulundu diye, bu bakteri ve serebral infarkt arasında zorlama bir matematik ilişki kurulmaya çalışılmıştır. (Zhang Z, 2015)

Fare beyninden alınan glial hücreler üzerine *P. gingivalis* uygulandığında, PGE₂ salgılandığı için *P. gingivalis* multipl sklerozisten sorumlu tutulmuştur. (Shapira L, 2002) Bu çalışmada da kontrol amaçlı hiçbir bakteri kullanılmamıştır.

Bu bakteri üzerine bir başka spekülasyon diabet sebebi olduğu yolundadır. Sadece retrospektif bir istatistik yapılmış, diyabetin toplumda toplam görülme sıklığı %1-6, periodontitin görülme sıklığı %14 bulunmuştur. Diyabet, periodontitli bireylerin %17.3 ünde, periodontit olmayan bireylerin %9 unda görülmüştür. Periodontit, diabetik bireylerin %12.5 inde diabetik olmayan bireylerin %6.3 ünde görülmüştür. Bu matematik ilişki sebebiyle *P. gingivalis*'in diyabet sebebi olduğu söylenmiştir. Bu erken bir iddiadır. Mekanizması açıklanmadığı sürece bunlar sadece hipotezdir.

37 diyabet hastası periodontiti olan ve olmayan gruplara ayrılmış. Salyalarından porpyromonas gingivalis mevcudiyeti pcr ile tespit edilmiş. Bunlardan 10 tanesinde bu bakteri tespit edilmiş. Bunların 9 tanesi periodontitli, 1 tanesi periodontitsizmiş. Yazar bu bakteriye erken dönemde tetrasiklin verilirse glisemik durumu kontrol altına alabiliriz diye hüküm vermiş. (Radhakrishnan P, 2019) Bu çalışma hem deneysel kurulum bakımından kusurludur hem de sonuçlarının üretilmesi yetersiz, eksik ve yanıltıcıdır. Bu çalışmaya bakarak tetrasiklin ile kan şekerini kontrol altına almaya çalışmak çılgınlıktır.

Bu bakteri ile ilgili bir başka iddia hamilelerde düşük sebebi olduğudur. Bir çalışmada hamile hamsterler, canlı ve ısı ile öldürülmüş *P. gingivalis* ile infekte edilmiştir. Enfeksiyonun 5.inci günde farelerin serumunda TNF-alfa ve PGE₂ seviyeleri ölçülmüştür. PGE₂ seviyesinin 4.7 pg/ml den 362 pg/ml ye ve TNF-alfanın 26.4 pg/ml den 724 pg/ml ye yükselmesi bu bakterinin değil bütün Gram negatif oral patojenlerin topluca düşüğe sebep olduğu şeklinde yorumlamıştır. (Collins JG, 1994) Bu çalışmada hiçbir kontrol gurubu kullanılmamıştır. Örneğin bu deneyde kontrol grubu (mesela *Brucella abortus*) bulunmadan *P. gingivalis* ne ölçüde düşük sebebi olduğunu söylemek imkansızdır. Ayrıca ısı ile atenué edilmiş bir *P. Gingivalis* ile çalışıp bütün Gram negatif oral patojenlere hüküm vermek isabetsizdir.

Hamile farenin pulpasına *P. gingivalis* inoküle edilip apikal apse oluşturulmuş. İnokulasyonu takip eden 6 ıncı haftada düşük ağırlıklı doğum gerçekleşmiş. Plasentada bakteri gösterilmiş. TNF-a, COX-2 artışı, DNA hasarı, apoptoz gösterilmiştir. Sonuç olarak dental ve marginal periodontitin düşük doğum ağırlığına sebep olabileceğine hüküm verilmiştir. (Ao M, 2015) Bu çıkarım doğru değildir. Bu çalışmada bir başka bakterinin kıyas için kullanılabileceği herhangi bir kontrol grubu yoktur. *P. gingivalis* neye göre kıyaslanıp hüküm verilmiştir. ? Belkide bakteri yerine meyve suyu injekte edilseydi hamile fare düşük yapacaktı. Ayrıca *P. gingivalis* bütün dental ve periodontal patojenleri temsil etmez. Bu sebeple bu sonuç eğer doğru bir çalışma yapılmış olsaydı bile sadece 1 bakteriye bağlayacaktı.

Literatürde daha ileri spekülasyonlar da mevcuttur: örneğin tamamen istatistiklere dayanarak kronik obstrüktif akciğer hastalığı (amfizem, astım, kronik bronşit) bulunan bireylerin sayısı ile, ağız florasındaki *P. gingivalis* kolonizasyonu arasında matematik ilişki kurarak, *P. gingivalis*' i akciğer dejeneratif hastalıklarının sorumlusu olarak gösteren raporlar vardır. Sadece retrospektif istatistik yaparak, hastahane kayıtlarını inceleyerek, 1988-1994 yılları arasında bir sağlık kurumuna bronşit sebebiyle müracaat eden hastaların dişeti cep derinliğini 1.48 ± 1.35 mm, bronşiti olmayanların dişeti cep derinliğini 1.17 ± 1.09 mm bulup, buradan periodontitin akciğer hastalıklarına sebep olabileceği sonucu çıkaran yayınlar vardır.

Halbuki, bir mikororganizmanın bir hastalığa sebep olduğunu söyleyebilmek için Koch's postülasını doğrulaması, patogenezin tespit edilmesi gerekir. Yukardaki iddialar, aynı merkezden destek ve kabul gören, aynı ekip veya aynı ekole mensup bireyler tarafından yapılan fantastik

yayınlarıdır, ileri sürdükleri görüşler şimdilik (bu günkü bilgilerimize göre) sadece hipotezden ibarettir.

TEDAVİSİ:

P. gingivalis ile meydana gelen periodontal hastalıklar bulaşıcı değildir. Bu bakteri ancak uygun ekolojik koşullar ortaya çıktığında duyarlı bireylerde periodontite sebep olur. Öpüşme ile veya ortak tabak, çatal kullanma ile periodontitin bulaştığı gösterilmemiştir. Hastalığın bulaşmasında konak savunmasının ve genetik eğilimin de rolü vardır.

P. gingivalis ile meydana gelen periodontal hastalıkların yegane tedavisi diş, dişeti ve gingival sulkusta biriken bakteri plağı ve diştaşlarının uzaklaştırılmasıdır. Detartraj veya subgingival küretaj veya hekimin uygun göreceği bir müdahale ile plak ve diştaşları uzaklaştırıldığında periodontal dokular genellikle kendiliğinden iyileşir. Nadir vakalarda topikal antiseptikler (chlorhexidin, hexachlorophenol veya povidone gargara), antiinflamatuvar gargaralar, veya sistemik antibiyotik (doxycycline 1x100 mg, clindamycin 4x150mg, amoxicillin+clavunate 2x1 g) verilmesi gerekli olabilir. Ancak tekbaşına antibiyotik uygulamasının hiç bir tedavi edici özelliği yoktur. Plak temizliği idame ettirilmediğinde nöksler sıkça görülür.

KORUNMA KONTROL YOLLARI :

P. gingivalis ile meydana gelen periodontal hastalıklardan korunmanın en makul yolu diş, dişeti ve gingival sulkusta bakteri plağı ve diştaşlarının birikmesine engel olmak ve periyodik olarak bunları uzaklaştırmaktır. Antibiyotikli veya antiseptikli dişmacunu ve ağız gargaralarının korunma amaçlı kullanılmaları flora paternini olumsuz etkilemesi sebebiyle doğru değildir.

Diş çürüğü aşılı gibi bu bakterinin oluşturduğu periodontite de aşı çalışmaları devam etmektedir. Saflaştırılmış gingipain K, gingipain R ve ısı ile öldürülmüş *P. gingivalis* hücreleri deri altından farelere verildiğinde ve daha sonra *P. gingivalis* inokülasyonu yapıldığında farelerin serumlarında *P. gingivalis* özgül IgG tabiatında özgül antikorlar tespit edilmiştir. Fakat sadece gingipain K ve ölü *P. gingivalis* hücrelerine karşı oluşan antikorlar fareleri periodontitten korumuştur.

Yapılan bir başka aşı çalışmasında, formalinle atenüe edilmiş *P. gingivalis* ATCC 33277 hücreleri, gingipain K, gingipain R ayrı ayrı saflaştırılıp tam olmayan Freund's adjuvant ile karıştırılıp farelere verilmiştir. Daha sonra bu fareler *P. gingivalis* ile infekte edilmiştir. Atenüe *P. gingivalis* ile aşılanan hayvanların hiç birisinin diş plaklarında *P. gingivalis* kolonize olamamıştır. Aşılanan bu hayvanların serumlarında yüksek titrede özgül IgG_{2a} (44, 39 ve 27 kDa) tespit edilmiştir. Gingipainlere karşı oluşan bu özgül antikorlar atenüe bakteri aşısından daha etkili bulunmuştur.

Bir başka çalışmada bir gurup Macaca maymunu gingipain R ile, diğer bir gurup maymun ise bakteri hücresi kullanılarak cilt altından immunize edilmiş, daha sonra ağızlarına *P. gingivalis* inoküle edilmiştir. *P. gingivalis* hücresi ile aşılanan maymunların serumlarında bu bakteriye özgül IgG antikor seviyesi 36 kat, Gingipain R ile aşılanan maymunlarda ise 194 kat artmıştır.

Bu tür aşılarla en ciddi problem serumda oluşan IgG antikorların kalp sarkolemması ile çarpaz reaksiyona girip kalp romatizmasına sebep olma ihtimalidir. Halbuki tonsiller üzerine damlatılarak uygulanan diş çürüğü aşılı IgA tipi antikorlar oluşturmakta ve bu tehdit ortadan kalkmaktadır. Gelecekte periodontal hastalıklar için bir aşı geliştirilecekse bu, muhtemelen ağıza veya boğaza damlatma şeklinde uygulanacaktır.

Porphyromonas asaccharolytica:

Bu bakterinin eski ismi *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus*dur. 0.8-1.5 µm ile 1.0-3.5 µm büyüklüğünde olup kokoid zincirler oluşturur. Bilhassa sıvı besiyerinde biraz daha uzun zincirler oluşturmaya meğillidirler. Agardaki kolonileri 0.5-1.0 mm çapında, yuvarlak, konveks, opak ve parlak gri renklidir. 6-14 gün sonra siyah pigment oluşturur. %0.5 NaCl ilavesi üremesini artırır. Tavşan kanını hemolize edebilir. Hücre duvarında lizin bulunur, fakat diaminopimelik asit bulunmaz. Bu bakterinin dış membran ekstraktlarında 2 antijenik fraksiyon bulunur. Bunlardan yüksek molekül ağırlığına sahip olan birinci fraksiyon proteinler ve lipitler ihtiva eden polisakkarit bir komplekstir. Diğer fraksiyon ise lipopolisakkarit tabiatında kuvvetli bir antijendir. Bakterinin enzimlerinin fibrinolitik bir aktivitesi vardır. Şekerlerden pekçoğunu fermente edemez. Kapalı organ apselerinden, peritonit, apandisit ve derin abdominal yaralardan izole edilir. Bu bakterinin en yaygın rezervuarı infekte kök kanalı ve periodontitli bireylerin gingival sulkuslarıdır. Metronidazol (5 µg/ml), safra, kristal viyole (1:80.000), jansiyen moru (1:100.000), brilant yeşili (1:80.000) üremelerini inhibe eder. Çoğu suşları penicillin, cephalopirin, bacitracin, chlorotetracycline, chloramphenicol, erythromycin ve rifampicin'e duyarlı, kolistin ve kanamicin'e (MIC > 10-100 µg/ml) dirençlidir.

KAYNAKLAR:

1. Alan J. Moritz, Cappelli D, Marilyn S L, *et al.* Immunization With *Porphyromonas gingivalis* Cysteine Protease: Effects on Experimental Gingivitis and Ligature-Induced Periodontitis in Macaca fascicularis. *J Periodontol* 1998; 69: 686-697.
2. Aneta S, Maryta S, Jan P, *et al.* Degradation of Host Heme Proteins by Lysine- and Arginine-Specific Cysteine Proteinases (Gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(19): 5609-5616.
3. Asai Y, Ohyama Y, Gen K, *et al.* Bacterial Fimbriae and Their Peptides Activate Human Gingival Epithelial Cells through Toll-Like Receptor 2. *Infection and Immunity* 2001; 69(12):7387-7395.
4. Frank CG, Caroline AG. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-Induced Oral Bone Loss following Immunization with Gingipain R1. *Infection and Immunity* 2001; 69(12):7959-7963.
5. Greiner D. , Belanger M. Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. *Infection and Immunity* 1991;59(9):3004-3008.
6. Greiner D. Hemin-binding property of *Porphyromonas gingivalis* outer membranes. *FEMS Microbiology letters* 1991;77: 45-50.
7. Hakimuddin TS, Sharma A, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae Bind to Cytokeratin of Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 2002; 70(1): 96-101.
8. Imamura T, Matsushita K, Travis J, *et al.* Inhibition of Trypsin-Like Cysteine Proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by Tetracycline and Its Analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45(10): 2871-2876.
9. Jeanne SH, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, *et al.* Assessment of Internalization and Viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB Epithelial Cells by Confocal Microscopy. *Infection and Immunity* 2001 ;69(11): 7146-7151.
10. Katz J, Qiu-Bo Y, Zhang P, *et al.* Hydrolysis of Epithelial Junctional Proteins by *Porphyromonas gingivalis* Gingipains. *Infection and Immunity* 2002; 70(5): 2512-2518.
- Kurita-Ochiai T, Kuniyasu O, Suzuki N, *et al.* Human Gingival Fibroblasts Rescue Butyric Acid-Induced T-Cell Apoptosis. *Infection and Immunity* 2002; 70(5):2361-2367.
11. Loomer PM, Richard PE, Tenenbaum HC. Effects of *Porphyromonas gingivalis* 2561 Extracts on Osteogenic and Osteoclastic Cell Function in Co-Culture. *J Periodontol* 1998;69:1263-1270.
12. Mary K, Hamdy N., Hsin-Hua C, *et al.* Fimbria-Dependent Activation of Cell Adhesion Molecule Expression in *Porphyromonas gingivalis*-Infected Endothelial Cells. *Infection and Immunity* 2002; 70(1): 257-267.

13. Masuda K, Yoshioka M, Hinode D, *et al.* Purification and Characterization of Arginine Carboxypeptidase Produced by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* 2002; 70(4):1807-1815.
14. Nakagawa I, Atsuo A, Kuboniwa M, *et al.* Functional Differences among FimA Variants of *Porphyromonas gingivalis* and Their Effects on Adhesion to and Invasion of Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 2002; 70(1): 277-285.
15. O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Hoffmann B, *et al.* Role of RgpA, RgpB, and Kgp Proteinases in Virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a Murine Lesion Model. *Infection and Immunity* 2001; 69(12): 7527-7534.
16. Sunethra RP, O'Brien-Simpson NM, Slakeski N, *et al.* Immunization with the RgpA-Kgp Proteinase-Adhesin Complexes of *Porphyromonas gingivalis* Protects against Periodontal Bone Loss in the Rat Periodontitis Model. *Infection and Immunity*, 2002; 70(5): 2480-2486.
17. Shapira L, Ayalon S, Brenner T. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on the central nervous system: activation of glial cells and exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Periodontol.* 2002 May;73(5):511-6. doi: 10.1902/jop.2002.73.5.511. PMID: 12027253.
18. Zhang Z, Ma N, Zheng Y, Zhang L. Association of serum immunoglobulin-G to *Porphyromonas gingivalis* with acute cerebral infarction in the Chinese population. *J Indian Soc Periodontol.* 2015 Nov-Dec;19(6):628-32. doi: 10.4103/0972-124X.164750. PMID: 26941512; PMCID: PMC4753706.
19. Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim BO, Nares S, Iacopino AM. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol.* 1999 Dec;70(12):1429-34. doi: 10.1902/jop.1999.70.12.1429. PMID: 10632517.
20. Radhakrishnan P, Anbalagan R, Barani R, Mani M, Seshadri KG, Srikanth P. Sequencing of *Porphyromonas gingivalis* from saliva in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Microbiol.* 2019 Jan-Mar;37(1):54-59. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_18_409. PMID: 31424011.
21. Collins JG, Windley HW 3rd, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun.* 1994 Oct;62(10):4356-61. doi: 10.1128/IAI.62.10.4356-4361.1994. PMID: 7927695; PMCID: PMC303116.
22. Michelin MC, Teixeira SR, Ando-Sugimoto ES, Lucas SR, Mayer MP. *Porphyromonas gingivalis* infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. *Oral Dis.* 2012 Oct;18(7):648-54. doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01917.x. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22471815.
23. Ao M, Miyauchi M, Furusho H, Inubushi T, Kitagawa M, Nagasaki A, Sakamoto S, Kozai K, Takata T. Dental Infection of *Porphyromonas gingivalis* Induces Preterm Birth in Mice. *PLoS One.* 2015 Aug 31;10(8):e0137249. doi: 10.1371/journal.pone.0137249. PMID: 26322971; PMCID: PMC4556457.