

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI



**YEŞİL ÇAY EKSTRAKTLARININ YER TUTUCU
APAREYLERİNİ OLUŞTURAN MATERYALLER ÜZERİNDE
DENTAL BİYOFİLM OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Begüm GÖK ÇOBAN

DOKTORA TEZİ

I. DANIŞMAN

Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Merih KIVANÇ

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 3657-D2-13no'lu proje
kapsamında desteklenmiştir.**

**Tez No: 137
ISPARTA - 2016**

KABUL ve ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pedodonti Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/02/2016

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti AD, Isparta.

Tez II. Danışmanı : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.

Üye : Prof. Dr. Figen SEYMEN

İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti AD, İstanbul

Üye : Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜKEŞMEN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti AD, Isparta

Üye : Doç Dr. Hüseyin KARAYILMAZ

Akdeniz Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti AD, Antalya

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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 çalışmasıyla elde edilmeyen 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.

“Yeşil Çay Ekstraktlarının Yer Tutucu Apeylerini Oluşturan Materyaller Üzerinde Dental Biyofilm Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi ” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Begüm Gök Çoban

İmza

Danışman

Prof. Dr. Zuhale KIRZIOĞLU

İmza

ÖNSÖZ

Doktora eğitimime başladığım günden itibaren desteğini her an hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU'na

Tez inceleme kurulundaki yönlendirmeleriyle beraber deney aşamaları sırasında kilit noktalarda çözüm önerileri sunan, değerli bilgilerini benden esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a

Tezimin tüm aşamalarında değerli görüş ve fikirlerine başvurduğum Doktora Tez İzleme Komitesi Üyeleri Hocalarım; Doç. Dr. Çiğdem KÜÇÜKEŞMEN ve Doç. Dr. Hüseyin KARAYILMAZ'a

Tezimin tüm aşamalarında bana destek olan, Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyeleri, asistan ve personellerine,

Tez çalışmamızın, deney örneklerimizin taramalı elektron mikroskopunda görüntülenmesinde bize yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a

Deney aşamaları sırasında destekleyen Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı doktora ve yüksek lisans öğrencileri Gizem ARIK BERK, Hilal GENÇ ve Ayşe GÖKDAL'a,

İstatistiksel analiz ve değerlendirmelerin yapılmasında bilgilerini paylaşan, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Dr. Serkan ÖZKAYA'ya,

Tez projeme maddi destek sağlayan S.D.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Güleryüzlü personeli ile doktora öğrenimimi kolaylaştırmaya çalışan Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne,

Tez çalışmamızın deney aşamasında kullanmak üzere gerekli çay bitkisini Rize'den temin eden İkiçay ailesi ve Hakan AKTAŞ'a

Bilimin aydınlattığı yolda ilerlemeyi bana nasihat ederek, hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmemdeki en büyük emeğin sahipleri, başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Pozitif enerjisi ile hayatıma neşe saçan, doktora eğitimimin her döneminde desteğini bana hissettireneşim ERDEM ÇOBAN'a

Tüm kalbimle sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
GRAFİKLER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyofilm.....	3
2.1.1. Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri	4
2.1.2. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri	6
2.1.3. Biyofilm Oluşum Evreleri	8
2.1.4. Biyofilmde Çoğunluğu Algılama Mekanizmaları	10
2.2. Dental Biyofilm (Dental Plak)	12
2.2.1. Dental Biyofilmin Oluşum Evreleri.....	13
2.1.2. Dental Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	14
2.3. Biyofilm Görüntüleme Teknikleri.....	15
2.4. Çocuklarda Dental Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....	17
2.4.1. Yer Tutucular.....	17
2.5. Dental Biyofilmin Kaldırılmasında Antiplak ve Antimikrobiyal Ajanlar.....	19
2.5.1. Klorheksidin	20
2.6. Doğal Aromatik Bitkiler.....	21
2.6.1. Çay.....	22
2.6.2. Yeşil Çay	23
2.6.2.1. Yeşil Çayın İçeriği	23
2.6.2.2. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Etkileri.....	24

2.6.2.2.1. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri.....	24
2.6.2.2.1.1. Antioksidan Aktivite.....	24
2.6.2.2.1.2. Antikarsinojenik Etki.....	25
2.6.2.2.1.3. Kardiyovasküler Hastalıklara Etkisi.....	25
2.6.2.2.1.4. Obeziteye Karşı Etkisi.....	26
2.6.2.2.1.5. Antibakteriyel Etki.....	26
2.6.2.3. Yeşil Çayın Ağız Sağlığına Etkisi.....	28
2.6.2.3.1. Diş Çürüğü ve Oral Biyofilme Etkisi.....	28
2.6.2.3.2. Periodontal Problemlere ve Ağız Kokusuna Karşı Etkisi.....	31
2.6.2.4. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Etik İzin.....	35
3.2. İn Vitro Çalışma.....	35
3.2.1. Gereç.....	35
3.2.1.1. Çay Ekstraktları.....	35
3.2.1.2. Yer Tutucu Materyal Örnekleri.....	36
3.2.1.3. Araştırmada Kullanılan Bakteriler.....	39
3.2.1.4. Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasallar.....	39
3.2.2. Yöntem.....	43
3.2.2.1. Doğal Ağız Florasından Dental Biyofilm Bakterilerinin İzole Edilmesi.....	43
3.2.2.2. Örneklerin Besiyerlerine Ekimi ve İzolatların Safılaştırılarak Stoklanması.....	44
3.2.2.3. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Tanımlanması.....	45
3.2.2.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi.....	46
3.2.2.4.1. Kongo Kırmızılı Ortamda Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	46
3.2.2.4.2. Mikrotitrasyon Plaka Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	46
3.2.2.5. Kullanılacak Çay Ekstraktlarının Hazırlanması.....	48
3.2.2.6. Çay Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi.....	49

3.2.2.6.1. Çay Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.2.7. Çay Ekstraktlarının Bakterilerin Biyofilm Oluşturmalarına Etkisi....	49
3.2.2.7.1. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisi	49
3.2.2.7.1.1. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşturan Canlı Koloni Sayısının Belirlenmesi	52
3.2.2.7.1.2. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşumunun Spektrofotometre Kullanılarak Değerlendirilmesi.....	53
3.2.2.7.2. SEM için Aparatlarda Örnek Hazırlama ve Görüntü Alınması... 54	
3.3. İn Vivo Çalışma.....	55
3.3.1. Gereç ve Yöntem	55
3.4. İstatistik Analizleri	58
4. BULGULAR	59
4.1. İn Vitro Çalışma	59
4.1.1. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	59
4.1.2. Seçilen İzolatların Tanımlanması	60
4.1.3. Çay Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi.....	60
4.1.4. Çay Ekstraktlarının Test Bakterilerinin Biyofilm Oluşturmalarını Engellemesi.....	63
4.1.5. Çay Ekstraktlarının Yer Tutucu Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Etkisi	63
4.1.5.1. Akrilik Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular.....	64
4.1.5.2. Akrilik Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları	66
4.1.5.3. Metal Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular.....	69
4.1.5.4. Metal Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları	72
4.1.5.5. Fiber Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular.....	76
4.1.5.6. Fiber Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları	78

4.1.5.7. Kullanılan Yer Tutucu Materyalleri Üzerinde Biyofilm Oluşumunun Karşılaştırılması.....	82
4.2. İn Vivo Çalışma Bulguları	82
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	107
ÖZET.....	109
ABSTRACT	110
KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ.....	130
EKLER.....	131
Ek 1. Etik İzin.....	131
Ek 2. Hasta Onam Formları.....	134

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece santigrat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFM	: Atomik kuvvet mikroskopisi
AHL	: Açıl Homoserin Lakton
AIP	: Autoinducer Peptitler
AI-2	: Autoinducer-2
Al	: Alüminyum
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BHI	: Brain heart infüzyon sıvı besiyeri
b-laktamaz	: Beta-laktamaz
C. albicans	: Kandida albicans
Chx	: Klorheksidin glukonat
CPC	: Cetylpyridinium chloride
CRA	: Kongo kırmızılı agar
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallet
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallet
EPS	: Ekstraselüler polimerik madde
FISH	: Floresan antisera ve floresan in situ hibridizasyon
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GBI	: Diş eti kanama indeksi
gr	: Gram
HIV	: Human immunodeficiency virus
HPV	: Human papilloma virus
IL	: İnterlökin
kDa	: Kilodalton

kg	: Kilogram
KLTM	: Lazer taramalı konfokal mikroskopi
kob	: Koloni geliştiren birim
L	: Litre
log10	: Logaritma 10 tabanı
Ltd.	: Limited
MBC	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
mg	: miligram
MHA	: Muller-Hinton agar
MHB	: Muller-Hinton broth
MIC	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mol	: Molarite
MRS	: Man Rogasa Sharp agar
MS	: Mitis Salivarius agar
MSCRAMMS	: Mikrobiyal yüzey bileşeni tanıyan yapışkan matris molekülleri
PBP2	: Penicillin-Binding Protein 2
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDA	: Patates dekstroz agar
pH	: Asidite
P. intermedia	: Prevotella intermedia
P. gingivalis	: Pseudomonas gingivalis
PON1	: Paraokzonaz
Qs	: Quorum sensing
S. mutans	: Streptokokus mutans
S. sobrinus	: Streptokokus sobrinus
SEM	: Tarama elektron mikroskobu
TCC	: Tetrazolium klorid
TF	: Teaflavinlerin
TPA	: 12-otetradekanoil porbol-13-asetet
UV	: Ultraviyole

VSCS : Volatil sülfür bileşikleri
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Alkol serileri için gerekli alkol ve distile su miktarları.....	55
Tablo 2. Tez çalışmasında alkol serilerinin dehidratasyon işleminde kullanım oranları ve süreleri.....	55
Tablo 3. Bakterilerin farklı şekerlerin bulunduğu besi yerlerinde biyofilm oluşturma özellikleri	59
Tablo 4. Çay ekstraktlarının çalışmada kullanılan bakterilere karşı MIC ve MBC değerleri	62
Tablo 5. Akrilik materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi	66
Tablo 6. Metal materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi	72
Tablo 7. Fiber materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi.	78
Tablo 8. Kullanılan yer tutucu materyalleri üzerinde biyofilm oluşumu	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm oluşumunun CRA plakta ve mikrotitrasyon plakta görünüşü	60
Şekil 2. İzolatlara ait riboprinter sisteminden elde edilen bant profilleri ile dört türe ait standart bant profilleri.....	60
Şekil 3. MIC değerlerinin mikrotitrasyon plağında belirlenmesi	61
Şekil 4a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b. Yeşil çay metanol ekstraktı	67
Şekil 4b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su ekstraktı d. Kuru çay metanol ekstraktı	68
Şekil 4c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin.....	69
Şekil 5a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b. Yeşil çay metanol ekstraktı	73
Şekil 5b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su ekstraktı d. Kuru çay metanol ekstraktı	74
Şekil 5c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin.....	75
Şekil 6a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b. Yeşil çay metanol ekstraktı	79
Şekil 6b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su d. Kuru çay metanol ekstraktı	80
Şekil 6c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin.....	81

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kurutulmuş çay yaprakları	36
Resim 2. Kuru çay yaprakları ve yeşil çaydan elde edilen metanol, hekzan ve steril saf su ekstraktları	36
Resim 3. Çelik tel	37
Resim 4. a) Çelik Tel b) Molar Band+ Çelik Tel c) Akrilik +Çelik Tel d) Akrilik e) Kompozitle Doyurulmuş Cam Fiber.....	38
Resim 5. a) Karbon separe b) Metal lastik frez c) Canavar frez.....	38
Resim 6. Sıvı besiyeri ve katı besi yerinde bakteri üremesi	45
Resim 7. VİTEC II cihazı	45
Resim 8. Spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC)	47
Resim 9. 96 Kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak bakterilerin farklı şekerlerin bulunduğu besi yerlerinde biyofilm oluşumlarının belirlenmesi	48
Resim 10. Santrifüj cihazı.....	50
Resim 11. Falcon tüpü içerisinde steril tükürük ve yer tutucu aparey materyallerinin etüvde beklemesi	51
Resim 12. Tükürük ile kaplanmış yer tutucu apareyleri üzerine çay ekstraktlarının eklenmesi	51
Resim 13. Yer tutucu örneklerinin PBS ile 3 kez yıkanması ve ependorflara alınması	52
Resim 14. Ependorflarda hazırlanan seri dilatasyonlar ve damla ekim işlemi.....	53
Resim 15. Ependorflara kristal viyole eklenmesi	53
Resim 16. %33'lük glassiyel asit bulunan ependorflardan alına örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarılması	54
Resim 17. Hazırlanan ağız içi aparey	57

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Çay ekstraktlarının test bakterilerinin biyofilm oluşturmalarına etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi.....	63
Grafik 2. Yer tutucu oluşturan akrilik materyaller üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayılarının (log10 kob/ml) karşılaştırılması	64
Grafik 3. Yer tutucu oluşturan akrilik materyaller üzerinde, biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi.....	65
Grafik 4. Yer tutucu oluşturan metal materyaller üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakterisayılarının (log10 kob/ml) karşılaştırılması	70
Grafik 5. Yer tutucu oluşturan metal materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi.....	71
Grafik 6. Yer tutucu oluşturan fiber örnekler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakterisayılarının (log10 kob/ml) karşılaştırılması	76
Grafik 7. Yer tutucu oluşturan fiber materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi.....	77

1. GİRİŞ

Dental plağın kompozisyonunu, fizokimyasal yapısını ve bakteriyel ilişkilerini kapsayan diş çürüğü oluşumu, araştırmacılar tarafından her zaman ilgi çekici olmuştur. Fakat günümüzde halen tam olarak açıklanamayan noktaları bulunmaktadır. Günümüz teknolojisinde görülen gelişmeler sonucunda, dental plağın, dental biyofilm olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (1).

Dental biyofilm, diş çürüğü, gingivitis gibi birçok hastalığın kaynağını oluşturmaktadır ve yüzeye yapışmasını engelleyen kuvvetlerin en az olduğu alanlara tutunmaktadır (2). Dental biyofilm oluşumu, hem yüzey özelliklerine hem de ağız ortamına açılan yüzey miktarına bağlıdır (3).

Süt dişlerinin düşmesi ve daimi dişlerin sürmesi normal fizyolojik bir olaydır. Diş çürüğü gibi nedenlerden dolayı süt dişlerinin erken kaybedilmesi gibi dengeyi bozan durumlar gelişirse, daimi dişlenmede çapraşıklık, ektopik erüpsiyon ve orta hat kayması gibi problemler görülebilir. Yer tutucuların kullanılması ile bu sorunlar önlenebilir ancak, bu apareyler yüzey alanını arttırdıkları ve yüzey özelliklerini değiştirdikleri için dental biyofilm oluşumunu da arttırmaktadırlar (4).

Biyofilm oluşumunu önlemek ya da sınırlamak için mekanik temizliğin yanısıra geliştirilen gargara, sakız, diş macunu, jel, diş ipi gibi farklı formlarda topikal ve sistemik antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlardan en güvenilir ve etkili olanı gargara formudur ve biyofilm oluşumunun engellenmesinde önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (5).

Diş hekimliğinde flor, klorheksidin(Chx), triklosan, setilpiridinyum klorid(CPC), ksilitol gibi antimikrobiyal ajanlar oral hijyenin sağlanmasında kullanılmaktadır (6). Tüm antimikrobiyal ajanlar arasında klinik olarak plak kontrolü açısından epital doku ve mukozal membrana kuvvetli bir tutulumu sahip Chx, 20 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Chx uzun etki süresi sayesinde tükürükteki mikroorganizma sayısını %90 oranında düşürmektedir. Fakat ağız dokularını boyama, tat kaybı, diş taşı oluşumu, tek taraflı veya çift taraflı parotis bezi şişmesi,

mukozaal ülserasyonlar, uzun dönemde oral florada değişim gibi bazı yan etkileri bulunmaktadır (7).

Biyofilmin ortadan kaldırılması için yetişkin hastalarda kullanılan kimyasal ajanların toksik etkilerinin olması çocuk hastalarda kullanımı sınırlandırmaktadır. Günümüzde koruyucu hekimlik ve farklı hastalıkların tedavisi için bitkisel ürünleri kullanarak doğaya yönelen insan sayısı artmaktadır. Zencefil, adaçayı, çörek otu, zerdeçal, sarımsak, yeşil çay ve siyah çayın da içerisinde bulunduğu bitkisel ürünlerin dörtte biri ağız sağlığında kullanılmaktadır (8, 9). Yeşil çay, aktif kimyasal içeriği ile antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antioksidan ve antibakteriyel gibi farklı farmakolojik özellikler göstermektedir (10).

Yeşil çay içerisinde bulunan biyoaktif komponentler olan polifenoller, oral patojenlere karşı bakterisidal ve bakteriyostatik etki göstermektedirler. Streptokokal ajanın poliferasyonunu inhibe edebilirler, diş minesinin yapışma sürecini etkileyebilirler ya da glikozil transferaz ve amilaz inhibitörleri olarak etki edebilirler (11). Bitkisel ürünlerin oral biyofilme olan etkilerinin incelendiği çalışmalar sıklıkla yetişkin bireyleri içermektedir.

Çocuk hastalarda (özellikle yer tutucu kullanan çocuk hastalarda) bitki ekstraktlarının kullanımına ait çalışma sayısı sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı; yer tutucu kullanan çocuk hastalarda, günlük oral hijyene destek olacak dental biyofilmin kaldırılmasında bitkisel bir ürün olan yeşil çayın etkisinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm

Film sözcüğü, yüzeyi kaplayan ince bir tabakayı; biyofilm ise bu tabakayı oluşturan maddenin biyolojik bir materyal olduğunu tanımlamaktadır. Mikrobiyal biyofilm ise yüzeye yapışan biyolojik materyalin mikrobiyal topluluk olduğu anlamına gelmektedir (12). Bu mikrobiyal topluluk sadece komşu mikroorganizmaları içermemektedir. Aynı zamanda, biyofilm yapısına katılan mikroorganizmalar arasında fiziksel, metabolik ve moleküler anlamda bir iletişim de söz konusudur. Biyofilm, yapısına katılan mikroorganizmalara birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlar arasında, ortam şartlarına uyum sağlama, antimikrobiyal ilaçlara ve konağa karşı direnç kazanma sayılabilir. Ayrıca biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmalar arasında genetik materyal alışverişi yapıldığını da gösteren kanıtlar vardır (13).

Biyofilmin oluşum sistemi ve yapısı hakkında uzun yıllar farklı görüşler ortaya atılmıştır. Deniz mikrobiyoloğu olan Claude Zobell (14) tarafından tarif edilen şişe etkisi 'bottle effect' tanımından sonra mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmek için bir yüzeye ihtiyaçları olduğu farkına varılmıştır. Costerton ve arkadaşları (15), biyofilmlerin ilk olarak 17. yüzyılda Leeuwenhoek tarafından tanımlandığını söylemiş, o dönemde dışının üzerindeki plaktan aldığı örneği inceleyen ve mikroskop altında mikrobiyal kümelerin varlığını izleyen Leeuwenhoek'un, baktığı şeyin biyofilm olduğunun farkında olmadığını bildirmiştir. Bu yapının biyofilm olduğu hakkındaki genel teori asıl olarak 1970'li yıllarda, bakterilerin multisellüler davranış sergilediklerinin anlaşılması ile netlik kazanmıştır (16). Costerton ve arkadaşları (15), akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin %99'unun bir yüzeye yapışarak glikokaliks matriks içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuş, bu toplulukları tanımlamak amacıyla da ilk defa 'biyofilm' terimini kullanmışlardır. Yine aynı araştırmacılar, biyofilmlerin yüksek oranda sulu (hidrate) anyonik ekzopolimer matriks içinde bulunan mikrokoloniler olduğunu belirtmişlerdir. Marsh ve arkadaşları (17) biyofilm tanımına farklı bir bakış açısından yaklaşmışlar ve biyofilm oluşumunda zamanın, ortamın ve yapısında

bulunan organik ve inorganik içeriğin üzerinde çalışmışlardır. Watnick ve Kolter (13), biyofilmi cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin, salgıladıkları müköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan mikroplar şehri olarak tanımlamışlardır. Costerton ve arkadaşları (18) ise biyofilm oluşumunun aşamalarının belirli bir düzen içinde olduğunu, ilk bakteri yapışmasının ardından biyofilm oluşumu ile ilgili gen transkripsiyonunun başladığını belirtmişlerdir.

Biyofilm, günümüzde halen geçerli ve kapsamlı olarak mikroorganizmaların geri dönüşümsüz bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü olan, büyüme hızları ve genlerinin kopyalanması açısından, serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıkları olan mikroorganizmalarda oluşan, hareketsiz bir topluluk olarak tanımlanmıştır (19).

2.1.1. Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer alır (19). Dış hekimliğinde ise biyofilmler ağız mukozası, mine ve sement yüzeyinde (biyotik yüzeyler) ve kullanılan cihazların hava-su borularının iç yüzeylerinde oluşmaktadır (20).

Biyofilm matriksinin içerisinde, hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (21). Biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığı, belirli bir yapıya ve koordinasyon yeteneğine sahip fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğu ortaya konmuştur (22).

Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere, esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkân tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler. Tam hidrate ve canlı biyofilmin % 15'i hücre, %85'i matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği

farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' veya 'mantarlar' içerisinde buldukları anlaşılmıştır (15).

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmamaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilmektedir (23). Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde, her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. Bu kanallardan geçen besinler difüzyon yoluyla hücrelere geçerler. Biyofilm ve koloniler içerisinde sıvının geçişine bağlı olarak farklı şekillerde oluşmaktadırlar. Sıvıların kesme kuvveti yüksek bir basınç oluşturursa uzatılmış şekilde; kuvvet düşük bir basınç oluşturursa mantar veya kule şeklinde mikroorganizma kümeleri oluşmaktadır (24). Her biyofilmin yapısı diğer biyofilmlerle ortak özellikleri olmasına rağmen kendine özgüdür (25). Bazı araştırmacılar biyofilmin devamlılık gösteren tek bir tabakadan oluşmadığını düşünerek isminin yanlış verildiğini savunmuşlar ve biyofilmin daha çok mikrokolonilerden oluşan bir yapı olduğunu bildirmişlerdir (26, 27).

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler, biyofilmin bel kemiğini oluşturmaktadır. Kuru içeriğinde protein, tuz ve hücre materyali bulunmaktadır. Biyofilmin major komponentidir ve kuru ağırlığının %50-95'ini oluşturmaktadır (28). En önemli görevi, biyofilmin bütünlüğünü sağlamaktır. Hücreler farklı özelliklerde polisakkaritler üretmektedirler, bunlar hücrelerin fizyolojik özelliklerine ve buldukları yüzey özelliğine göre değişmektedir. Hücreler tarafından üretilen polisakkaritler; intrasellüler polisakkarit (depo), ekstrasellüler polisakkarit (EPS) ve yapısal formdaki polisakkarit olmak üzere 3 ayrı formdadır. Bunlar, biyofilm yapısının ana ekstrasellüler komponentini oluştururlar. EPS formları, hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır ve genellikle immünojenik özellik taşımaktadırlar. Kapsüller EPS, bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik; gram pozitif

bakterilerin ise katyonik matriksler oluşturdukları bilinmektedir (29). Farklı iyon yükü ve EPS konsantrasyonu, matriksin üç boyutlu jel yapısında ani değişikliklere neden olur. Mikroelektronlar biyofilm içinde asidite (pH) değişimleri olduğunu göstermektedirler (30). Bu değişim, biyofilmin farklı bölgelerinde farklı metal iyonlarının yer almasından kaynaklanmaktadır (31). EPS'nin kimyasal ve üçüncül yapısı, etkili yapışmasını belirlemektedir. Ayrıca yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik olmasını da etkileyecektir. EPS'ler, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde kaplayarak olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadırlar (32). EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere ve deterjanlara karşı da fiziksel bir koruyuculuk şeklinde ortaya çıkmaktadır. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler, fagositoz hücrelerin ürettiği oksitleyici iyonlara karşı süperoksit dismutaz, antibiyotik ve katalazlara karşı beta-laktamaz enzimi üretebilmektedirler. Bu enzimler, matriks içine salınmakta ve geçilmez bir savunma oluşturmaktadırlar. Ayrıca biyofilm oluşturan bakteri hücreleri, elastaz ve sellüloz üreterek doku hasarı oluşturabilirler (33). Yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli, koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (29). Jel formasyonu, flokülasyon, emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pek çok role sahip olan EPS'ler, biyofilm bakterilerinin varlığını sürdürülebilmesinden başka genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişimi için gerekli ortamın hazırlanmasında da çok büyük öneme sahiptirler (34).

2.1.2. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri

Canlıların hayatlarını devam ettirmekteki en önemli itici güç, üreme içgüdüsüdür. Canlıların çoğalmasını sağlayan ve arttıran her türlü eylem kabul edilebilir boyuttadır. Plaktonik bakteri ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan bakterilerde üreme miktarında artma görülmektedir (35). Biyofilm yapısı; bakteriler için daha geniş bir yaşama aralığı, daha iyi çalışan bir metabolizma, stres ve antimikrobiyallere karşı direncin sağlamaktadır. Bakterilerin kümeler halinde ve EPS matriks içerisinde bulunmaları, fagosite edilmelerini güçleştirir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmalarını engeller (34). Tüm sayılan bu nedenlerden dolayı planktonik bakteri ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşturan bakterilerde ciddi farklılıklar gözlenmektedir. Bakterinin biyofilm oluşturması ile

ilgili yapılan çalışmalar ışığında biyofilm oluşum nedenleri şu başlıklar altında açıklanmıştır:

- **Savunma (strese karşı biyofilm oluşumu):**

Biyofilme sahip organizmalar; besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotikler gibi etkenlere karşı planktonik hücrelerden çok daha dirençlidirler. Biyofilm etrafında bulunan ekstrapolisakkarit matriks, biyofilm içerisine çeşitli ajanların girişini engellemektedir. Bu matriks; tükürüğün yıkama, kan akımı ile kaldırılma gibi fiziksel etkilere karşı mikroorganizmaları koruduğu gibi fagositoza karşı da direnç göstermektedir (35-37).

- **Adezyon ve kolonizasyon:**

İnsan vücudu bakterilerin yaşamlarını açısından zengin, sıcaklık ve su açısından da denge durumundadır. Bu nedenle, konak cevap ve bakterilerin stratejileri arasında hiç bitmeyen bir yarış vardır. Bakterilerin biyofilm oluşturabilmelerindeki ilk kural ise yaşamlarını devam ettirebilecekleri uygun ortamda stabil kalmalarıdır (38). Bakterilerin insan vücudunda stabil kalmaları için bir dizi stratejileri vardır. Bakteriler yüzeylere bağlanmak için fibronektin, fibrinojen, vitronektin ve elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri bulundurur ve bunlar mikrobiyal yüzey bileşeni tanıyan yapışkan matris molekülleri (MSCRAMMS) olarak tanınır ve sıklıkla bakterilerin konak yüzeye yapışması için anahtar rol oynarlar. Yapışma sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler, bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlamaktadırlar (39). Biyofilm, bakterinin yapışmasını arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte yapışma ve hareket faktörlerinin salgılanmasında da bir baskılama olmaktadır. Bu durum adezinlerin asıl rolünün başlangıçta yüzeye tutunma olduğunu ve biyofilm gelişme evresine geldiğinde ise bu proteinlere uzun süre ihtiyacı olmadığını ve ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (34).

- **Yaşanabilir çevre geliştirmek:**

Ortamda kullanılabilir formda şekerin bulunması, bakterilerin EPS salgılaması ve biyofilm oluşumunu belirgin bir şekilde arttırmaktadır. Ortamda bulunan besin maddeleri, konakçıda yapışmış halde olan bakterilerin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda önemli bir rol üstlenmektedirler. Bu durum bakterilerin konakçıda uygun bir ortam oluşturmak için biyofilme ihtiyaçları olduğunu kanıtlamaktadır (39).

- **Topluluk oluşturmak:**

Bakterilerin ortama adaptasyonu sırasında toplu halde hareket etmeleri biyofilm oluşumunda sıklıkla görülmektedir. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu halde yaşamlarının en önemli göstergesidir (40).

- **Yeni genetik özelliklerin kazanılması:**

Horizontal gen transferi, doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında büyük rol oynar (34). Yapılan genom ve proteom çalışmaları, biyofilm gelişimi ile ilgili birçok genin bulunmasına neden olmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adezyon, 'quorum sensing' (QS, çoğunluğu algılama), hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Biyofilm oluşukça mikroçevredeki değişiklikler, gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır (41).

2.1.3. Biyofilm Oluşum Evreleri

Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir. Bu tutunma sonucunda biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Ana hatları ile biyofilm oluşumu, 5 evrede gerçekleşir:

- **Tutunma ve yapışma:**

Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler, bu çevresel uyarınları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptirler (42). Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, QS sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtla bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama 'Ben buradayım' mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (43). İkinci basamak ise bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir (21).

- **Kolonizasyon:**

Üçüncü evrede ise bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler. Büyüme hızı ve gen kopyalanması açısından değişime uğramış fenotiplerin ortaya çıkışıyla birlikte hızlı büyüme evresi başlamaktadır. Bu dönemde mikroorganizmalar, hücre dışı polimerik maddenin ana bileşenini oluşturan EPS salgırlar. EPS genel olarak, doğal şeker, amino şeker ve bazı üronik asitlerin oluşturduğu heterojen bir yapı sergiler. Nemli ve yapışkan yapıdaki EPS, organizmaların yüzeye bağlanmalarını ve dış etkenler sonucu oluşabilecek koparma kuvvetlerine karşı direnç kazanmalarını sağlar. Serbest haldeki diğer organizmalar, moleküller arası etkileşim ile yüzeye tutunabildikleri gibi, matrikse de takılarak yüzeye tutunabilirler. Bu tutunmalar sonucu bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük birimi olan mikrokolonileri oluştururlar (44).

- **Olgunlaşma:**

Dördüncü evrede ise mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (44).

- **Kopma:**

Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya birçok hücrenin kopmasının bir sonucu olarak gerçekleşebilir (25).

2.1.4. Biyofilmde Yoğunluğu Algılama Mekanizmaları

Biyofilmin fonksiyonlarını yerine getirmesi, içerisinde bulunan bakterilerin ve mikrokolonilerin iletişim yeteneğine bağlıdır. Biyofilm içerisinde bakterilerin iletişim sistemleri olan QS iletişim mekanizması ile ilgili ilk fikirler, Cooper ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (45). Bakterilerin hayatlarını devam ettirmek için böyle bir düzenleyici sisteme sahip olmaları şartı değildir. Bakteriler kendi defans sistemlerini geliştirmek ve virülans faktörlerini üretmek için kendi aralarında sinyal koordinasyonuna sahiptirler. Bu koordinasyonda mikroorganizmalar, sinyal moleküllerini üretmekle birlikte, bu moleküllerin konsantrasyonunu ölçerek çevrelerindeki mikrobiyal topluluğun miktarı hakkında bilgi sahibi olmaktadır. (46).

Bakterilerde bulunan QS mekanizması, iletişim moleküllerinin birikmesi sonucunda bazı gen ekspresyonunun düzenlenmesini içermektedir. Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılmaktadır (47). Hücre sayısı artıka üretilen sinyal molekülü oranı da artmaktadır. Bu moleküller

belirli bir seviyeye ulaştığı zaman gen ekspresyonunu tetiklemektedir (48). Birçok bakteriyel davranış, QS mekanizmasıyla kontrol edilmektedir. Antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, önemli virülans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu, bu davranışlardan bazılarıdır. Bakteriler, biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan iletişim sinyalleri aracılığı ile kontrol etmektedirler (46). Biyofilm oluşum sürecinde QS molekülleri, adezyonda, mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadırlar (47). Bakteriler iletişim sinyali olarak çeşitli kimyasal mekanizmaları kullanmaktadırlar. Farklı mikroorganizma türleri de genellikle farklı QS moleküllerini kullanmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar birbirleri ile anlaşamamaktadır (21). Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır, dolayısıyla farklı QS moleküllerinin doğurduğu yanıtlar da farklı olmaktadır. Bununla birlikte, farklı türler arasında QS molekülleri aracılığı ile iletişim kurulabildiği de bilinmektedir. Bu tarz çapraz iletişim, özellikle birden çok türden oluşan mikroorganizma topluluklarının bir arada olduğu biyofilmlerde önemlidir (44). İletişimde görevli bu sinyal molekülleri; Oligopeptitler, Açıl Homoserin Lakton (AHL), Autoinducer-2 (AI-2), Hidroksily palmitik asit metil ester ve Metil dodesanoik asittir.

Bu moleküller arasında en sık kullanılan 3 tip sinyal molekülü; AHL, AI-2 ve Autoinducer Peptitler (AIP) olarak belirtilmiştir (49).

- **AHL:**

Bu tip QS iletişimi, 700'den fazla gram negatif bakteride görülmektedir. Bakteriler tarafından sentezlenen bu küçük sinyal molekülleri, bakteri hücrelerinden diffüze olur ve bakteri sayısındaki artışa paralel olarak ortamda birikmeye başlarlar. Hücre yoğunluğu eşik değere ulaştığında ortamda birikmiş olan moleküller reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu tetiklerler(37).

- **AI-2:**

Bu sinyal molekülü gram pozitif ve gram negatif bakterilerce üretilmektedir. Çoklu tür biyofilmler arasındaki iletişimin AI-2 sinyalleri aracılığı ile düzenlendiği bilinmektedir (49). Araştırmacılar, farklı bakteriler arasındaki iletişimin ve biyofilm oluşumunun AI-2 sinyalleri tarafından yönetildiğini göstermiştir (50, 51).

- **AIP:**

Özellikle gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve AIP olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. Gram pozitif bakteriler bu sinyal molekülleri ile haberleşmektedirler. Bakteriler arası iletişim AIP'nin eşik değere ulaşması ile sağlanmaktadır (51). Bakteri kendinden güçlü ve daha yetenekli bakterinin DNA'sını alarak kendi DNA'sını değiştirir. Bu durum bakterinin evrimsel gelişimi için gerekli bir durumdur (52). Bu özelliklerin dışında AIP, biyofilm oluşumunu da kontrol etmektedir. AIP miktarı yeterli düzeyde olmayan bakterilerde biyofilm oluşum özelliklerinin azaldığı görülmüştür (53).

2.2. Dental Biyofilm (Dental Plak)

Yapılan çalışmalar sonucunda dental biyofilm ile ilgili sağlam temeller atılmıştır (54,55). Dental plağın (özellikle subgingival) %50'sinin hücrelerden oluştuğu ve 700'den fazla mikroorganizma izole edilebildiği belirlenmiş ancak bunların çoğu kültür ortamında üretilmemiştir (56). Tarama elektron mikroskobu (SEM) ile incelenen supragingival plakta (diğer bölgelerde bulunan biyofilmler gibi) dış yüzeye kanallarla açıldığı görülmüş, bu durum lazer taramalı konfokal mikroskobu (KLTM) ile doğrulanmıştır (57). Canlı/ölü bakteri renklenmesi ile biyofilm boyunca (dental plak) bakterilerin canlılık özelliklerinin değişebileceği gösterilmiştir (58).

Dental biyofilm, yüzeye yapışmasını engelleyen kuvvetlerin en az olduğu alanlara tutunmaktadır. Ağız içerisinde en fazla tür içeren kısmı ise dişlerin üzerinde bulunmaktadır (2). Dental biyofilmdeki mikrobiyal kompozisyon, dişin farklı

bölgelerinde farklı şekilde oluşmakta ve bu farklılık anatomik ve biyolojik farklılığı yansıtmaktadır (59). Fissürlerde bulunan normal mikrofloranın, seyrek ve sakkarolitik (şeker parçalayan) metabolizmaya sahip olduğu ve baskın mikroorganizma türünün, streptokoklar ve az sayıda gram veya anaerobik, proteolitik bakterilerden oluştuğu bildirilmiştir. Ara yüzeylede ise bakteri türlerinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir (60).

2.2.1. Dental Biyofilmin Oluşum Evreleri

Dental biyofilmin gelişim evreleri; ülkelere, beslenme alışkanlıklarına, yaşa, konak savunma mekanizmasındaki eksikliklere ve çeşitli tedavilere bağlı olarak, ağız içinde yer alan farklı alanların farklı fiziksel ve biyolojik özelliklerinden dolayı farklılık göstermektedir. Bu farklı koşullara bağlı olarak plağın içeriğinin değişimi, dental biyofilmin kaldırılmasında kullanılan yöntemler açısından önem kazanmıştır (61).

Dental biyofilm spesifik bir şekilde gelişmektedir (62). Diş sürdükten sonra veya temizlendikten sonra biyolojik olarak aktif protein ve glikoprotein içeren bir film tabakası olan pelikül ile kaplanır, bu tabaka asıl olarak tükürük, diş eti oluşu sıvısı ve bakterilerden oluşmaktadır. Başlangıçta, çok az sayıda bakteri bu tabakada tutunmuş olup ‘sonradan kazanılan pelikül’ olarak adlandırılır. Bu doğrudan başlangıç mikrobiyal kolonizasyonu etkilemektedir. Bu hücreler, yüzeye tekrar kopabilecek şekilde zayıf fizikokimyasal şekilde bağlanmaktadır. Bu erken bakteri kolonizasyonunda bulunan, çoğunlukla streptokoklar, bağlantılarını geri dönüşümsüz hale getirebilmek için pelikül üzerinde bulunan reseptörlere adezin moleküllerini bağlanmaktadır ve çoğalmaya başlarlar. Bu öncü türlerin metabolizmaları ortama göre uyum sağlamaktadır (62).

Biyofilm geliştikçe daha hassas olan ikinci grup bakteriler üzerindeki adezinler zorunlu anaerob olan bakterilerdeki reseptörlere bağlanmaktadır. Böylece koadezyon ve koagregasyon ile biyofilm daha çeşitli hale gelir. Birbirine yapışan bakterilerin, plak matriksi olan EPS üretmesi bağlantıyı artırmaktadır. Plak

adı verilen zirveye ulaşmış olan biyofilm topluluğu, eğer zarara uğramazsa, 2-3 hafta içerisinde gelişmekte ve 50-100 mikrometre (μm) kalınlığa ulaşmaktadır (19).

Dental biyofilm gelişimi; pelikül oluşumu, bakterilerin yapışması (0-4 saat), yapışan bakterilerin gelişimi (4-24 saat), mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişimine öncülük etmesi (1-14 gün), olgun biyofilm (2 hafta ve sonrası) evrelerinden oluşmaktadır (63).

In vitro koşullarda bakterilerin yüzeye tutunması ve hızlı gelişimleri ilk 12 ve 20. saatlerde oluşurken, in vivo ortamda bu süreç 18-48 saatlik sürede gerçekleşmektedir (64). Planktonik ortamdaki besinlerin genç biyofilm oluşumuna etkisi, olgun biyofilme göre daha belirgindir (65). Biyofilm oluşumunun erken aşamaları, olgun biyofilme karşılaştırıldığında, daha hızlı bölünebilen ekstrasellüler matriksi az olan hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir (18). Genç biyofilmin, olgun biyofilme göre ortam koşullarından daha çok etkilenebileceği ve olgun biyofilmin, genç biyofilme göre zor ortam koşullarına daha dirençli olduğu ve kendine özgü ortam oluşturduğu bildirilmektedir (64). Yapışmış hücrelerden cansız olanlar da ortamda besin yoksa ve koşullar uygunsa biyofilm gelişimi için kaynak oluştururlar. Besinler, olgun biyofilm ortamında da değişikliklere (pH değişikliği gibi) neden olabilir (66). Bu nedenle olgun biyofilme canlı kalabilmek ya da ortam değişikliklerine uyum sağlayabilmek, biyofilm hücreleri için önemlidir. Olgun biyofilm içindeki hücreler genellikle ekstrasellüler matriks içinde bulunmaktadır (64). Bu matriks, biyofilmin yüzey üzerinde stabil şekilde kalmasını ve biyofilm hücreleri için gerekli desteği sağlar. Mikrobiyal hücrelerden salgılanan EPS hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir. Farklı organizmalar tarafından farklı miktarlarda EPS'nin üretildiği ve biyofilmin yapısına bağlı olarak miktarının arttığı belirtilmiştir (18).

2.1.2. Dental Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Biyofilm oluşumunda, dişin yüzey enerjisinin de önemli olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak pürüzlü yüzeylerin yüzey enerjisinin fazla olması nedeniyle biyofilm oluşumuna daha yatkın olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, ağız

içindeki bakterilerin birçoğunun hidrofobik yüzey özelliklerine sahip olması, hidrofobik maddelerin biyofilm oluşumunu arttırdığını göstermektedir (67). Ağız içerisinde tükürük ile kaplanan yüzeylerde, tükürük proteinlerinin bakterinin cinsine göre yapışmayı kolaylaştırabileceği ya da engelleyebileceği bildirilmiştir (68).

Dental biyofilmin oluşumunu, beslenmenin doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği belirlenmiştir. Alınan bir besin, ortamdaki bir veya birden çok bakteri için önemli bir enerji, nitrojen ya da karbon kaynağı olabilmektedir. Ayrıca bir mikroorganizmanın besini metabolize etmesi sonucu oluşan ürünler başka bir mikroorganizma için besin kaynağı olabilmektedir. Dolaylı olarak ise, beslenme ile alınan bir maddenin bakteriler tarafından metabolize edilmesiyle ortaya çıkan ürünler, ortamı yerleşmiş bakterilerin lehine çevirebilmekte veya biyofilm hücreleri tarafından spesifik polimerlerin sentezi için gerekli substratı sağlayabilmektedir (64).

2.3. Biyofilm Görüntüleme Teknikleri

İnsan gözünün 250 milimetre (mm)'den daha büyük yapıları görebilme yeteneğine sahip olması nedeniyle, 1 mm'den daha küçük olan bakterileri görüntülemek için mercekler yardımı ile görüntüyü büyütecek bazı araçlara ihtiyaç duyulur. Bu amaçla, SEM, KLTM, Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), çeşitli mikro sensörler, optik uyumlu tomografiler kullanılan araçlar arasındadır (69).

Işık mikroskopları, bakterilerin sayılması amacı ile kullanılmaktadır (70). Bu yöntemle doğrudan in vitro örnekler incelenebildiği gibi, biyofilmleri içeren histolojik kesitler de incelenebilmektedir ancak ışık mikroskobu ile incelenecek örnekler saydam olmalıdır. Bu nedenle, biyofilmler hücre yoğunluğundan dolayı bu yöntem ile detaylı olarak incelenemezler (70). Elektronun dalga boyunun, ışığa göre birkaç bin defa daha küçük olması sebebi ile elektron mikroskobunda daha ayrıntılı görüntüler elde etmek mümkündür. Bugüne kadar mikrobiyal biyofilmlerin yapısal özelliklerini görüntülemeye yönelik yapılan çalışmalarda en çok kullanılan yöntem, SEM'dir. Işık mikroskobuna oranla geleneksel SEM kullanılarak 400 kat daha yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilebilir. SEM hücre dışındaki bileşenlerin ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlayarak hücre dışının üç boyutlu

görüntülenmesinde etkilidir (71). Ancak, elektron mikroskopisinin en önemli dezavantajı, örneklerin tamamının tek seferde incelenemiyor olması ve fiksasyon, dehidratasyon, kurutma ve kaplama aşamalarında 3 boyutlu yapısının zarar görmesidir (72).

KLMS, floresans esasına dayanan, incelenecek alanın floresans boyalar ile boyandıktan sonra lazer ile tarandığı bir inceleme metodudur. Biyofilmin 50-200 µm kalınlıktaki yapısını bile görüntüleyebilen bu yöntem arka planın karmaşık olduğu, konum belirleme çalışmalarında da kullanılabilir (73). KLTM, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların karakteristik özelliklerinin kendi doğal ortamlarında incelenmesine olanak sağlamak ve SEM’de karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerin oluşmasını engellemektedir (74). Netuschil ve arkadaşları (75), daha önceleri kullanılan tekniklere ek olarak biyofilm araştırmalarında, floresan boyama tekniğini de ortaya çıkarmıştır. KLTM ve floresan tekniğinin birlikte kullanılması, biyofilm yapısının daha net anlaşılmasına bunun dışında farklı biyofilm toplulukları içerisindeki cansız ya da canlı bakterilerin ortamdaki dağılımlarının ortaya çıkarılmasına olanak sağlamaktadır. Bu teknik; biyofilm içerisindeki farklı bakteri türlerince oluşturulan krater tarzındaki çok tabakalı mikro koloni görüntüleri hakkında geleneksel elektron mikroskobuna ilave olabilecek bilgiler sunmaktadır. Ayrıca bu teknik ile biyofilm yapısı in-vitro koşullarda da rahatlıkla incelenebilmektedir. Dige ve arkadaşları (74), KLTM ve floresan ile yaptıkları çalışmada, *Streptokokus mutansların* (*S.mutans*) biyofilm içerisindeki diğer mikroorganizma topluluklarından kolaylıkla ayırabilmişlerdir. Ayrıca bu sayede *S.mutansların* zamanla nasıl organize olduklarını da tanımlayabilmişlerdir.

AFM, örnek hazırlama süreci gerektirmeyen bir tekniktir. Bu teknikte özel tarayıcı bir uç kullanılarak örneğin 3 boyutlu analizi yapılır ve işlem sonunda 3 boyutlu bir imaj elde edilir (71). Floresan antisera ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri kullanılarak karma bir biyofilm topluluğu içerisindeki spesifik türlerin tanımlaması yapılabilir. Yeşil floresan proteini kullanılarak fiksasyon veya boyamaya gerek kalmadan biyofilmlerin noninvaziv incelenmesi yapılabilmektedir (76).

2.4. Çocuklarda Dental Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Çocuklarda dental biyofilmin oluşumunu etkileyen faktörler arasında etnik faktörler, yaş aralığı, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları, tükürük miktarı ve içeriği, dental yüzey özellikleri ve alanı gibi birçok faktör rol oynamaktadır.

Biyofilm oluşumunda, diş yüzeyinin enerjisi bakterilerin tutunması için anahtar rol oynamaktadır. Özellikle pürüzlü yüzeyler hem yüzey enerjisini hem de alanını artırdıkları için dental biyofilm oluşumunu artırmaktadırlar. Ayrıca, ağız içindeki bakterilerin birçoğunun hidrofobik yüzey özelliklerine sahip olması, hidrofobik maddelerin biyofilm oluşumunu artırdığını göstermektedir (77, 78).

Dişler üzerinde bulunan restoratif materyaller, hem yüzey özelliklerini değiştirdikleri için hem de yapılarında bulunan bileşiklerin özelliklerinden dolayı dental biyofilm oluşumunu etkileyebilirler. Amalgam, altın gibi materyallerin salgıladıkları iyonlar veya cam iyonomer simanların salgıladıkları florun, yapışan bakterinin canlılığını veya üremesini engellediği belirtilmiştir (64, 67, 78).

Dental biyofilm oluşumu sadece yüzey özelliklerine değil, ağız ortamına açılan yüzey miktarına da bağlıdır. Çocuk hastalarda özellikle ağız içi aparey kullanımının, hem yüzey alanını artırdığı hem de diş fırçası tarafından temizlenmesi zor alanlar oluşturduğu için dental biyofilm oluşumunu artırdığı rapor edilmiştir (16,80-84).

2.4.1. Yer Tutucular

Süt dişleri çocukların büyüme ve gelişmesi için çok önemli role sahiptir. Bu önemli rol sadece çiğneme açısından değil aynı zamanda konuşma, estetik görünüş, daimi dişlenmenin sağlıklı gelişimi, kötü alışkanlıkların önlenmesi olarak sıralanabilir. Diş çürüğü, travma gibi nedenlerden dolayı süt dişleri düşmeleri gereken zamandan daha erken kaybedildiklerinde daimi dişlerin sürme zamanlarına kadar oluşan boşlukların korunması için yer tutucular kullanılmaktadır.

Çekim boşluğunun büyüklüğüne ve lokalizasyonuna göre yapılacak olan yer tutucular, hareketli ve sabit olmak üzere gruplara ayrılırlar. Hastanın yaşı, ağız

hijyeni ve kooperasyonu, yapılacak olan yer tutucunun tipinin seçiminde önem kazanmaktadır.

Dental biyofilm oluşumunda yüzey özellikleri büyük öneme sahiptir. Bakterilerin biyofilm oluştururken solid yüzeylere gösterdikleri ilk afinite, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimden kaynaklanmaktadır. Ayrıca sert yüzeylerin sahip oldukları fizikokimyasal özellikler ve tükürük kompozisyonu da bakterilerin yüzeye yapışmasında aracı olarak önemlidir (16). Dental biyofilm oluşumu sadece yüzey özelliklerine değil, ağız ortamına açılan yüzey miktarına da bağlıdır. Diş yüzeylerinde bulunan pit ve fissürler gibi temizlemesi zor alanlar, mikroorganizmaların korunması ve biyofilm oluşturmalarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca yer tutucu apareylerin uzun süre kullanımları, çocukların gün içinde sık sık yüksek karyojenik gıdalar ile beslenmeleri, yeterli mekanik temizliği sağlayamamaları gibi nedenler de dental biyofilm oluşumuna katkıda bulunabilir (2, 3).

Yapılan birçok çalışmada, aparey kullanımı sonrasında, diş çürüğü oluşumu, plak indeksi, gingival indeks ve cep derinliği gibi klinik periodontal indekslerde artış olduğu rapor edilmiştir (85, 86). Apareylerin plak oluşumunu artırmasındaki sebebin, gingival marjnlere temas etmesi ile yumuşak dokuda baskı oluşturması ve oral hijyen prosedürlerini uygulamada zorluk yaratması olarak belirtilmiştir (87). Kullanılan aparey tipini gözetmeksizin, aparey kullanımına başlanmasının ardından, çocukların diş etlerinde büyüme ve cep derinliğinde artış, *S. mutans* sayısında artış, pH düşüşü, plak akümüasyonu gibi spesifik değişimler gözlenmiştir (88-92). Yapılan çalışmaların sonuçlarında, ağız içi aparey kullanımı ile birlikte oral mikrofloranın değiştiğine dair çok az bilgi bulunmaktadır.

Kullanılan yer tutucu materyallerinin yapısal farklılıkları, dental biyofilm oluşum miktarını da etkilemektedir. Metal ve fiber materyallerin oluşturduğu yer tutucuların karşılaştırıldığı bir çalışmada, cam fiber yer tutucuların uygulama kolaylığı, dayanıklılığı, hasta tarafından kabul edilebilirliği ve estetik avantajlarının yanında, temizleme kolaylığı sağlandığı ve daha az diş eti hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (93). Cam fiber yer tutucuların incelendiği benzer bir çalışmada, yerleştirdikleri dişlerin anatomik formlarında metal yer tutuculara göre daha az

değişikliğe, gıda retansiyonuna ve daha az plak oluşumuna neden oldukları rapor edilmiştir (94). Ayrıca fiber ile güçlendirilmiş kompozit yer tutucuların, hasta tarafından daha kolay temizlenebildiği vurgulanmış ve diğer yer tutucularla karşılaştırıldıklarında hastalarda daha sağlıklı diş etleri olduğu gözlenmiştir (95).

Kullanılan materyalin dışında yer tutucuların sabit ve hareketli olması da dental biyofilm gelişimini etkileyebilir. Sabit ve hareketli apacey kullanan çocuk hastaların 6 aylık takiplerinin yapıldığı çalışmada, hareketli apacey kullanan çocuklarda, plak indeksi, gingival indeks ve dişeti kanama indeksi değerlerinde önemli bir artış gözlenmemiştir. Sabit yer tutucu kullanan çocuklarda ise, gingival ve diş eti kanama indeksi değerlerinde önemli ölçüde artış olduğu rapor edilmiştir (96).

2.5. Dental Biyofilmin Kaldırılmasında Antiplak ve Antimikrobiyal Ajanlar

Diş çürüğünden korunmak amacıyla mekanik temizliğe destek olmak için geliştirilen kimyasal ajanlar, topikal ve sistemik uygulanmaktadır. Bu ajanların kullanım amacı, plak birikimini önlemek ya da sınırlamaktır. Antimikrobiyal ajanların etkinliği, ağız dokularına bağlanabilme ve salınım yapabilme özelliklerine bağlıdır. Dayanıklı ajanlar ağız içerisinde, mukozal yüzeylere, diş yüzeylerine, pelikül ve supragingival plağa tutunarak salınım yapmaktadırlar. Bu durum plak mikroorganizmaları ve antimikrobiyal ajanların uzun süreli temasını sağlamaktadır. Uzun süreli salınım yapan ajanlar, ağız dokularına sıklıkla van der Waals bağları, iyonik, hidrofobik ya da kovalent bağlar gibi spesifik olmayan bağlarla bağlanmaktadır (6).

Kimyasal ajanların uygulandıktan sonra ağız içindeki tutulumları, ağız içerisindeki dokular üzerine bağlanma yeteneklerine, tükürük ve diş eti sıvısı miktarına, dozuna, konsantrasyonuna, kontakt zamanına ve uygulanma sıklığına bağlıdır. Ajanın salınması, tükürükteki kalsiyum değerlerine, pH, tükürük akış hızı ve ayrılma oranına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (5).

Antiplak ajanların birçoğundaki etki mekanizması, mikroorganizmaların membranına bağlanmasını ve normal hücre zarı fonksiyonlarını

engellemesinedayanmaktadır. Ayrıca antiplak ajanları, ağız içi yüzeylerin serbest yüzey enerjilerinde düşmeye neden olarak mikrobiyal yapışmayı azaltmaktadırlar (6). Antiplak ajanlarının etki mekanizmaları ile ilgili bir yaklaşım ise potansiyel patojenik mikrobiyal neslin genetik olarak modifiye edilerek daha az virulan hale getirilmesidir (97).

Günümüzde kullanılan antiplak ajanları; florür, Chx, listerin, ksilitol, probiyotik, setilpiridinium klorid, aminflorid, sodyumdodesilsulfat gibi sıralanabilir. Antimikrobiyal ajanlar arasında Chx, uzun etki süresi ve geniş antimikrobiyal etkisi nedeni ile en yaygın kullanılan ajandır (98).

2.5.1. Klorheksidin

Chx, santral heksametilen halkası tarafından birleştirilmiş iki 4-klorofenil halkası ve iki biguanid grubundan oluşan simetrik bir katyonik moleküldür. Kuvvetli bazik özellikte bir ajandır. Bakteri hücre duvarı, bakteriyel EPS, hidroksiapatit, pelikül, plak, tükürük musini ve ağız mukozası gibi eksi yüklü alanlara karşı afinitesi vardır. Chx'in antibakteriyel aktivitesinde birkaç mekanizma rol oynar. Chx, konsantrasyonla ilişkili olarak ya bakterisit ya da bakteristatik etki gösterir. Chx'in öncelikle uygulama anında bakterisit etkiyle plak oluşumunu önlediğine ve mine yüzeyindeki pelikula ve ağız içerisindeki dokulara absorpsiyonu sonucu devam eden bakteristatik etki gösterdiğine inanılmaktadır (98). Chx'in antimikrobiyal ve antiplak ajan olarak başarılı bulunmasındaki en önemli faktör, etkisinin uzun sürmesidir. Chx; gram (+) ve gram (-) bakteriler, mantarlar, fakültatif anaerob ve aeroblar gibi geniş spektrumlu organizmalar üzerinde etkilidir (7).

Chx'in biyofilm oluşumunu engellediği bilinmektedir fakat olgun plağa penetrasyonu ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. İnsanlarda yapılan deneysel çalışmalarda Chx' in olgun plakta asit oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Bu durum, ağız içerisinde Chx tutulumu ve yavaş salınımına bağlanmıştır. Asit üretiminin az olmasının bir diğer nedeni de asidofilik ve karyojenik mikroorganizmaların kolonizasyonları için daha az elverişli bir ortam yaratmasıdır (99).

Chx'in lokal yan etkileri; dişlerde, restorasyonlarda ve protezlerde kahverengi renklenme yapma, uzun süreli kullanımı sonrası ağız mukozasında deskuamasyon ve mantar görülmesi, tat duyusunda bozulmaya neden olma ve diş taşı oluşumunu artırma olarak sayılabilmektedir. Ayrıca katyonik yapısı, deri ve mukozadan emilim düzeyini en aza indirmektedir. Bu nedenle sistemik toksisiteye neden olma riskinin çok az olduğu belirtilmiş olsa da özellikle çocuk hastalarda kullanımını sınırlamaktadır ve daha az yan etkisi olabileceği düşünülen doğal içerikli ürünlere yönelinmiştir (7).

2.6. Doğal Aromatik Bitkiler

Günümüzde, kullanılan antimikrobiyal ajanların çocuklarda oluşabilecek olası yan etkileri ve maliyetleri göz önüne alınarak bitkisel kaynaklı ajanlara yönelinmiştir. Uzun yıllardır geleneksel bitkisel tedavi olarak kullanılan sarımsak, köri, zencefil, çörek otu, zerdeçal, kahve, kakao, biberiye, nane, okaliptüs, aleovera, siyah ve yeşil çay, adaçayı gibi 2500'e yakın sayıda farklı bitkinin, ağız sağlığı için kullanılabilmesi yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarca belirlenmiştir(8-10, 100-102).

Erişilebilir kaynaklarda yapılan taramalar sonucunda, çok sayıda bitki türünün çeşitli çalışmalarda kullanıldığı rapor edilmiş olmasına rağmen, klinik uygulamada kullanılacak özellikte; devamlılık sağlayabilecek, koku, tat, ekonomik, fiziksel olarak klinik uygulamaya uygun olan ve çocuk hastalarda kullanılacak bitkisel ürün sayısı sınırlıdır (103,104). Bitkisel bir ürünün medikal amaçlı kullanılmasını sağlayan en önemli nokta, yapısında bulunan polifenollerdir. Polifenoller özellikle de kateşinler, bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojenik gibi özelliklere sahip olmasını sağlayan yapısal komponentleridir. Bitkinin yapısında kateşin oranı ne kadar yüksek olursa, sahip olduğu sağlığa yararlı özelliği de o kadar fazla olmaktadır. Özellikle Uzak Doğu ve Orta Asya'da yüzyıllardır geleneksel tedavilerde kullanılan ve kateşin oranı yüksek olan bitkilerden biri de çay bitkisidir (10).

2.6.1. ay

ay dünyadaki en popüler içecektir,5000 yıl önce ilk kez in’de keşfedilmiş ve M.Ö. 3000 yılından beri kullanılmaktadır (100). Günümüzde 30’dan fazla ülkede yetiştiriciliği yapılı hale gelmiştir. ‘Camellia sinensis’ bitkisinden elde edilmekte ve üretimi, bileşimi ve özelliklerine göre siyah, yeşil, oolong ve beyaz şeklinde farklı türleri bulunmaktadır (105). Dünyada yıllık 2,5 milyon ton çay yaprağı üretilmektedir. Dünyada kişi başına yılda 0.12 litre(L) tüketilirken, Türkiye’de kişi başına yıllık kuru çay tüketimi 3,2 kilogram(kg)’dır (106, 107).

Siyah ay, fenolik bileşikleri tam olarak oksidasyona uğrayarak, ‘oolong çay’ ise kısmen enzimatik oksidasyona uğrayarak üretilir. Yeşil ay, çay yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin enzimatik oksidasyonunu önlemek için taze yapraklar toplanır toplanmaz hızlı bir şekilde ısıtma ve kurutma yoluyla elde edilir. Oksijenle tepkimeye girmesine (fermantasyon) izin verilmemektedir. Kurutma işlemi sırasında, pigmentasyonda görevli enzimler bozulduğu için çay yaprakları sahip oldukları yeşil rengi kaybetmemektedirler. Bu işlem, çayın içeriğinde bulunan sağlığa yararlı doğal polifenollerini korumaktadır. Günümüzde popüler hale gelen beyaz çay ise henüz tam olgunlaşmamış genç çay yapraklarının fermente olmasına izin verilmeden hazırlanması ile elde edilir. Yeşil aya benzer şekilde yüksek kateşin konsantrasyonuna sahiptir. İçeriklerinde oluşan bu farklılıklar, beraberinde farklı biyolojik özelliklerin oluşmasına neden olmaktadır (108).

Özellikle siyah çay, uzun yıllardır İnan, Hindistan ve Uzak Doğu lkelerinde medikal tıpta kullanılmaktadır (109). Butt ve arkadaşları(110), siyah çay içerisinde bulunan polifenoller sayesinde yüksek oranda antioksidan, antikanserojenik, antidiabetik özelliği olduğunu belirtmişlerdir. Lambardo ve arkadaşları (111) ise siyah çayın oral patojenlere olan etkisini inceledikleri çalışmalarında, özellikle peridontal patojenlere karşı antimikrobiyal özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Lantano ve arkadaşları (112), farklı çayları kullandıkları çalışmalarında, oolong çayın da insan sağlığı için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yeşil ay ve beyaz çay, günümüzde medikal amaçla kullanılmak üzere araştırılan bitkilerin başında bulunmaktadırlar. Beyaz ay, ulaşılabilirliğinin zor olması, maliyetinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı yeşil çaya oranla daha az tercih edilmektedir.

2.6.2. Yeşil Çay

2.6.2.1. Yeşil Çayın İçeriği

Yeşil çayın içeriği karmaşıktır ve tam olarak tanımlanamamıştır. Yapısında çok farklı yapıda ve özellikte kimyasal bileşikler bulunmaktadır. Yeşil çayın kimyasal kompozisyonunda, kuru ağırlığının ortalama olarak %15-20'sini proteinler (enzimler), %1-4'ünü aminoasitler (teanine veya 5-N-ethylglutamine, glutamik asit, tryptophan, glisin serin, aspartik asit, trozin, valin, leucine, treonin, arginin ve lösin), %5-7'sini karbonhidratlar (selüloz, pektin, glukoz, fruktoz) ve %5'lik kuru ağırlık kısmını ise mineral ve diğer elementler (kalsiyum, magnezyum, krom, manganez, demir, bakır, çinko, molibden, selenyum, sodyum, fosfor, kobalt, baryum, stronsiyum, nikel, potasyum, flor ve alüminyum), yağlar (linoleik ve linolenik asit), vitaminler (B,C,E), sterol (stigmasterol), ksantik bazlar (kafein, theophylline), pigmentler (klorofil, karotenoidler) ve uçucu bileşikler (aldehitler, alkoller, esterler, laktonlar, hidrokarbonlar) oluşturmaktadır (113).

Yeşil çayın içerisinde bulunan polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılır. Yeşil çay, özellikle kateşinler ve kateşin türevlerini kapsayan flavonoidlerce zengindir (kuru ağırlık üzerinden %30). Epigallokateşin gallet (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin (EC) ve epikateşin gallet (ECG), yeşil çayda bulunan başlıca kateşinlerdir. Bu bileşikler yeşil çayda miktarca, EGCG (toplam kateşin miktarının %60'ı)>EGC>EC>ECG şeklinde sıralanmaktadır (114). EGCG, kateşinler içinde en yüksek antioksidan etkiye sahip bileşiktir (115).Renksiz, suda çözünür bileşikler olan kateşinler, yeşil çay demine acılık ve burukluk verir. Siyah çay üretimi esnasında kateşinler, çay yaprağında bulunan polifenol oksidaz enzimin etkisiyle okside olur ve siyah çayın özgün renk ve lezzetini oluşturan teafavinlere ve tearubiginlere dönüşür (116).

Yeşil çaya herhangi bir fermantasyon işlemi uygulanmadığı için, siyah çayın içerdiği uçucu yağ bileşenleri oluşmaz. Bu nedenle yeşil çayın aromatik özelliği daha azdır. Hem siyah hem de yeşil çayda kafein ve antioksidan bulunmasına rağmen, yeşil çaydaki kafein oranı daha düşüktür ancak daha az işlem gördüğü için

antioksidan miktarı daha fazladır. Bu özelliklerin aksine oolongo çayın ise, lipoksigenaz enzimini inhibe etme gücü yüksektir ve daha güçlü antimutajenik etkiye sahiptir (117).

2.6.2.2. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Etkileri

2.6.2.2.1. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri

Yapılan çalışmalarda yeşil çayın antioksidan, antiinflamatuvar, antimutajenik, antikanserojenik, apoptotik, obeziteyi önleyici, hipolipidemik (kolesterolü düşürücü), antiarteriosklerotik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, antifungal ve yaşlanmayı geciktirici etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmalarda yeşil çayın sağlık üzerine yararlı etkilerinin, özellikle bileşiminde bulunan kateşinlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (108, 109, 111, 113).

2.6.2.2.1.1. Antioksidan Aktivite

Antioksidanların, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarlı hücre ve biyomolekülleri azalttığı söylenmektedir. Antioksidan bileşikler, bozulmuş gıdalarda buldukları gibi pek çok kronik ve yaşlılığın getirdiği hastalıkların (ateroskleroz, diyabet, kronik inflamasyon, Alzheimer gibi nörodejeneratif rahatsızlıklar ve kanser gibi) patogenezinde de rol oynarlar. Yeşil çayın, içeriğinde bulunan polifenollerden dolayı güçlü antioksidan özelliğe sahip olması nedeniyle birçok hastalığın gelişimini ve oluşumunu önlediği iddia edilmektedir. Ancak çayın tipine bağlı olarak da fenolik maddenin miktarı ve buna bağlı olarak da antioksidan aktivitesi değişmektedir (115).

Yeşil çay polifenolleri, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini bağlar, ayrıca süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve kinon redüktaz gibi hücre içinde bulunan (endojen) antioksidan enzimlerin sentezini tetikleyerek de dolaylı olarak antioksidan aktivite gösterir. Bu etkileriyle yeşil çay, lipid peroksidasyonunu ve DNA yapısında oluşabilecek hasarları engeller. Yeşil çay içeriğinde bulunan EGCG, aynı zamanda metal iyonlarını bağlayarak ileriki aşamalarda reaktif serbest

radikallerin oluşumunu azaltır (118). Sung ve arkadaşlarının (119) yapmış olduğu çalışmada, yeşil çayın tüketiminden sonra plazma antioksidan kapasitesinin ancak %12 oranında yükseldiği ifade edilmektedir. Weinreb ve arkadaşları (120), yeşil çayda bulunan EGCG'nin serbest radikal temizleme ve demiri bağlama aktivitesi ile antioksidan enzimlerin çalışmasını düzenleyerek, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebileceğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, yeşil çayın paraokzonaz (PON1) aktivitesini koruma ve lipoproteinlerin oksidasyonunu engelleme yoluyla, damar tıkanıklığını ve sertliğini engelleyebileceği ve şeker hastalığında dolaylı olarak tedaviyi destekleyebileceği bildirilmiştir (121).

2.6.2.2.1.2. Antikarsinojenik Etki

Yeşil çayın antikarsinojenik etkisinin; hücre siklusunun durmasına etkisi, antioksidan etkileri, vasküler endotelial büyüme faktörünü inhibe etmesi, hücre proliferasyonu baskılaması, hücreler arası elektriksel iletişimi artırması veya sağlaması, apoptozu artırması yoluyla olduğu ileri sürülmektedir. (122). Kimyasal sentezi zor olan yeşil çayın ana bileşeni EGCG'nin güçlü antiradikal aktivitesi, nitasyon engelleyici, karsinojen metabolizma enzimlerini düzenleyici ve kanser hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi olduğu rapor edilmiştir (123).

Özellikle Japonya'da yapılan bir çalışmada, yeşil çay tüketim miktarına bağlı olarak I. ve II. fazda meme kanserlerinin tekrarlanma sıklığının azaldığı ortaya çıkarılmıştır (124). EGCG'nin prostat ve meme tümörlerinin büyümesine ek olarak deri, mide, kolon ve akciğer kanserlerine; teaflavinlerin (TF) ise akciğer ve yemek borusu kanserinin oluşumuna engel olduğu bildirilmektedir (125). Deney hayvanlarında yeşil çayda bulunan polifenollerin oral ya da topikal uygulamasının, ultraviyole (UV) nedenli cilt kanserlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (126).

2.6.2.2.1.3. Kardiyovasküler Hastalıklara Etkisi

Yeşil çayın kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisinin, antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yeşil çaydaki kateşinler, kardiyak troponin C'ye bağlanarak kalsiyum duyarsızlığına neden olur. Bu nedenle, kardiyak

miyoflamanların artmış kalsiyum duyarlılığından kaynaklanan hipertrofik kardiyomyopatilerin tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (127).

Japonya’da 8522 kadın ve erkek üzerinde yapılan çalışmada, günde 10 fincan (yaklaşık 900 mililitre (ml)) yeşil çay içen erkeklerin koroner kalp hastalığından ölüm riski, günde 3 fincan yeşil çay (280 ml) içen erkeklerden %58 daha düşük bulunmuştur (123).

2.6.2.2.1.4. Obeziteye Karşı Etkisi

Yeşil çayın içeriğinde bulunan kateşinler, özellikle EGCG ve kafein, enerji tüketimini ve yağ oksidasyonunu artırarak kilo kaybına neden olmaktadır (128). Yeşil çay, sempatik sinir sistemini etkilemektedir. Kateşinler, nörotransmitter bozulmasına neden olan o-metil transferaz enzimini inhibe etmektedirler. Transmitterler bozulmadığında, noradrenalin azalmamakta ve yağ oksidasyonu artmaktadır. Ayrıca düzenli beslenme ile birlikte yeşil çay kullanımı, termojenik etki ile metabolizma hızını artırmakta ve kilo kaybına neden olmaktadır (129).

Yeşil çaydaki EGCG’nin termojenik etkilerinin yanında, adiposit çoğalmayı, lipogenezi, yağ emilimini ve besin alımını azaltarak obeziteyi engellediği çeşitli hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (130).

Yeşil çayın anti-obezite etkisini araştıran bir hayvan deneyinde, farelerin 10 haftadan daha uzun süre yeşil çay tüketmeleri durumunda, obezite ve yağlı karaciğer sendromunda azalma olduğu saptanmıştır. Bu durumun, artan enerji tüketimine rağmen yeşil çay kateşinlerinin etkisiyle azalan besin maddesi emiliminden kaynaklandığı belirtilmiştir (131). İnsanlarda yapılan bir çalışmada ise 20-40 yaş arası 36 kadının, 4 hafta boyunca düzenli yeşil çay kullanımının, kilo kaybı, yağ kütlesinde azalma, bel bölgesinde incelmeye yardımcı olduğu belirlenmiştir (132).

2.6.2.2.1.5. Antibakteriyel Etki

Yeşil çay, diğer etkilerinin yanında direkt antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bu etkiyi; bakteri hücre membranına zarar vererek, yağ asiti sentezini inhibe ederek ve

enzim aktivitesini inhibe ederek gösterir. Bu etki beraberinde nitrik oksit sentezini artırarak, angiotensin II ve interlökin (IL) -6 reaktif protein ekspresyonunu inhibe ederek, enfekte osteoblast hücrelerinin ürettiği IL-6 ve IL-8 ile hyaluronidaz aktivitesini baskılayarak enfeksiyon inhibitörü olarak da görev yapmaktadır (133).

- **Hücre membranına zarar vermesi**

Kateşinin birçok direkt etkisi bulunmaktadır ve bu etkilerin sonucunda bakterinin lipid katmanına yapışmakta ve sonuç olarak membrana zarar vermektedir. Bu zarara bağlı olarak antimikrobiyal etki göstermektedir. Gram negatif bakterilerin membranında bulunan EPS negatif yüklüdür bu yüzden, yeşil çayda bulunan kateşin daha az etkili olmaktadır (134). Bakteri hücre duvarında oluşan bu zarar, bakterinin konak hücreye tutunmasını ve bakterinin başka bir biyofilme bağlanmasını engeller, bu durum patojenler için çok önemlidir (135). Hücre duvarında oluşan bu yıkım, toksin üretimini de engellemektedir. Tüm oral bakteri hücrelerinin kateşin ile tedavi edildiğinde morfolojik değişikliğe uğradığını, SEM analiz sonuçları göstermektedir (136).

- **Yağ asit sentezinin inhibisyonu**

Yeşil çay komponentinin, özellikle EGCG'nin, bakterilerin yağ asiti sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir (137). Yeşil çay tarafından yağ asiti sentezinin inhibe edilmesi, bakterilerin toksik metabolitleri üretmesini inhibe ettiğini göstermektedir (138).

- **Diğer enzim aktivitelerinin inhibisyon**

Yeşil çayın yağ asiti sentezi ile ilişkili başka bakteri enzimleri üzerine etkisi bulunmaktadır. Araştırmacılar, yeşil çayda bulunan kateşinin özellikle ağızda bulunan anaerob bakterilerdeki protein tyrosine fosfotaz ve sistein proteaz üzerine inhibitör etkisi olduğunu belirlemişlerdir (139,140). Ayrıca yeşil çayında içinde bulunan biyoflavonoidler, Adenozin Trifosfat (ATP) sentezini inhibe etmekte ve bakterilerin yeterli enerji üretmesini azaltmaktadırlar (141).

- **Diğer inhibitör etkiler**

Yeşil çay içinde bulunan kateşinler, Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) sentezinin ve stafilokokların tetrasiklin direncine karşı akış pompasının inhibisyonuna neden olurlar (142,143). Yapılan bir çalışmada, yeşil çay kateşinleri, *Helicobakter Pylori*'nin gastrik epitele bağlanmasını engellemişlerdir (144). Ayrıca virüslere karşı da antimikrobiyal etkiye sahiptir. Human Immunodeficiency Virus (HIV)'e karşı yeşil çayda bulunan EGCG, T-hücre reseptörlerini bağlamakta ve virüsü bloke etmektedir (145).

Ayrıca, yeşil çayın *hepatit virüsü, rotavirüs, influenza virüsü, maya mantarları, filamentöz klamidy, mikoplazma ve parazitler* gibi diğer mikroorganizmalara karşı da etkili olduğu belirtilmiştir (146-148).

2.6.2.3. Yeşil Çayın Ağız Sağlığına Etkisi

2.6.2.3.1. Diş Çürüğü ve Oral Biyofilme Etkisi

Yeşil çay içerisinde bulunan biyoaktif komponentler olan polifenoller, *S.mutans*ve *Streptokokus sobrinus*'a (*S.sobrinus*) karşı doğrudan bakterisidal etki göstermektedirler. Streptokokal ajanın poliferasyonunu inhibe edebilirler, diş minesinin yapışma sürecini etkileyebilirler ya da glikozil transferaz ve amilaz inhibitörleri olarak etki edebilirler (149,150). Yeşil çay içerisinde bulunan polifenollerin etki mekanizmaları, proteinlere karşı göstermiş oldukları afiniteye dayandırılmaktadır. Yeşil çay, amilaz ve glikozil transferaz enzimlerine bağlanarak bu enzimleri inaktif etmektedir. Ayrıca, *S. mutansların* diş yüzeylerine yapışmasında etkin olan fibria, fibril ve diğer protein yapılarına da (tek veya kombinasyon) bağlanarak diş yüzeylerine tutulumunu, dolayısıyla biyofilm oluşumunu engellemektedir (151, 152).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, *S. mutans* ile enfekte edilen ve karyojenik diyet ile beslenen hayvanların diyetlerinin içerisine yeşil çay polifenollerinin eklenmesi ile çürük miktarının önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (153). Touyz ve Amselin (154) yüksek karyojenik diyet ile beslenen genç farelerde yaptıkları

çalışmada, 2 hafta boyunca çay kullanımının diş çürüğü oluşumu ve ilerlemesinde etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Yu ve arkadaşları (155), farelerde ve çekilmiş insan dişlerinde, yeşil çay ekstraktının diş çürüğü engelleyici etkisini ve asite karşı direncini araştırmışlardır. Yeşil çayın diş çürüğü oluşumunu önemli ölçüde engellediğini ve diş minesini asit ataklarına karşı korumada etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Glikozil transferaz, diş çürüğü patogenezinin merkezini oluşturmaktadır. Wuve arkadaşlarının (156) yapmış oldukları çalışmada, polifenolik komponentlerin içerdiği gallo radikallerin, EGCG ve ECG'nin kuvvetli bir glikozil transferaz enzim inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Kashke ve arkadaşları (157) yaptıkları çalışma sonucunda, ticari olarak hazırlanan çay ekstraktlarının tükürükte bulunan amilaz için kuvvetli bir inhibitör olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada da çayın yapısında bulunan kateşinin, etkili bir enzim inhibitörü olduğu ve maltozun emilimini %70 azalttığı ve böylece yiyeceklerin karyojenik potansiyelini düşürdüğü rapor edilmiştir (158).

İnsanlar üzerinde yapılan kısa süreli bir çalışmada, fosfolipit yapısında bulunan ECG'lerin, bakteri sitoplazmik membran geçiş anahtar işlevini bozarak, virülans ve antibiyotik direncini ve dental plak ve gingivitis üzerinde etkili olan *S. mutans* gelişimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Yeşil çay içerisinde bulunan kateşin, dental plak oluşumunu etkilemekte ve tükürük pH derecesini normal kabul edilen 7.2-7.4 değer aralığına çekmektedir (159). Düzenli olarak kateşin uygulanan hastalarda, tükürükteki *S.mutans* sayısında azalma görüldüğü ve glukon sentezinin inhibe edilerek biyofilm oluşumunun engellendiği bildirilmiştir (157). Yeşil çay içerisinde bulunan kateşinlerin antimikrobiyal özelliklerinin incelendiği diğer bir çalışmada, kateşinlerin artmış aktivitesi sonucunda mikroorganizmaların bariyer fonksiyonunun etkilendiği belirlenmiş ve bu şekilde antimikrobiyal etki gösterdiği öne sürülmüştür (160). Bu sonuçların aksine farklı bir çalışmada ise, kateşinin asit üretimine karşı etkili olmadığı, sadece bakterilerin diş yüzeyine tutunmasına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (161).

Tsuchiya ve arkadaşları (162), çalışmalarında içerisinde kateşin bulunan yeşil çay ekstraktının (5,0 miligram(mg)/ml), tükürükte 60 dakika (dk) boyunca etkili

olduğunu bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada, 25 hastaya 5 dk boyunca çalkalama yaptırılmış ve 2 saat öncesi ve sonrasında analizler yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda kateşinin, plak ve *S. mutans* miktarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (163).

Evlin-Lewis ve Steelman (164), 106 Amerikalı çocukta yaptıkları çalışmada, günlük 1-3 kupa çay içen çocukların çürük ve plak indeksinin önemli ölçüde düşük olduğunu belirtmişlerdir. Sekiz yüz Japon çocuğunu kapsayan bir diğer çalışmada, günlük 1 fincan yeşil çay içen çocuklar karşılaştırılmıştır. Çay içen çocukların pit ve fissürlerinde çürük oluşumunun önemli ölçüde az olduğu belirlenmiştir (165). Çay, şekerli ve gazlı içecek tüketiminin araştırıldığı bir çalışmada, 600'den fazla çocuk çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma sonucunda, açık bir şekilde çay içen çocuklarda çürük oranının düştüğü belirlenmiştir. Bu çalışmada siyah çay kullanılmıştır ve siyah çaydaki kateşin oranının yeşil çaya göre çok daha düşük olduğu bilinmektedir (166).

Yeşil çay, ağız içi dokularda olduğu gibi restoratif materyaller üzerinde de yararlı etkilere sahiptir. Kompozit dolgularda ikincil çürük oluşumuna karşı yeşil çayın etkisinin incelendiği bir çalışmada, %2'lik yeşil çay 7 gün boyunca günde 3 kere kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, plaktaki, tükürükteki ve kompozit restorasyon etrafındaki *S.mutans* miktarı ve diş eti kanama indeksi (GBI) değerinde önemli ölçüde azalma görülmüş ve yeşil çayın çürük oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (167).

Ağız içine flor salınımı yaparak biyofilm oluşumunu engelleyen çay, polifenol komponentinin dışında aynı zamanda doğal bir flor kaynağıdır. Kuru çay yaprağında 4-4000 ppm, demlenmiş çayda 0.34-6 ppm ve bir fincan çayda 0.3-0.5 mg arasında flor bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, günlük flor ihtiyacının %70'inin çaydan karşılandığı bildirilmiştir (168, 169). Simpson ve arkadaşları (170), yeşil çay ile gargara yaptıktan sonra, yaklaşık olarak %34 oranında florun ağız dokularına tutunduğunu bildirmişlerdir. Yoshiharu ve arkadaşları (171), yeşil çay içeren jel sisteminin, yapısında bulunan flor nedeni ile önemli ölçüde mineral kaybını azalttığını ve dentin demineralizasyon etkinliğini belirlemişlerdir.

2.6.2.3.2. Periodontal Problemlere ve Ağız Kokusuna Karşı Etkisi

Periodontal problemlerin patogeneğinde etkili olan bakteriyel biyofilm, gingival marjin ve periodontal cepte gelişmektedir. Periodontal patolojiler, bakterilere ve konak immün cevaba bağı multifaktöriyel hastalıklardır. Yapılan çalışmalarda, periodontal hastalıkların tedavisinde, mekanik temizliğin tek başına tam anlamı ile etkili bir yöntem oluşturmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle, çeşitli medikal yaklaşımlarla desteklenmektedir (5). Bu medikal yaklaşımlar, yararlı etkilerinin yanı sıra uzun dönemde oral florada bulunan yararlı bakterilere karşı da etkili olmakta ve konağa zarar vermektedirler. Ayrıca, bakterilerin uzun dönemde kullanılan medikallere karşı direnç geliştirmeleri, bu ilaçların kullanımını sınırlamaktadır (172). Diğer hastalıklarda olduğu gibi periodontal hastalıklarda da bitkisel kaynaklı tedavilere yönelinmiştir ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Yeşil çay içerisinde bulunan kateşinler, periodontal patojenler ve periodontal dokulara karşı da etkilidir (173). Yeşil çay içerisinde bulunan en baskın komponent olan EGCG, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin kollagenaz aktivitesini ve *Prevotella intermedia*'daki (*P. Intermedia*) protein tirozin fosfataz etkisini inhibe etmektedir (174,175). Ayrıca EGCG, osteoklast ve osteoklast benzeri hücrelerin ölümü ve doza bağı olarak (25-100µm) hücre yolunda major düzenleyici enzimlerin katılımı ile kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir (176).

Yeşil çayın periodontal patojenlere karşı etkisinin incelendiği çalışmada, düzenli olarak diş eti sıvısına yeşil çay kateşini uygulanmış ve belirli bir oranda kateşinin ağız içinde bulunmasının antikaryojenik, antibakterisidal ve antiplak etkisi göstereceği bildirilmiştir (177). Rasheed ve Haider (178) 0,25 gr yeşil çay ve %0.12'lik Chx'in antiplak etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında, 7-11 gün süre ile dental plağın yeniden oluşumunu incelemişler ve plak akümüleyonunu azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışma süresince herhangi bir yan etki gözlenmemiş fakat uygulama süresinin kısa oluşu çalışmanın eksik yönü olarak belirtilmiştir. Sakanaka ve arkadaşlarının (179) yapmış olduğu çalışmada, yeşil çay kateşinlerinin, özellikle de EGCG (250-500 ug/ml), bukkal epitelyum yüzeylerinde *Pseudomonas gingivalis* (*P. gingivalis*)'in tutunumunu ve gelişimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Yüzeye tutunmuş bakteri sayısı, kullanılan doza bağı olarak azalmıştır. Tutunmayı

engelleyen mekanizma, çay içerisinde bulunan polifenollerin *P. gingivalis* fibrialarına bağlanarak etki göstermektedir. Böylece bakteri başka bir yüzeye bağlanamamakta ve biyofilm oluşturmamaktadır. Hirasawa ve arkadaşları (180), yeşil çayın periodontal hastalıklar için yararlı olduğunu, negatif anaerobik bakterilere karşı antibakteriyel etkisi olduğunu ve mekanik temizlik ile kombine olarak haftada 2 kere%2'lik yeşil çay gargarasının diş eti kanama indeksi (GBI) ve periodontitise karşı etkili olacağını belirtmişlerdir. Kudva ve arkadaşlarının (181) yapmış oldukları çalışmada, lokal olarak kateşin uygulamasının, diş eti cebi derinliğinde önemli ölçüde azalma meydana getirdiği ve periodontal patojeniteye sahip olan bakterilerin sayısının azalmasında etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yeşil çay içerisinde bulunan kateşinin, kollagenaz aktivitesinde inhibe edici etkiye ve doku yıkımında sınırlayıcı etkiye sahip olması nedeniyle, matrix metalloproteinase-9 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı ve osteoklastların formasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda, EGCG'nin periodontal hastalık oluşumunda alveol kemik yıkımını engelleyebildiği sonucuna varılmıştır.

Awadalla ve arkadaşlarının (182), dört hafta süren çalışmalarında, ağız kokusu olan periodontal hastalığa sahip bireylerde, dilue kateşin ile gargara uygulamasından sonra ağız kokusunda azalma gözlenmiştir. Ağız kokusunun giderilmesinde farklı bitkisel içerikli gargaralar kullanılmaktadır fakat yeşil çay kateşinlerinin volatil sülfür bileşiklerine (VSCS) karşı diğer koku giderici bitkilere göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (183). Yeşil çayın gargara şeklinde uygulanmasından hemen sonra, H₂S ve CH₃SH gazlarının konsantrasyonlarının azaldığı, özellikle de CH₃SH'e karşı daha etkili olduğu belirlenmiştir ve uygulandıktan 3 gün sonra etkisinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir (184).

2.6.2.4. Yeşil Çayın Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri

Yeşil çayın belirlenen birçok yararlı etkisi bulunmasına rağmen fazla kullanılması, bilinmeyen yan etkiler oluşmasına neden olabilir. Bu durumun en önemli nedeni, yeşil çay içerisinde bulunan kateşinin kullananların tamamında benzer etkiler göstermemesi şeklinde açıklanmıştır. Yeşil çayda bulunan EGCG, sitotoksiktir ve yüksek dozda alındığında karaciğer hücrelerinde akut sitotoksitite

neden olmaktadır (185). Yüksek dozda yeşil çay tüketiminin, hamsterların pankreas ve karaciğerlerinde oksidatif DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, pankreas β hücrelerinde EGCG'nin prooksidan özelliğinin antioksidan özelliğine göre daha yüksek olduğu da rapor edilmiştir (186). On üçhafta boyunca günlük diyetle %5'lik yeşil çay tüketiminin, diyabetik hayvanlarda hiperglisemi kontrolünde zararlı olduğu ve sağlıklı ratlarda tiroid büyümesine neden olduğu belirtilmiştir (187).

Yeşil çayın insan sağlığına olumsuz etkisinde; kafein içeriği, alüminyum (Al) varlığı ve polifenollerin demirin biyoaktivitesine etkisi olmak üzere önemli 3 ana faktör vardır (105).

Yetişkin bireylerde gün boyunca yeşil çay tüketimi, kahveye benzer bir şekilde bilişsel ve psikomotor performansı geliştirmiştir. Fakat kahveye göre daha az uykusuzluğa sebep olmaktadır (105). Lin ve arkadaşları (188) yaptıkları çalışmada, üretimleri ve fermantasyon dereceleri farklı benzer çay tiplerindeki kafein miktarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, kafein miktarının en yüksek oranda siyah çayda olduğu, daha sonra sıra ile oolong çay, yeşil çay ve taze çay yaprağında bulunduğu bildirilmiştir. Cabrera ve arkadaşları (105), içerisinde fermente çaylar (kırmızı ve siyah), oolongo çay ve yeşil çayın yer aldığı 45örnekte kafein miktarını incelemişlerdir. 41,5-67,4 mg/gr siyah çayda en yüksek miktarda, daha sonra sırası ile 32,5 mg/g yeşil çayda ve 29,2 mg/gr oolongo çayda kafein bulunduğu belirlemişlerdir. Fernandez ve arkadaşları (189) yaptıkları çalışma sonucunda, kafein oranının fermente çaylarda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Değerlere bakılırsa, fermente çaylarda kafein 2,4 mg, fermente olmayan çaylarda ise 1,47 mg olarak değişmektedir. TF, yeşil çay içerisinde bulunan diğer polifenol gruplarından ve kafeine benzer yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı, major kardiyovasküler rahatsızlığı olan hastalara, hamile ve emziren kadınlara günlük 1-2 fincan yeşil çaydan fazlası önerilmemektedir, çünkü kalp ritminde artışa neden olmaktadır. Ayrıca bazı ilaçlarla birlikte kullanıldığında diüretik etkiye neden olabilir, bu duruma özellikle dikkat etmek gerekmektedir (190).

Tüketilen gıdalarla alınan mineraller, metabolizmanın sağlıklı çalışması için gerekli oldukları gibi fazla alındıkları zaman önemli sağlık problemlerinin

oluşmasına neden olabilirler. Siyah ve yeşil çayda Al varlığı ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, çayın içerisinde bulunan Al'nin özellikle böbrek hastalığı olan hastalarda, nörolojik rahatsızlıklara neden olabileceği bildirilmiştir (191).

Yeşil çay içerisinde bulunan kateşinlerin, demire afinitesi sonucunda yüksek oranda yeşil çay tüketimi ile vücutta bulunan demir bağlanarak miktarını azaltabilir. Nadiren, yeşil çayın fazla tüketilmesine bağlı gelişen hepatoksisite ve nefrotoksisite olguları da bildirilmiştir (192). Fazla miktarda tüketilen yeşil çayın, içerisindeki polifenollerin bazı ilaçlar ve demir preparatlarının absorpsiyonunu zorlaştırdığı için, beslenme bozukluğuna neden olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, yeşil çayda bulunan kateşinin demire afinitesi, yeşil çay tüketildiğinde demirin biyolojik olarak önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır (193). Çayın demir bağlama etkisinin çaya limon katılarak azaltılabildiği belirtilmiştir (194).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik İzin

Çalışmanın in vivo ve in vitro kısmı için etik izin Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (11.02.2013/509). Araştırmaya dahil edilen tüm çocuklar ve ebeveynlerine araştırma hakkında bilgi verilip gerekli izin alındıktan ve aydınlatılmış onay formları imzalatıldıktan sonra klinik işlemlere geçilmiştir.

3.2. İn Vitro Çalışma

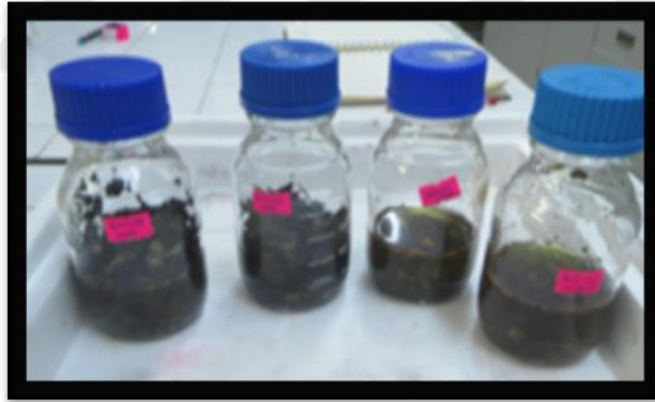
3.2.1. Gereç

3.2.1.1. Çay Ekstraktları

Bu çalışmada, Türkiye Rize bölgesinde üretilen çay bitkisinin kuru yaprakları (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) ve yeşil çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), ortamda karıştırılarak kurutulmuştur. Kuruyan çay yaprakları mekanik öğütücü yardımı ile küçük parçalar haline getirilmiştir (**Resim 1**). Yeşil çay öğütülmüş olarak hazır halde tedarik edilmiştir. Çay bitkisinin kuru yaprakları ve yeşil çayın metanol, hekzan ve steril saf su kullanılarak ekstraktları hazırlanmıştır (**Resim 2**).



Resim 1. Kurutulmuş çay yaprakları



Resim 2. Kuru çay yaprakları ve yeşil çaydan elde edilen metanol, hekzan ve steril saf su ekstraktları

3.2.1.2. Yer Tutucu Materyal Örnekleri

İn vitro çalışmada kullanmak için, çocuklarda kullanılan yer tutucu apareylerinin yapıldığı materyallerden;

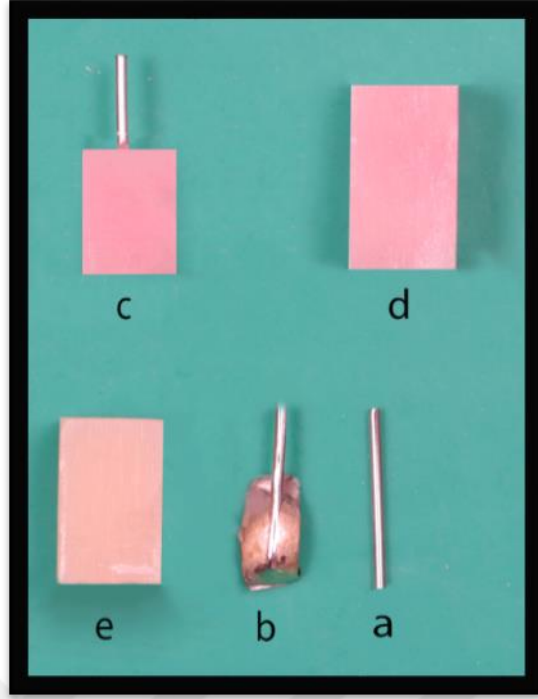
- 0,7x10mm dental kroşe teli,

- 10x5x5mm akrilik kúp,
- 10x5x5mm akrilik kúp ve 5x 0,7mm dental kroşe teli,
- 5x5mm band levha ve 5x0,7mm dental kroşe teli ve
- 5x5x5mm cam fiber örnekler hazırlanmıştır.

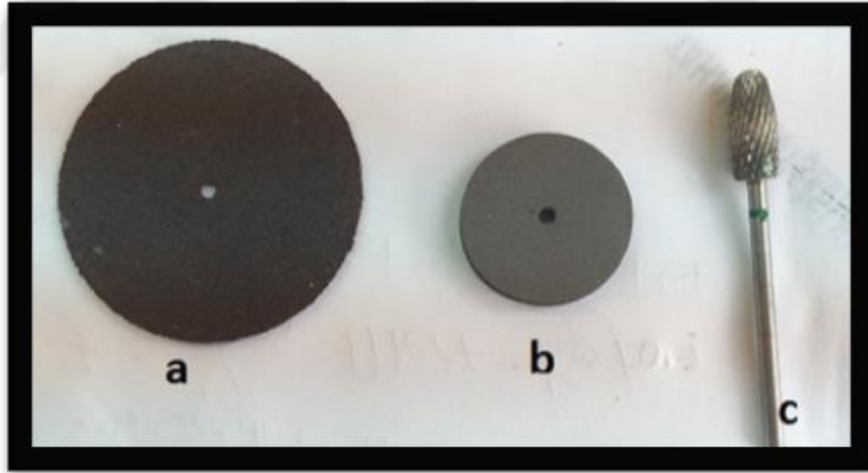
Çelik tel örnekler, hazır halde alınan çelik tel sarmanından (Universal, Silberlot Isprlgen, German) 0,7mm çapında 1cm uzunluğunda kesilmiş (**Resim 3**) ve telin uç kısmı büyük boy karbon separe (0,4 mm) ile düzeltilip metal lastiği ile yuvarlatılmıştır. Çelik tel ve band lehvalar, çocuklarda kullanılan süt ikinci azı dişine uygun bandlar eğimleri bozulmayacak şekilde (arayüz ile bukkal yüz birleşimi) 1 cm uzunluğunda kesilmiş ve 0,7 mm çapında 1 santimetre (cm) uzunluğunda hazırlanmış çelik teller ile lehimlemiştir (**Resim 4**). Daha sonra fazlalıklar büyük boy karbon separe ile alınmış ve metal lastiği kullanılarak kenarlar yuvarlatılmıştır (**Resim 5**). Tel örnekler polisaj pastası (Oropol, Detax, Ettlingen, German) kullanılarak cila motorunda parlatılmıştır. Kalan artıkların uzaklaştırılması için sıcak buharda yıkanmışlardır.



Resim 3. Çelik tel



Resim 4. a- Çelik Tel b- Molar Band+ Çelik Tel c- Akrilik +Çelik Tel d- Akrilik e- Kompozitle Doyurulmuş Cam Fiber



Resim 5. a- Karbon separe b- Metal lastik frez c- Canavar frez

Akrilik örneklerin hazırlanmasında öncelikle 10x5x5mm boyutlarında pembe mumdan örnekler hazırlanmıştır. Örnekler alçı içine gömülmüş daha sonra sıcak su ile mum eritilmiş ve istenilen boyutlarda negatif boşluk elde edilmiştir. Alçı içinde açılan negatif boşluklara sıcak pembe akril koyularak muflalanmış ve 100⁰C’de 10 dakika (dk) polimerize edilmiştir. Mufladan çıkarılan örneklerin fazlalıkları canavar frez yardımı ile temizlenmiştir. Alüminyum oksit zımpara kâğıdı (220 nolu) ile

zımparalanmış ve polisaj patı ve motoru kullanılarak parlatılmıştır. Kalan artıkların uzaklaştırılması için sıcak buharda yıkanmışlardır. Hazırlanan akrilik örneklerin yarısına polimerizasyon öncesinde 5x0,7 mm dental kroşe teli yerleştirilmiştir (**Resim 4**).

Cam fiber materyallinden elde edilen örnekler için 10x5x5mm boyutunda cam fiber (Everstick C&B, StichTech, Turku, Finland) örnekler kesilmiştir. Örnekler akışkan kompozit(Filtek TMSupreme XT, 3M ESPE, St. Paul, MN,USA) ile kaplanmış ve ışık cihazı ile 20 saniye(sn) sertleştirilmiştir (Blue Swan, Dentanet, Ankara, Türkiye). Elde edilen örnekler, labut ve alev uçlu sarı kuşak frez ile fazlalıklardan temizlenmiştir. Kompozit için taş ve lastik frez kullanılarak parlatılmıştır (**Resim 4**). Çalışmada kullanılmadan önce, metal tel ve band örnekleri otoklavda 121°C’de 20 dk steril edilmiştir. Akrilik örnekler ise otoklavda kimyasal ve yüzey özellikleri değişeceği için %70’lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir (197).

3.2.1.3. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği’nde yer tutucu kullanan ve ailelerinden onam alınan çocuk hastalardan izole edilen ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tanımlamaları yapılan 4 suş; *S. mutans* 3.3, *S.anginosus* 2.1b, *S. dysgalactie* 6.1.4.1,E, *faecium* 10.2 ile standart suş *S.mutans* ATCC 25175 kullanılmıştır.

3.2.1.4. Araştırmada Kullanılan Besi Yerleri ve Kimyasallar

Man Rogosa Sarp Agar (MRS)(MERCK)

- Peptonecasein 10,0 gr/L
- Meat ekstraktı 10,0 gr/L
- Yeast ekstraktı 4,0 gr/L
- D(+) Glucose 20,0 gr/L
- K₂HPO₄ 2,0 gr/L

- Tween 80 1,0 gr/L
- di-Ammonium hydrogen citrate 2,0 gr/L
- Sodium acetate 5,0 gr/L
- MgSO₄ 0,2 gr/L
- MnSO₄ 0,04 gr/L
- Agar-agar 14,0 gr/L

68,2 gr/L olacak şekilde tartılmışlar ve distile su içinde karıştırılarak, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve steril petrilere dökülmüşlerdir.

Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besi Yeri (BHI) (MERCCK)

- Nutrient Substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 gr/L
- D(+) Glucose 2,0 gr/L
- NaCl 5,0 gr/L
- Na₂HPO₄ 2,5 gr/L

37,0 gr/L olacak şekilde distile su içinde karıştırılarak tüplere dağıtılıp 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

M17 Katı Besi Yeri

- Peptone from soymeal 5,0 gr/L
- Peptone from meat 2,5 gr/L
- Peptone from casein 2,5 gr/L
- Yeast ekstraktı 2,5 gr/L
- Meat Ekstraktı 5,0 gr/L
- Lactose mono-hydrate 5,0 gr/L
- Ascorbic acid 0,5 gr/L
- Sodium β-glycerophosphate 19,0 gr/L

- Magnesium sulfate 0,25 gr/L
- Agar-agar 12,75 gr/L

55,0 gr/L olacak şekilde distile su içinde karıştırılarak 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve steril petrilere dökülmüştür.

Brain Heart Infüzyon Katı Besi Yeri (BHI)

- Nutrient substrate (beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 gr/L
- D(+) Glucose 2,0 gr/L
- NaCl 5,0 gr/L
- Na₂HPO₄ 2,5 gr/L
- Agar-agar 15,0 gr/L

52,0 gr/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak çözdürülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve steril petri kutularına dökülmüştür.

Mitis Salivarius Katı Besi Yeri

- Casein enzymatic hydrolysate 15,0 gr/L
- Crystal violet 0,0008 gr/L
- Dextrose 1,0 gr/L
- Dipotassium phosphate 4,0 gr/L
- Peptic digest of animal tissue 5,0 gr/L
- Sucrose 50,0 gr/L
- Trypan blue 0,075 gr/L
- Agar 15,0 gr/L

90,0gr/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak çözdürülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve steril petri kutularına dökülmüştür.

Çikolata Katı Besi Yeri

- Çikolata Agar bazal besiyeri bileşimi (gr/L olarak)
- Proteose peptone 7,5 gr/L
- Polypeptone 7,5 gr/L
- Buğday nişastası 1,0 gr /L
- NaCl 5,0 gr/L
- K₂HPO₄ 5,0 gr/L
- KH₂PO₄ 1,0 gr/L
- Agar 10,0 gr/L
- Distile su 1000 ml şeklindedir.

42 gr/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak çözdürülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiş ve steril petri kutularına dökülmüştür.

Patates Dekstroz Katı Besi Yeri (PDA)

- Patates 200 gr (haşlanmış soyulmuş küçük parçalar halinde)
- Dekstroz 20,0 gr (filtrasyonla sterilize edilir)
- Agar 15,0 gr
- Distile su 1000,0 ml
- pH 6.6

Distile suda kaynatılarak çözdürülmüş, tüplere taksim edilmiş ve otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Kanlı Katı Besi Yeri

- Nutrient substrate (heart ekstraktı and peptones; kalp ekstraktı ve peptonlar) 20,0 gr/L
- NaCl 5,0 gr/L

- Agar-agar 15,0 gr/L

Dehidre besiyeri 40,0 gr/L konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde çözdürülmüş ve otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Kristal Viyole Solüsyonu

- Kristal viyole 2 gr
- Etil alkol 20 gr
- Amonyum oksalat 0,8 gr
- Distile su 80 ml

Maddeler distile su içinde çözülerek kullanılmıştır.

Kongo Kırmızısı

Tetrazolium klorid (TCC) (sigma aldrich USA)

Glasiyel asetik asit

Chx (sigma aldrich USA)

- Chx %0,12'lik
- Benzidamin hidroklorür %0,15'lik

3.2.2. Yöntem

3.2.2.1. Doğal Ağız Florasından Dental Biyofilm Bakterilerinin İzole Edilmesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Kliniği'ne başvuran ve tarafımızdan yapılmış hareketli veya sabit yer tutucuyu son 2 aydır kullanan, sistemik olarak sağlıklı, 6-12 yaş arası değişen 4 kız ve 6 erkek çocuk hastadan, kullandıkları hareketli yer tutucuların, akrilik gövde, akrilik diş, büküm tel kroşe, sabit döküm yer tutucuların band gövde ve çelik tel ve fiber yer tutucuların

kompozit ile doyurulmuş gövde kısımlarından steril swap kullanılarak örnek alınmıştır.

Ağız içi hareketli veya sabit herhangi bir aparey kullanan çocuklar arasında seçim yapılırken; karma dişlenme döneminde olmasına, alınan anamnez ışığında sistemik bir rahatsızlığı (solunum yolları hastalığı, gastrointestinal sistem hastalığı ve metabolik hastalığı) ve herhangi bir sendromu bulunmamasına, diş eti hastalığı olmamasına, son 2 ay içerisinde flor uygulaması yapılmamış, herhangi bir tatlandırıcı ve probiyotik içeren ürün kullanmamış olmasına dikkat edilmiştir. Hastaların *S.mutans* sayısının standart olması için Dentocult® SM (Orion Diagnostica, Finland) sistemi kullanılmıştır. Hastalar örnek alınmadan 2 saat öncesinde herhangi bir şey yememeleri için uyarılmışlardır. Örnek alınmadan 15 dk önce besi yeri bulunan tüplere kit içinde bulunan diskler atılıp çalkalanmıştır. On beş dakika sonra kit içinde bulunan stipler ile hastaların dişlerinden, yanak içi mukozalarından ve dillerinden alınan biyofilm örnekleri tüplerin içine yerleştirilmiş ve kapakları kapatılmıştır. Örnekler, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 37°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda üretici firmanın skalasına göre değerlendirilmişlerdir. Koloni geliştiren birim (kob) oranı $\leq 10^5$ olan örnekler çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma öncesinde oral hijyen eğitimi verilmiş ve kullanılacak diş macunu ve fırçaları standart hale getirilmiştir. Biyofilm örnekleri, yer tutucu akrilik gövdesinden, akrilik dişlerden, destek dişlerden, sabit yer tutucu metal gövdesinden ve hareketli yer tutucu çelik tel kroşe kolundan alınmıştır. Örnekler, sabah kahvaltıdan sonra önerilen şekilde florsuz diş macunu ile diş fırçaladıktan 2 saat sonra steril taşıyıcı swap ile alınmıştır. Alınan biyofilm örnekleri, soğuk zincir ile Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarına gönderilmiştir.

3.2.2.2. Örneklerin Besiyerlerine Ekimi ve İzolatların Safılaştırılarak Stoklanması

Soğuk zincir yolu ile gelen numuneler, Man Rogasa Sharp Agar (MRS), M17 Agar, Mitis Salivarius Agar (MS, Difco), Brain Hearth Infusion Agar (BHI, Merck), çilolata agar, patates dekstroz agar (PDA) ve kanlı agar besi yerlerine yayma kültür

yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları 37°C'de %5 CO²'li anerobik ve aerobik ortamda 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni morfolojisi incelenerek aynı besi yerlerine çekilmiştir (**Resim 6**). Saf kültürler %20 gliserol içeren ependorf tüplerinde -80°C'de stoklanmıştır.



Resim 6. Sıvı besiyeri ve katı besi yerinde bakteri üremesi

3.2.2.3. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Göre Tanımlanması

İzole edilen saf kültürler öncelikle izole edildikleri agarlara ekilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürler, uygun besi yerlerine ekilerek koloni morfolojileri kontrol edilerek gram boyama yapılmıştır. Daha sonra kültürlerin oksidaz, katalaz ve koagülaz testleri ile hareketlilik durumu açısından incelenmiştir. Kanlı agara ekilerek hemoliz özellikleri gözlenmiştir. Karbonhidrat fermantasyon testi, VİTEC II (Biomeriux, France) ile belirlenmiştir. Çalışma için seçilen suşların tanımlanması Otomatik Ripoprinter (DuPont, USA) ile yapılmıştır (**Resim 7**).



Resim 7. VİTEC II cihazı

Morfolojik olarak tipik kok görünümüne sahip olan ve MS katı besi yeri ve M17 katı besi yerinden elde edilen izolatların tanısı için 10°C ve 45°C’de, pH 9.6’da gelişim, %4 ve 6.5 NaCl’de üreme ve şeker fermantasyon testleri API 20 strep ile tanımlamalar doğrulanmıştır.

3.2.2.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm üretimi, kongo kırmızılı agar (CRA) ve mikrotitrasyon plaka yöntemi ile yapılmıştır (194, 195).

3.2.2.4.1. Kongo Kırmızılı Ortamda Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi için, BHI + %1 laktoz + %0,08 g/L kongo kırmızısı içeren besi yerine ekim yapılmıştır. 24 saat süre ile M17 ortamında aktiveleştirilmiş taze kültürlerden hazırlanmış olan BHI + %2 şeker + 0,08 g/L kongo kırmızısı içeren besi ortamına ekim yapılarak 37°C’de 18-24 saat süre ile %10 CO₂ içeren anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürlerin morfolojik görünümleri incelenmiştir. Siyah renkli koloniler pozitif, renk değiştirmemiş olan pembe renkli koloniler negatif olarak belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu karbonhidrat kaynağı olarak glukoz, laktoz, sükroz, früktoz, galaktoz şekerleri kullanılarak her bir şekerde biyofilm oluşumu belirlenmiştir.

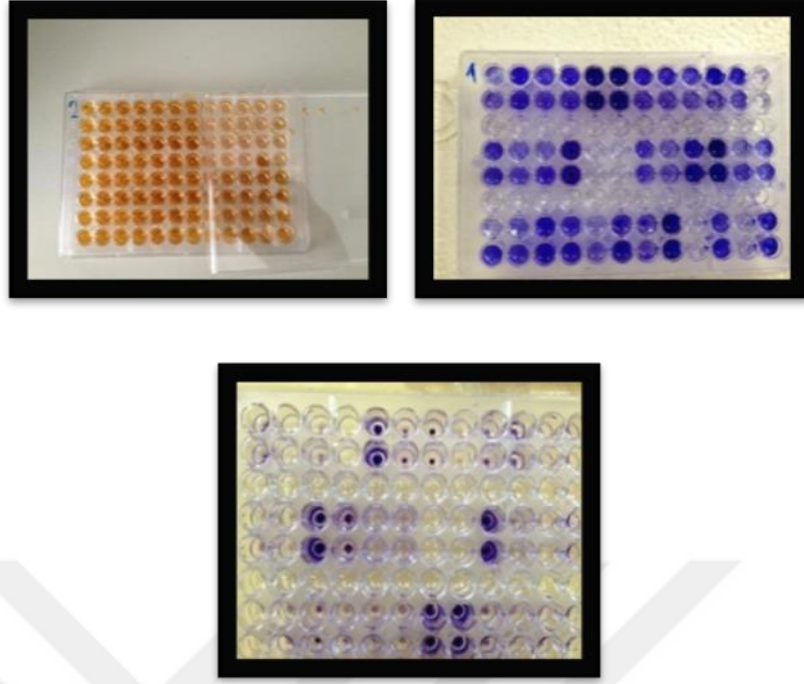
3.2.2.4.2. Mikrotitrasyon Plaka Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Farklı izolatlarda biyofilm oluşumunun belirlenmesi için mikrotitrasyon plaka yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak mikroorganizmalar BHI sıvı besiyeri içerisinde 24 saat süre ile inkübe edilerek, mikroorganizmaların taze kültürleri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu ELİSA petrisine farklı şeker kaynaklarına sahip her bir kuyucuğa 195µl olacak şekilde %2 şeker içeren BHI sıvı besi yerine aktarılmıştır. Her bir kuyucuğa 5 µl bakteri (mililitresinde 10⁸ kob olan kültürden) ekim yapılmıştır. Burada karbonhidrat kaynağı olarak glikoz, laktoz, früktoz, galaktoz, rafinoz, maltoz ve

sükroz şekerleri ayrı ayrı kullanılmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarına sadece besiyeri konulmuştur. Örnekler 37°C'de %10 CO₂ içeren ortamda 48 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımıyla 470nm dalga boyunda okunmuştur (**Resim 8**). Okumadan sonra plaka içerisindeki besi ortamı boşaltılmış ve plaka iki kez steril fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkanmıştır. Plaka üzerine %95'lik metanolden 200µl aktarılarak 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra plakadaki metanol boşaltılarak plaka 15 dk süre ile hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklar kuruduktan sonra üzerine 200µl %2'lik kristal viyole boya çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dk bekletilmiş, sonra plaka içerisindeki boya boşaltılarak iki kez PBS ile yıkanmıştır. Son olarak plaka üzerine 160µl % 33'lük(v/v) glasiyel asetik asit ilave edilerek örnekler spektrofotometre yardımıyla 590 nm dalga boyunda okunmuştur. Sonuçlar neticesinde yüksek oranda biyofilm oluşumu gözlenen 4 bakteri çalışmanın devamı için seçilmiştir. Bu çalışma her bir bakteri için 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir (194, 195) (**Resim 9**).



Resim 8. Spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC)



Resim 9. Doksan altı Kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak bakterilerin farklı şekerlerin bulunduğu besi yerlerinde biyofilm oluşumlarının belirlenmesi

3.2.2.5. Kullanılacak Çay Ekstraktlarının Hazırlanması

Metanol ve hekzan ekstraktı için kurutulmuş çay yaprağı ve yeşil çaydan 10'ar gr tartılmış ve üzerine 100 ml olacak şekilde metanol (%99,9) ve hekzan(%95) eklenmiştir. 45⁰C'de çalkalamalı etüvde 130 rpm'de karıştırılarak 48 saat bekletilmiştir.Elde edilen ekstrakt, Whatman no:1 filtre kağıdı (Whatman, Camlab Ltd., Cambridge, UK) kullanılarakvakum pompası yardımı ile süzdürülmüştür. Ekstrakt rotary evaporatöre (HeidolphHei-VAP Rotary Evaporatör Nuremberg, Almanya) yerleştirilerek, 60 devir/dk rotasyon hızında 40⁰C'de metanol ve hekzanın buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra kalan kısmın ağırlığı hesaplanmıştır. Materyal üzerine 10 ml distile su eklenmiş ve 121⁰C'de 20 dk süre ile steril edilmiştir.

Steril saf su kullanılarak hazırlanan ekstrakt için, yeşil çayın ve çay bitkisinin kuru yapraklarından 10 gr tartılmış ve 90 mlBHI ile 15 dk bekletilmiştir. Elde edilen ekstrakt Whatman no:1 filtre kağıdı (Whatman, Camlab Ltd., Cambridge, UK) kullanılarakvakum pompası yardımı ile süzdürülmüştür. Elde edilen ekstrakt, 121⁰C'de 20 dk süre ile steril edilerek kullanılmıştır.

3.2.2.6. ay Ekstraktlarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

3.2.2.6.1. ay Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

ay ekstraktlarının minimum inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesinde (MIC) ift katlı seri dilüsyon metodu kullanılmıştır.

Bitki materyallerine ait olan ekstraktlar ile iki katlı olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu hazırlanan dilüsyonların her birinden kuyucuklara 100 µL aktarılmıştır. Sonra her kuyucuğa 100 µl Müller Hilton sıvı besiyerinden ilave edilmiştir. Her bir kuyucukta 10^6 kob/ml olacak şekilde bakteri ilave edilerek 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petriler üzerine tetrazolium klorid (TTC) püskürtölerek üremenin olup olmadığı belirlenmiştir. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MIC olarak belirtilmiştir. Bakteri gelişmesinin görölmediği en düşük konsantrasyondan başlanarak üremenin olmadığı bütün konsantrasyonlardan Mitis Salivarius agara ekilerek 37°C 24 saat süre ile inkübasyondan sonra gelişme olup olmadığı kontrol edilmiş ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) olarak belirlenmiştir.

Chx karşılaştırma materyali olarak (250 µg/ml) kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır (142,169).

3.2.2.7. ay Ekstraktlarının Bakterilerin Biyofilm Oluşturmalarına Etkisi

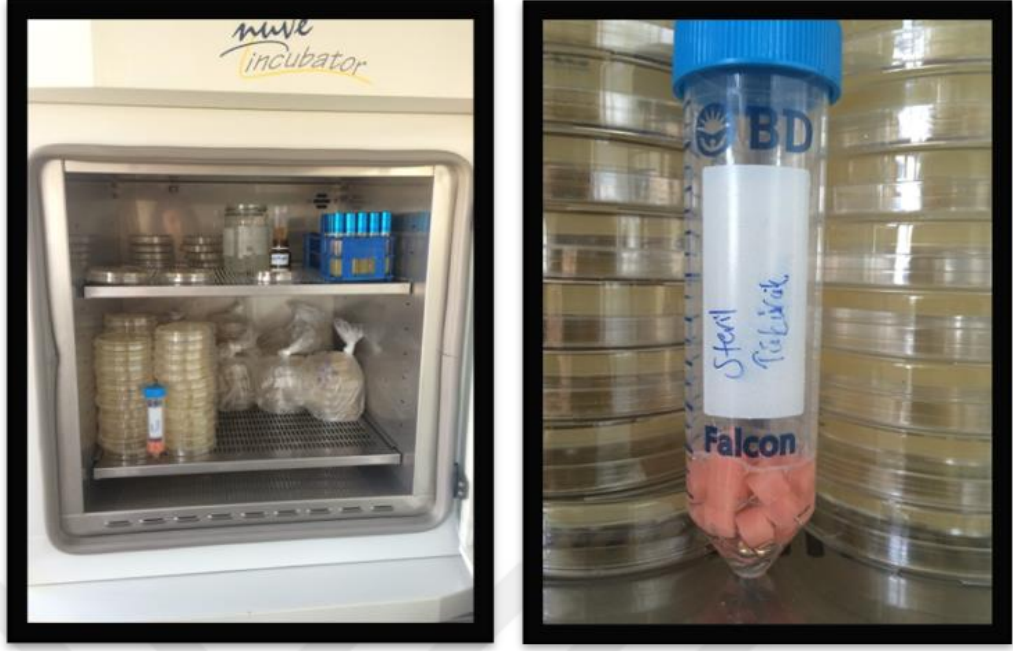
3.2.2.7.1. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşumuna ay Ekstraktlarının Etkisi

İzolatlar ayrı ayrı aktifleştirilmiştir. Bunun için her izolat uygun besiyerine ekilerek 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Her çalışmada 24 saatlik taze kültür kullanılmıştır.

Yer tutucu materyallerinin kaplanması için tükürük örnekleri toplanmıştır. Tükürük örnekleri, 2 ay öncesine kadar herhangi bir antibiyotik ve probiyotikli ürün kullanmamış olan ve sistemik bir hastalığı olmayan yer tutucu kullanan kişilerden yemekten en az bir saat sonra ve günün aynı saatinde stimüle edilmemiş 5 ml taze tükürük falcon tüpüne toplanmıştır ve 4°C 10.000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir (**Resim 10**). Daha sonra 56°C'de 30 dk su banyosunda bekletilmiştir. Üst faz şırıngayla çekilmiş ve 0.22'lik filtreden geçirilmiştir. Yer tutucu materyalleri filtrelenmiş tükürüğe alınmış ve üzerine 2 ml PBS konulmuştur. 37°C'de etüvde tüpler çevrilerek 20 dk bekletildikten sonra kullanılmıştır (169)(**Resim 11**).

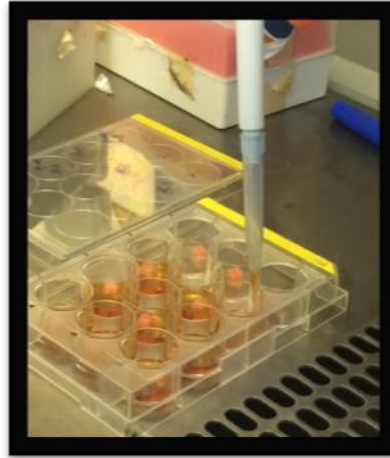


Resim 10. Santrifüj cihazı



Resim 11. Falcon tüpü içerisinde steril tükürük ve yer tutucu aparey materyallerinin etüvde beklemesi

Hazırlanan aparatlar 12 kuyucuklu plağa her bir kuyucuğa 1 adet olmak üzere alınmıştır. Her aparat üzerine *S. mutans* $3.3(10^8$ kob/ml) olacak şekilde ilave edilmiştir. Üzerine çalışılacak çaylar eklenmiştir. Çalışma 3 paralel olarak kurulmuştur. Koloni sayımı, biyofilm ve SEM için ayrı ayrı uygulama yapılmıştır. Bir grupta ise hiç çay ekstraktı kullanılmamıştır. Yani, besiyeri+çay ve besiyeri+bakteri olmak üzere kontroller oluşturulmuştur (**Resim 12**). Daha sonra plaklar anaerobik etüvde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 12. Tükürük ile kaplanmış yer tutucu apareyleri üzerine çay ekstraktlarının eklenmesi

Yeşil çay metanol ekstraktı için her kuyucuğa; 75 ml (10^8 µl/ml) bakteri aktarılarak üzerine yeşil çayın metanol ekstraktından 400 ml (975 µl/ml) ve 2525 ml besiyeri (BHI %2 glukozlu) ilave edilmiştir.

Kuru çay metanol ekstraktı için her kuyucuğa; 75 ml (10^8 µl/ml) bakteri aktarılarak üzerine 400 ml kuru çay metanol ekstraktı (975 µl/ml) ve 2525 ml besiyeri (BHI %2 glukozlu) ilave edilmiştir.

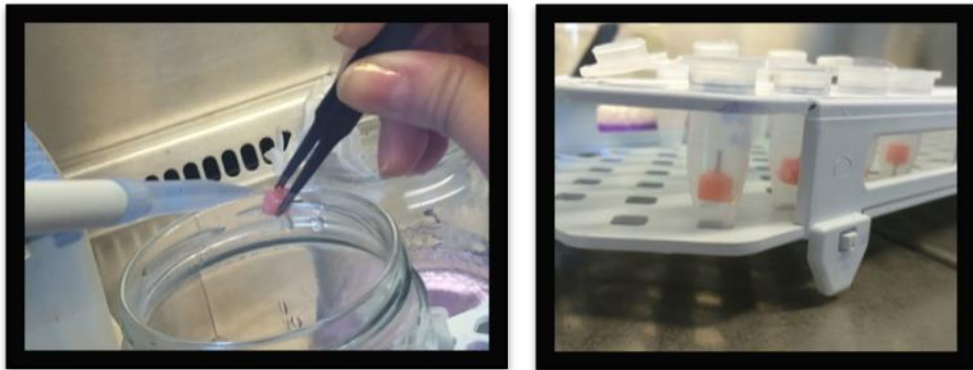
Yeşil çay steril su ekstraktı için; 75 ml (10^8 µl/ml) bakteri aktarılarak üzerine kuru çay metanol ekstraktı 300 ml ve 2625 ml besiyeri (BHI %2 glukozlu) ilave edilmiştir.

Kuru çay su ekstraktı için; 75 ml (10^8 µl/ml) bakteri aktarılarak üzerine kuru çay metanol ekstraktından 300 ml ve 2625 ml besiyeri (BHI %2 glukozlu) ilave edilmiştir.

Tüm örneklerde %0,12'lik Chx, pozitif kontrol için kullanılmıştır.

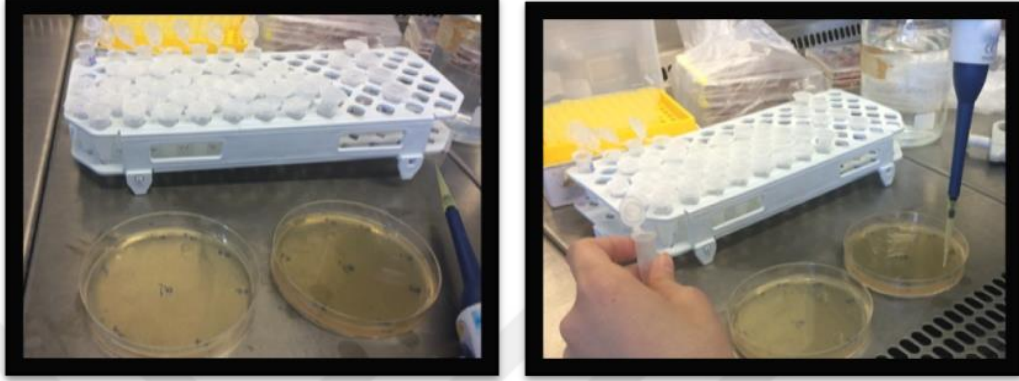
3.2.2.7.1.1. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşturan Canlı Koloni Sayısının Belirlenmesi

Biyofilm için hazırlanan ve 24 saat inkübe edilen kuyucuklardaki aparatlar PBS'yle 3'er kez yıkanmış ve 1.5 ml'lik steril ependorflara alınıp üzerine 1 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS) eklenmiştir (**Resim 13**).



Resim 13. Yer tutucu örneklerinin PBS ile 3 kez yıkanması ve ependorflara alınması

Dört dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. FTS kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan BHI agara 10 mm alınarak damlatma plak yöntemi ile ekim yapılmış ve plaklar 37°C'de %10 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübe edilmiş ve oluşan koloniler sayılmıştır (**Resim 14**).



Resim 14. Ependorflarda hazırlanan seri dilüsyonlar ve damla ekim işlemi

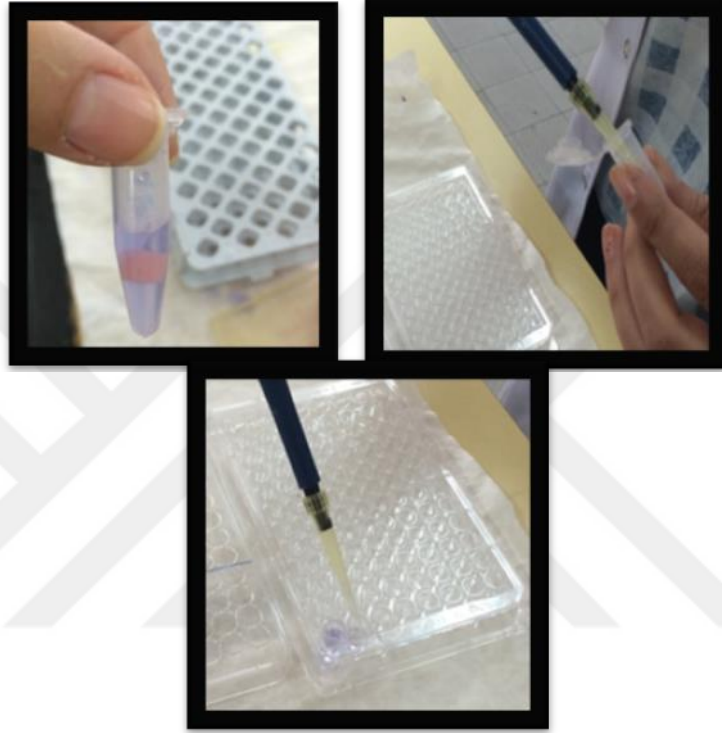
3.2.2.7.1.2. Yer Tutucu Materyallerinde Biyofilm Oluşumunun Spektrofotometre Kullanılarak Değerlendirilmesi

Seçilen izolatların yer tutucu aparatları üzerinde biyofilm oluşumlarına çay ekstraktlarının etkisinin incelenmesi için mikrotitrasyon plaka yöntemi kullanılmıştır. Biyofilm için hazırlanan ve 24 saat inkübe edilen kuyucuklardaki aparatlar FTS'yle yıkayıp ependorflara alınmıştır. Üzerlerine 1 ml %90'lık metanolden konularak 15 dk bekletilmiştir. Metanol dökülüp kurutulduktan sonra 1 ml %2'lik kristal viyole eklenip 5 dk bekletilmiştir (**Resim 15**).



Resim 15. Ependorflara kristal viyole eklenmesi

Ependorf içindeki aparat yıkanarak başka bir ependorfa alınmış ve kuruması sağlanmıştır. Üzerlerine 1 ml %33'lük (v/v) glasiyel asetik asit konulmuştur. Ependorflar karıştırılarak ve içlerinden 200 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır (**Resim 16**). Üç paralel çalışılmış ve örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ile 570 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.



Resim 16. %33'lük glasiyel asit bulunan ependorflardan alına örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarılması

3.2.2.7.2. SEM için Aparatlarda Örnek Hazırlama ve Görüntü Alınması

Örnekler hazırlanırken, cacodylate tamponun ideal pH aralığı 6.4-7.4 aralığında ve aynı zamanda son konsantrasyon 0.1 M olmalıdır. Bu nedenle 0.2 M ve 50 ml cacodylate buffer hazırlamak için 2,143 gr sodium cacodylate tartılmış ve 50 ml'de çözülmüştür. 0.1M için ise hazırlanan 0.2 M cacodylate bufferdan yarı yarıya sulandırma yapılmıştır. 25 ml 0.2 M'den alınıp 25 ml distile su ilave edilmiştir. 0.1 M'lik tampon hazırlanmıştır. %2.5'lik gluteraldehit 0.1 M cacodylate buffer içinde hazırlanmıştır. %1'lik Osmium tetroksit (OsO_4) 0.1 M cacodylate buffer içinde hazırlanmıştır ve 0.1 gr OsO_4 üzerine 10 ml cacodylate buffer eklenmiştir. Alkol serileri için hazırlanmıştır (**Tablo 1**). Her bir seri için 50 ml hazırlanmıştır.

Tablo 1. Alkol serileri için gerekli alkol ve distile su miktarları

Alkol serileri	%100 alkol	Distile su
%30'luk için	15 ml	35 ml
%50'lik için	25 ml	25 ml
% 70'lik için	35 ml	15 ml
% 90'luk için	45 ml	5 ml
% 100'lük için	50 ml

Örnekler hazırlandıktan sonra görüntü elde edebilmek için hücreler 0.1 M cacodylate tampon ile yıkandıktan sonra %2,5'lik gluteraldehit ile oda sıcaklığında 1-1,5 saat fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra örnekler cacodylate tampon ile tekrar yıkanmıştır. %1'lik OsO₄ ile 1 saat post-fiksasyon yapılmıştır. Cacodylate tampon ile 2-3 kez tekrar yıkanmıştır. Alkol serileri ile dehidratasyon işlemi yapılmıştır ve iki kez tekrarlanmıştır (**Tablo 2**).

Tablo 2. Tez çalışmasında alkol serilerinin dehidratasyon işleminde kullanım oranları ve süreleri

Alkol oranı	Uygulama süresi
%30	15 dk
%50	15 dk
%70	15 dk
%90	15 dk
%100	15 dk

Alkol serilerinden sonra hemen Critical Point Dryer'da kurutma işlemi yapılmıştır (yaklaşık 1 saat sürüyor). Daha sonra örnekler 40 mA'da 1 dk altın ile kaplanmış ve SEM'de incelenmiştir.

3.3. İn Vivo Çalışma

3.3.1. Gereç ve Yöntem

Araştırmamıza başlamadan önce çalışma gruplarımızın sayılarını belirlemek amacıyla 'Power Analiz' testi yapılmıştır. Bu analizin sonuçları doğrultusunda; Süleyman Demirel Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na başvuran hastalar arasında, 6-10 yaş aralığında, tamamen sağlıklı, üst çenesinde

birinci ve/veya ikinci süt azı dişini erken kaybetmiş veya eksikliği olan, son 2 ay içerisinde antibiyotik, probiyotikli ürün kullanmamış, flor uygulaması yaptırılmamış olan, alınan anamnezinde herhangi bir ürüne (zellikle yapısında polifenol olan) alerjisi olmayan, standardizasyonun sağlanması için Dentocult® SM (Orion Diagnostica, Finland) sistemi ile yapılan lmde *S.mutans* sayısı $\leq 10^5$ olan 63 hastanın seçilmesi planlanmıştır.

Çalışmamızda hasta grubunun tespit edilmesinden önce belirtilen kriterlere uyan 18 hastanın dahil olduğu pilot bir çalışma yapılmıştır.

Hastalara oral hijyen eğitimi verilip, diş fırçaları ve macunları tarafımızdan sağlanmıştır. Hastaların alt ve üst enelerinden fabrikasyon kaşıklar kullanılarak alginat ile ölçü alınmıştır. Hastaların alınan ölçüleri ile alçı modelleri oluşturulup, her hastaya özel yer tutucu apareyleri yapılmıştır. Apareyler hastalara verilmeden önce %70'lik alkol ile dezenfekte edilmiştir.

Hastalar, 3 gruba ayrılmıştır; 1. grup yeşil çay methanol ekstraktı ile gargara yapacak grup, 2. grup yeşil çay su ekstraktı ile gargara yapacak grup, 3. grup steril saf su ekstraktı ile gargara yapacak gruptur. Her grup kendi içinde 3 alt gruba ayrılmıştır, 1. grup akril materyal, 2. grup fiber materyal, 3. grup ise metal materyalden oluşan disklerin bulunduğu apareyleri kullanmıştır.

Kullanılacak apareylerin tamamı üst çene için hazırlanmıştır. Üç tane sağ çenede, 3 tane sol çenede olmak üzere toplam 6 disk boşluğu bulunmaktadır. Bu boşluklara 3 farklı grup için akrilik, metal ve fiber materyalden hazırlanan diskler yerleştirilmiştir (**Resim 17**).



Resim 17. Hazırlanan ağız içi aparey

Çalışma prosedürü, 3 hafta (21 gün) süresince günde 2 defa 15 ml 10 sn çalkalama yapılması şeklinde planlanmıştır. Çalışma öncesinde, 1, 2, ve 3. hafta sonundaplak indeksi, diş etikanama indeksi, *S. mutans* sayımının yapılması planlanmıştır. Birinci, 2. ve 3. haftanın sonunda, ağızda bulunan yer tutucu oluşturan materyallerden yapılan disklerin bir tanesinin alınarak Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na biyofilm formasyonunun incelenmesi için soğuk zincir ile gönderilmesi planlanmıştır.

Yeşil çay ekstraktlarının hazırlanması; çalışmamız için gerekli yeşil çay ekstraktı in vitro çalışmada hazırlandığı gibi hazırlanmıştır. Ekstraktlar hastalarda kullanılmadan önce; yeşil çay metanol ekstraktı %3 gr/ml, steril saf su ekstraktı ise %10gr/ml konsantrasyonda olacak şekilde steril saf su ile dilüe edilmiştir. Ekstraktlar hastalara verilmeden önce taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlar kullanılmadan önce otoklavda steril edilmiştir. Ekstraktlar hastalara daha önceden steril edilen koyu renkli 250 ml'lik şişeler ile verilmiştir. Şişeler seçilirken kapaklarının günlük gargara dozuna uygun hacimde olmasına dikkat edilmiştir.

Hastalardan 1., 2. ve 3. haftalarda alınan örneklerde biyofilm formasyonunun canlı/ölü bakteri kiti ile incelenmesi ve KLTM ile görüntülenmesi planlanmıştır.

3.4. İstatistik Analizleri

Farklı ay ekstralarının ağız ortamından izole edilen ve hazır alınan bakterilerin biyofilm oluşumlarına etkileri ve yer tutucu apareylerinde biyofilm oluşumuna karşı uygulanan çay ekstraktlarının etkisi Minitab 16.1.0 (2010) paket programı kullanılarak ANOVA varyans analiz tekniği ile yapılmıştır ($p<0,05$).



4. BULGULAR

4.1. İn Vitro Çalışma

4.1.1. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

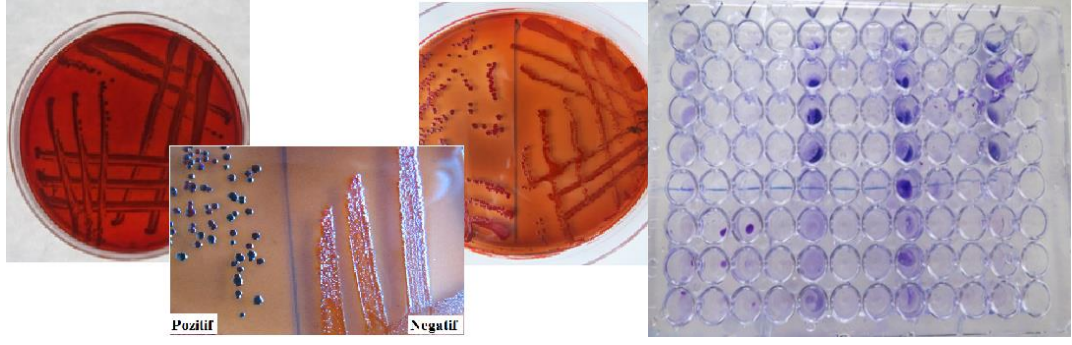
Yer tutucu kullanan çocuk hastalardan izole edilen bakteriler arasından seçilen yüksek biyofilm oluşturan 4 bakteri ve bir adet standart suşun, 6 farklı şeker eklenerek hazırlanan besi yerlerinde mikrotitrasyon plaka yöntemi ile biyofilm oluşumları belirlenmiş ve tabloda verilmiştir (**Tablo 3**).

Tablo 3. Bakterilerin farklı şekerlerin bulunduğu besi yerlerinde biyofilm oluşturma özellikleri

Bakteri	Glikoz	Fruktoz	Galaktoz	Laktoz	Maltoz	Rafinoz	Sükroz
<i>S.dysgalactiae</i> 6.1.4.1	+++	+++	++	+++	+++	++	+++
<i>S. mutans</i> 3.3	+++	+++	+++	+++	-	+	+++
<i>E. faecium</i> 10.2	+	+	-	+	-	-	++
<i>S. anginosus</i> 2.1b	++	++	+	+	+	+	++
<i>S.mutans</i> ATTC 25175	++	-	-	-	-	-	++

OD₅₇₀<0,120 =(-); OD₅₇₀< 0,240=(+); OD₅₇₀< 0,500= (++); OD₅₇₀> 0,500= (+++)

Karşılaştırılan bakteriler arasında ağız içerisinden izole edilen *S.mutans*3.3'in diğer bakterilere göre tüm şekerlerde daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Standart suş olan *S.mutans*3.3'in ise en düşük oranda biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Seçilen izolatların biyofilm oluşturma potansiyeli CRA'da da ayrıca gözlenmiş ve sükroz içeren CRA plaklarda bütün test bakterilerinin koyu siyah renkli koloniler oluşturduğu görülmüştür. Biyofilm oluşumu en çok glikoz ve sükrozda gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak yer tutucu apareylerini oluşturan örnekler üzerinde çalışılırken ağız ortamından izole edilen *S.mutans* 3.3 kullanılmıştır (**Şekil 1**).

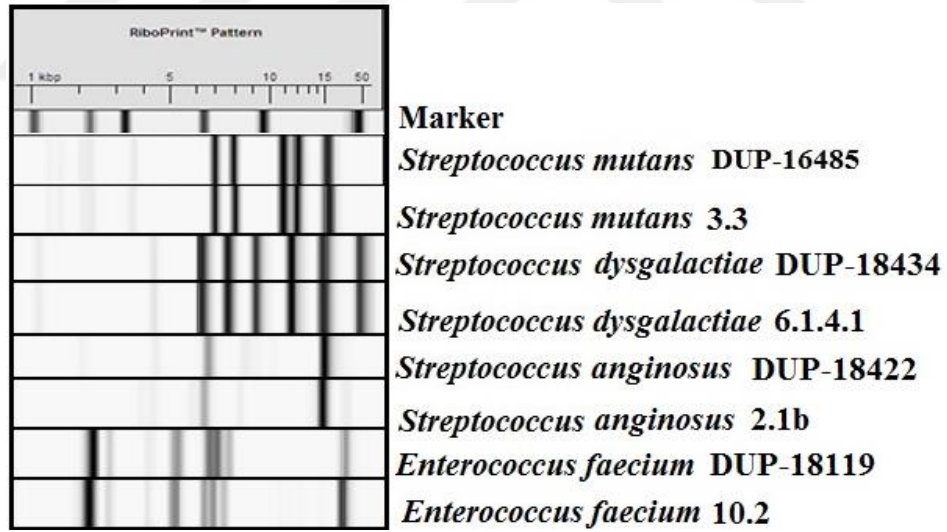


Şekil 1. Biyofilm oluşumunun CRA plakta ve mikrotitrasyon plakta görünüşü

a- Biyofilm pozitif b- Biyofilm negatif c- Mikrotitrasyon plağı

4.1.2. Seçilen İzolatların Tanımlanması

Test bakterilerinin Gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucunda hepsinin Gram pozitif kok ve katalaz negatif olduğu olduğu saptanmıştır. Otomatik riboprinter sisteminde, EcoRI kullanılarak yapılan tanımlamada ise izolatların *S. dysgalactiae*, *S. mutans*, *S. anginosus* ve *E. faecium* olduğu görülmüştür (Şekil 2).

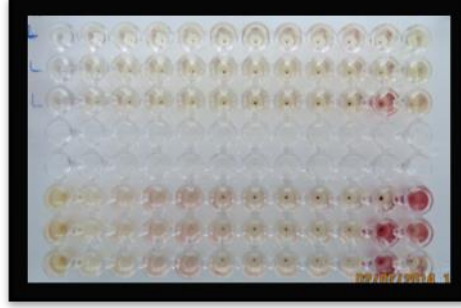


Şekil 2. İzolatlara ait riboprinter sisteminden elde edilen bant profilleri ile dört türe ait standart bant profilleri

4.1.3. Çay Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

S. dysgalactie 6.1.4.1, *S. mutans* 3.3, *E. faecium* 10.2, *S. anginosus* 2.1.b ve *S. mutans* ATCC25175 için yeşil çayın ve çay bitkisinin kuru yapraklarından elde edilen

metanol, hekzan ve su ekstraktlarının mikrodilüsyon yöntemi ile MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. MIC değerlerinin mikrotitrasyon plağında belirlenmesi

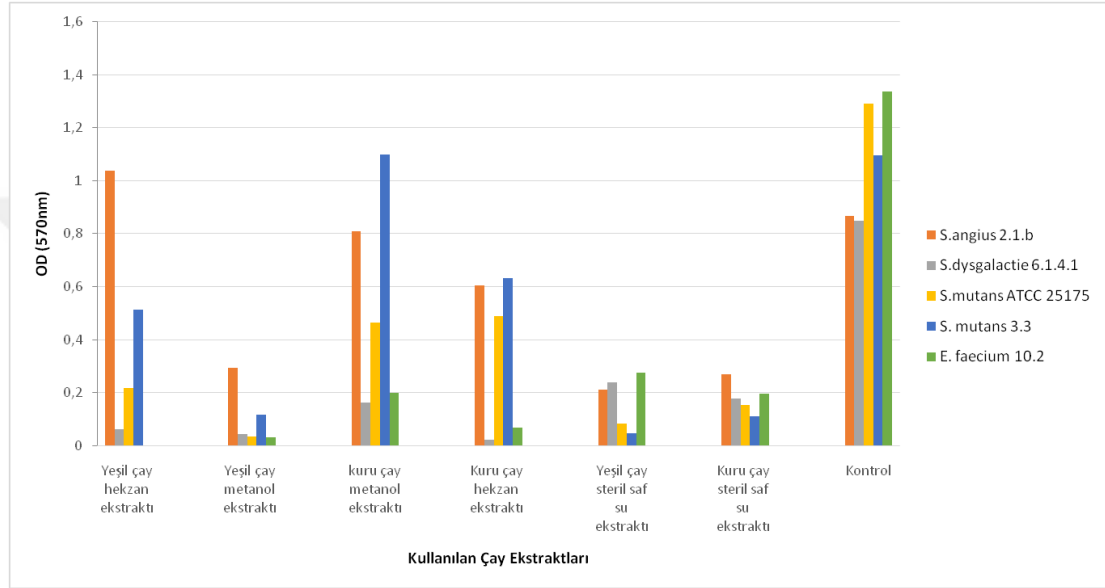
Ekstraktların hiç birisinin test bakterileri üzerine bakterisidal etkili olmadığı görülmüştür. Ekstraktlar bakteriyostatik etki göstermiştir. MIC değeri ekstraktlara göre değişmiştir. Kuru çay ekstraktının MIC değeri 125-625 µg/ml arasında değişirken, yeşil çay ekstraktının MIC değerleri 625-1250 µg/ml arasında olmuştur. Chx için MIC değeri 0.0011 mg/ml'dir (Tablo 4).

Tablo 4. Çay ekstraktlarının çalışmada kullanılan bakterilere karşı MIC ve MBC değerleri

Bakteri	Steril saf su				Kuru çay				Yeşil Çay					
	Kuru çay		Yeşil çay		Kuru çay metanolekstraktı		Yeşil çay metanolekstraktı		Kuru çay hekzanekstraktı		Yeşil çay hekzanekstraktı		Klorheksidin	
	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
<i>S. dysgalactie</i> 6.1.4.1	125	-	625.0	-	63.5	-	15.0	-	11.7	-	0.0011	-	0.0011	≤0.0011
<i>S. mutans</i> 3.3	312.5	-	1250	-	63.5	-	30.0	-	23.4	-	0.0011	-	0.0011	≤0.0011
<i>E. faecium</i> 10.2	312.5	-	625.0	-	63.5	-	45.0	-	46.4	-	0.0011	-	0.0011	≤0.0011
<i>S. anginosus</i> 2.1b	625.0	-	1250	-	63.5	-	30.0	-	23.4	-	0.0011	-	0.0011	≤0.0011
<i>S. mutans</i> ATTC 25175	312.5	-	625.0	-	63.5	-	30.0	-	23.4	-	0.0011	-	0.0011	≤0.0011

4.1.4. Çay Ekstraktlarının Test Bakterilerinin Biyofilm Oluşturmalarını Engelleme

Çay ekstraktlarının test bakterilerinin biyofilm oluşturmalarını engellenmesinin belirlenmesinde kullanılan mikrotitrasyon plaka yöntemine ait bulgular **Grafik 1**'de verilmiştir.



Grafik 1. Çay ekstraktlarının test bakterilerinin biyofilm oluşturmalarına etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi

Yeşil çay ve kuru çay yaprağı ekstraktlarının ağızdan izole edilen bakterilerin biyofilm oluşturmalarına etkileri spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ile değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık tüm gruplarda önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Tüm grupların etkin olduğu belirlenmiştir. Ekstraktlar arasında yeşil çayın metanol ekstraktının tüm bakteri türleri için en etkili olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).

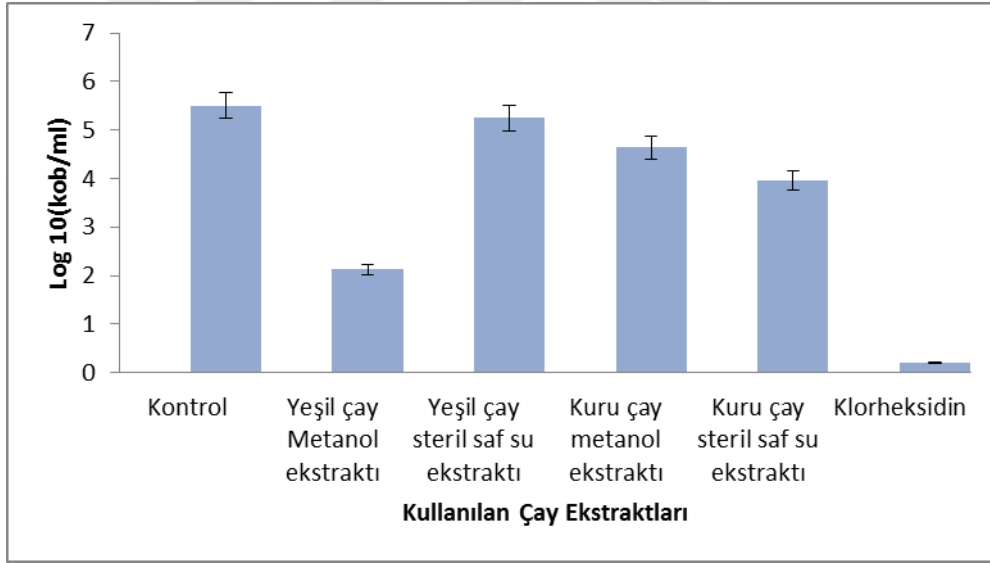
4.1.5. Çay Ekstraktlarının Yer Tutucu Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Yer tutucu materyallerde test bakterisi olarak sadece *S. mutans* 3.3 kullanılmıştır. Yer tutucu materyallerin üzerinde *S. mutans* 3.3'ün biyofilm

oluşturmasına karşı çay ekstraktlarının etkisinin izlenmesi iki yöntemle yapılmıştır. Bunlardan biri canlı bakteri sayımı, diğeri ise mikrotitrasyon plak yöntemidir.

4.1.5.1. Akrilik Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular

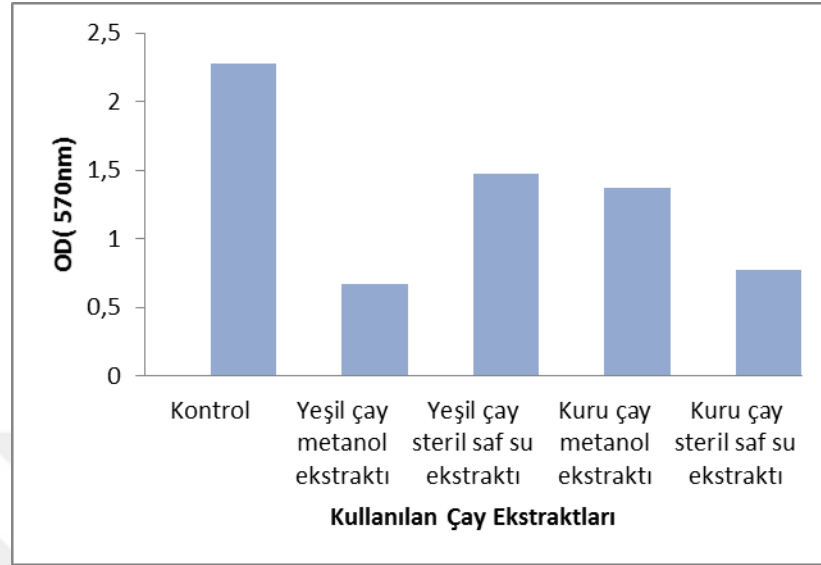
Yer tutucu oluşturan akrilik materyallerin üzerinde *S.mutans* 3.3'ün biyofilm oluşturmasına çay ekstraktlarının etkisi farklı olmuştur. Akrilik materyallerde, biyofilm oluşturan mikroorganizma sayısı logaritmik birimde, çay eklenmeyen kontrol aparatlarda 5,508 kob/ml olurken, klorheksidinde 0,2 kob/ml, yeşil çay metanol ekstraktında ise 2,132 kob/ml olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise, yeşil çay steril saf su ekstraktında 5,25 kob/ml, kuru çay metanol ekstraktında 4,638 kob/ml ve kuru çay steril saf su ekstraktında 3,96 kob/ml olarak belirlenmiştir (Grafik 2).



Grafik 2. Yer tutucu oluşturan akrilik materyaller üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakteri sayılarının (log₁₀ kob/ml) karşılaştırılması

Spektrofotometrik ölçümlerde de bakteri sayılarına paralel sonuçlar elde edilmiştir. Biyofilm oluşumunun gözlemlendiği optik dansite değerleri (OD 570nm), çay ekstraktı eklenmeyen kontrol materyallerde 2,279, klorheksidin eklenen materyallerde 0,279, yeşil çay metanol ekstraktı eklenen materyallerde ise 0,667 olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise yeşil çay steril saf su ekstraktı eklenen grupta

1,474, kuru çay metanol ekstraktı olan grupta 1,372 ve kuru çay steril saf su ekstraktı olan grupta 0,777 olarak belirlenmiştir (**Grafik 3**).



Grafik 3. Yer tutucu oluşturan akrilik materyaller üzerinde, biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi

Yer tutucu oluşturan materyallerden, akrilik materyallere uygulanan yeşil çay ve kuru çay yaprağı ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine olan etkileri spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ve biyofilm oluşturan canlı bakteri sayısı ile değerlendirildiğinde istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Yapılan istatistiksel analizde, çay ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Çay ekstraktları arasında ise yeşil çay metanol ekstraktının etkisinin en yüksek olduğu belirlenmiştir (**Tablo 5**).

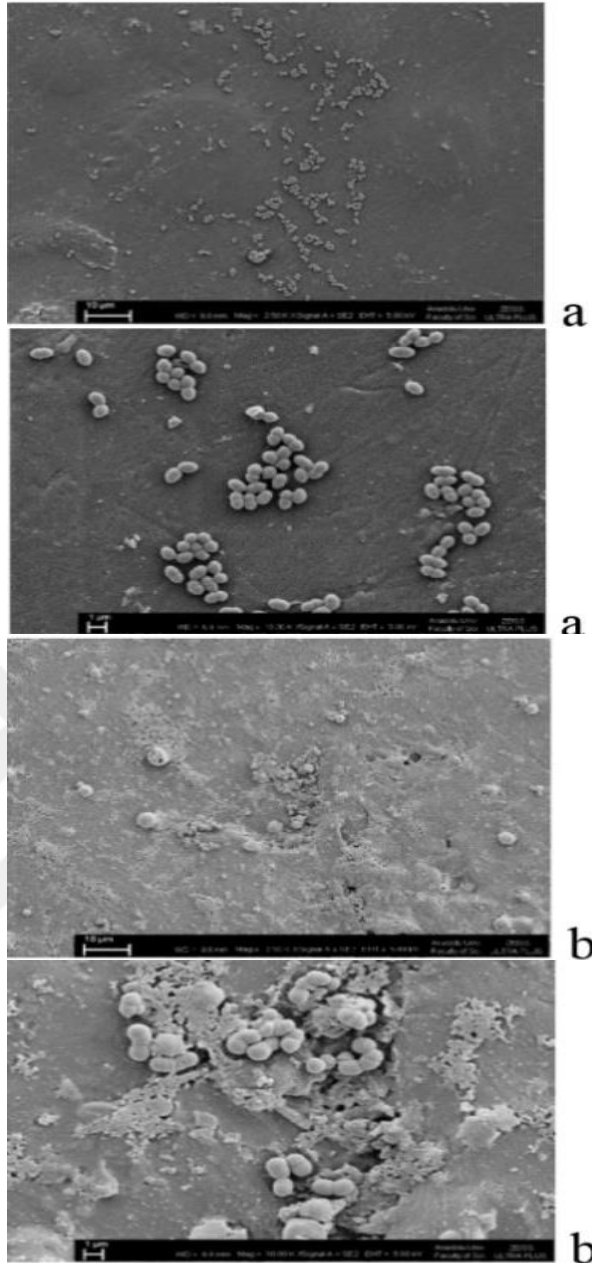
Tablo 5. Akrilik materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi

Kullanılan ekstrakt	Ortalama mikrotitrasyon plak OD değeri	Standart hata	Ortalama bakteri sayısilog10 (kob/ml)	Standart hata
Klorheksidin	0,81552 ^d	0,0259	0,2000 ^f	0,1732
Kontrol	6,8374 ^a	0,4985	5,5060 ^a	0,0468
Yeşil çay metanolekstrakt	1,6394 ^{cd}	0,2566	2,1287 ^e	0,0437
Yeşil çay steril saf suekstraktı	4,4244 ^b	0,4432	5,2510 ^b	0,0372
Kuru çay metanol ekstraktı	4,1161 ^b	08529	4,6267 ^c	0,1214
Kuruçay steril saf suekstraktı	2,3316 ^c	0,6610	3,9557 ^d	0,0143

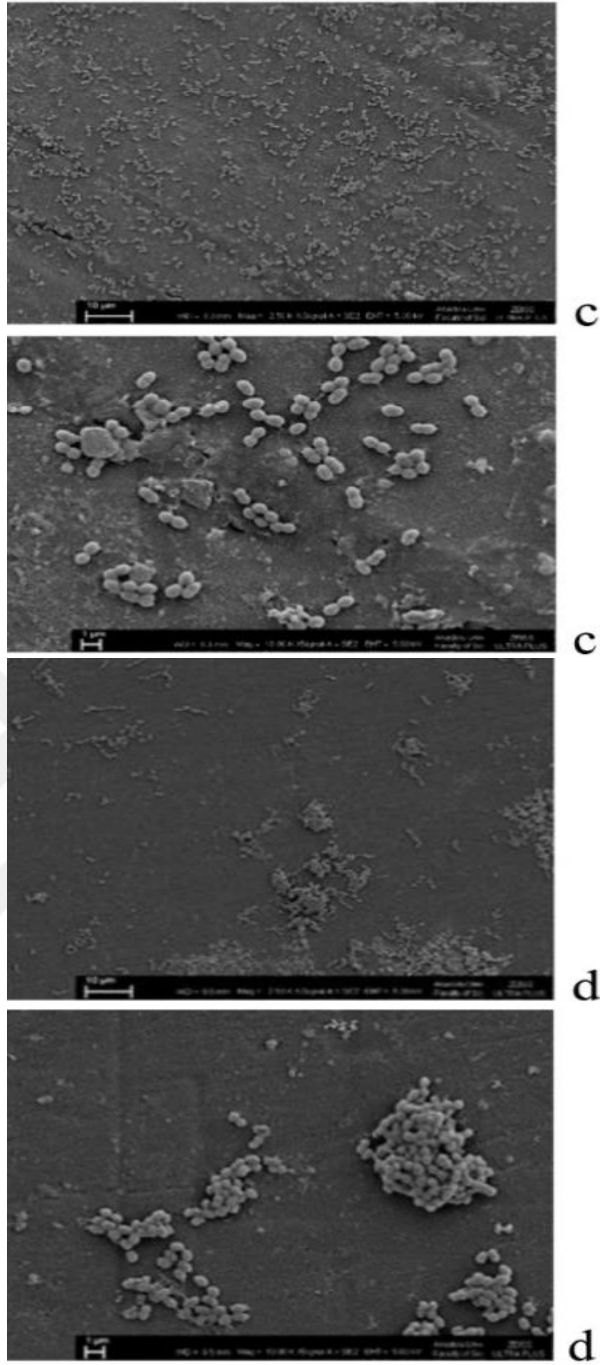
*Üst karakter farklı simgeler, gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (p<0.05).

4.1.5.2. Akrilik Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları

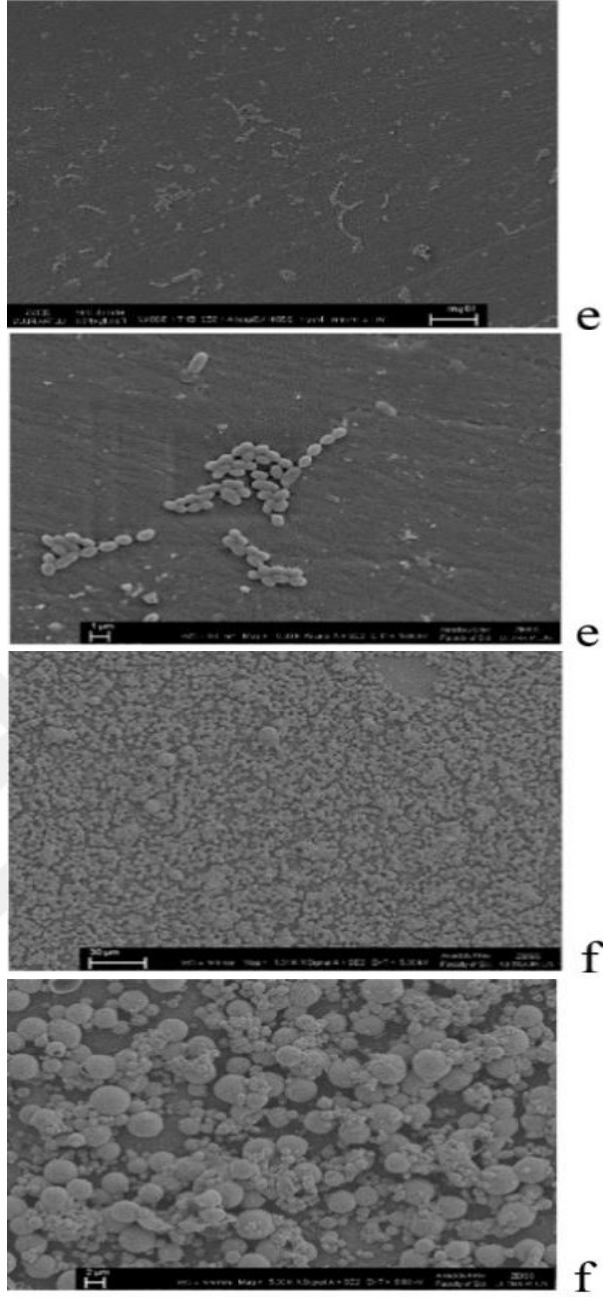
Tüm gruplarda SEM görüntüleri ile biyofilm oluşumu doğrulanmıştır. SEM görüntülerinde, yer tutucu oluşturan akrilik materyallerin yüzeyini kaplayan yoğun bakteri toplulukları ve bu bakterilerin akrilik yüzeyine ve birbirlerine bağlanmasını sağlayan ekstrasellüler matriks oluşumu görülmüştür (**Şekil 4**).



Şekil 4a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b.Yeşil çay metanol ekstraktı



Şekil 4b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su ekstraktı d. Kuru çay metanol ekstraktı

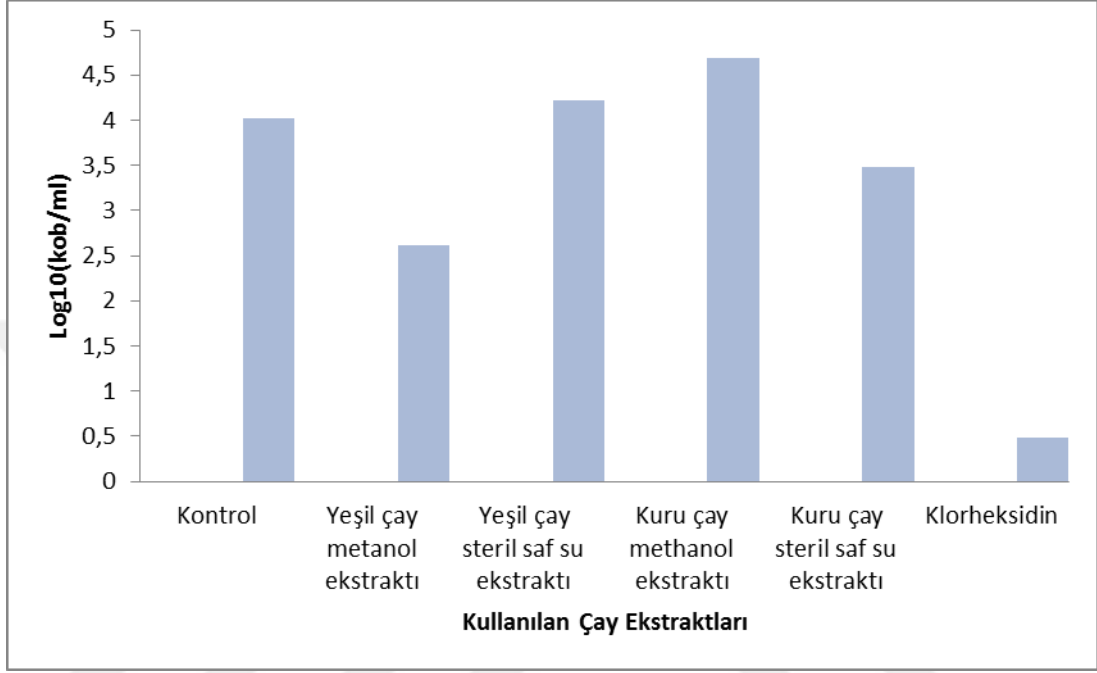


Şekil 4c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı akrilik materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin

4.1.5.3. Metal Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular

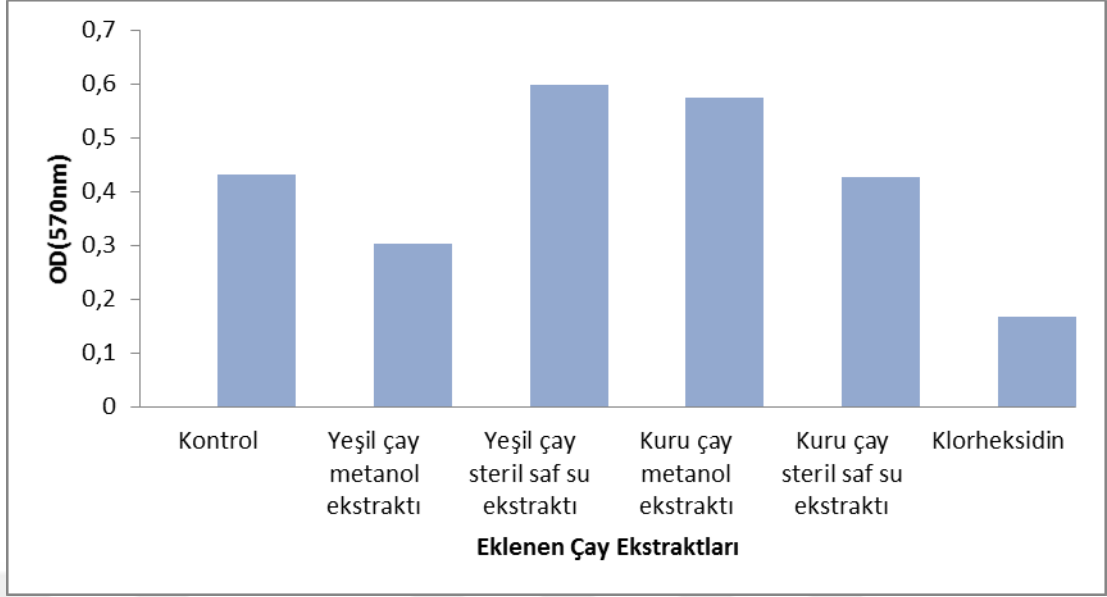
Yer tutucu oluşturan metal materyallerin üzerinde *S.mutans 3.3*'ün biyofilm oluşturmasına çay ekstraktlarının etkisi farklı olmuştur. Metal materyallerde biyofilm oluşturan mikroorganizma sayısı logaritmik birimde, çay eklenmeyen kontrol

aparatlarda 4,024 kob/ml, klorheksidinde 0,477 kob/ml, yeşil çay metanol ekstraktında ise 2,61 kob/ml olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise yeşil çay steril saf su ekstraktında 4,226 kob/ml, kuru çay metanol ekstraktında 4,693 kob/ml ve kuru çay steril saf su ekstraktında 3,479 kob/ml olarak belirlenmiştir (**Grafik 4**).



Grafik 4. Yer tutucu oluşturan metal materyaller üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakterisayılarının (log10 kob/ml) karşılaştırılması

Spektrofotometrik ölçümlerde de bakteri sayılarına paralel sonuçlar elde edilmiştir. Biyofilm oluşumunun gözlemlendiği optik dansite değerleri (OD 570nm), çay ekstraktı eklenmeyen kontrol materyallerde 0,431, Chx eklenen materyallerde 0,167, yeşil çay metanol ekstraktı eklenen materyallerde ise 0,303 olarak belirlenmiştir. Diğer gruplara ise yeşil çay steril saf su ekstraktı eklenen grupta 0,598, kuru çay metanol ekstraktı olan grupta 0,574 ve kuru çay steril saf su ekstraktı olan grupta 0,426 olarak belirlenmiştir (**Grafik 5**).



Grafik 5. Yer tutucu oluşturan metal materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi

Yer tutucu oluşturan materyallerden, metal materyallere uygulanan yeşil çay ve kuru çay yaprağı ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine olan etkileri spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ve biyofilm oluşturan canlı bakteri sayısı ile değerlendirildiğinde, istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Yapılan istatistiksel analizde, çay ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Çay ekstraktları arasında ise yeşil çay metanol ekstraktının etkisinin en yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (**Tablo 6**).

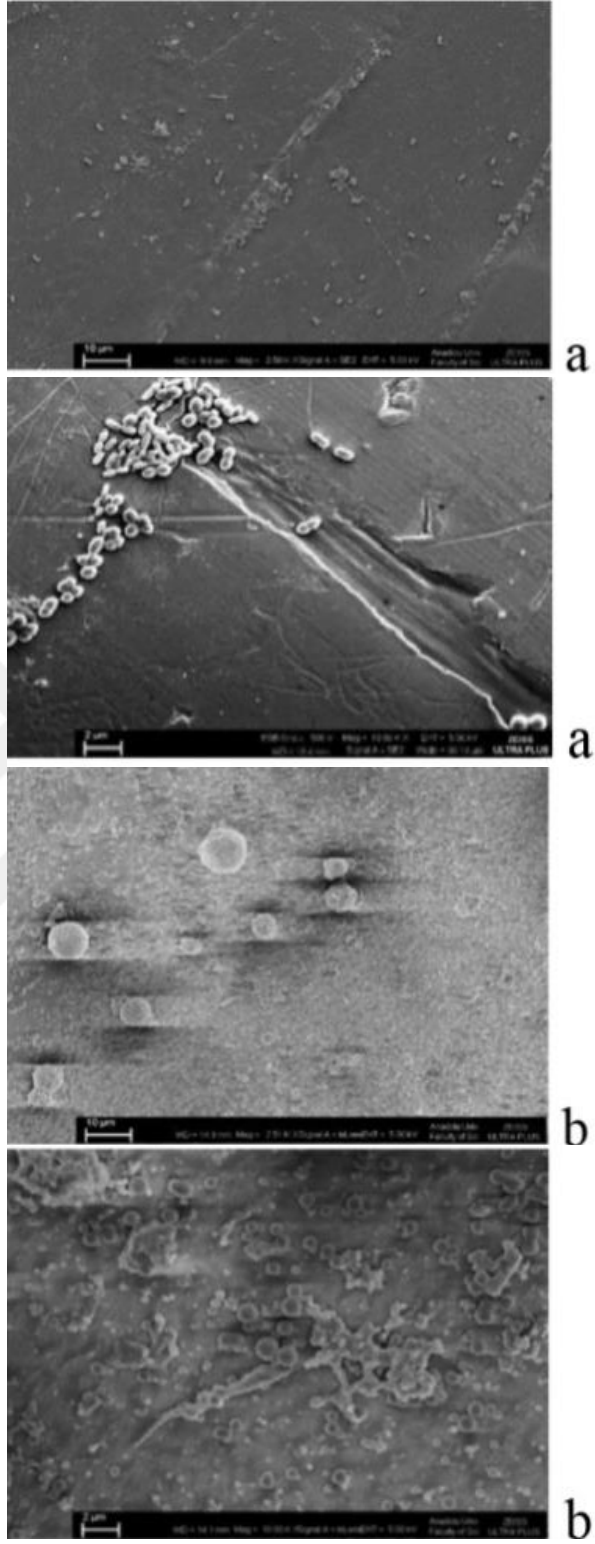
Tablo 6. Metal materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi

Kullanılan ekstrakt	Ortalama Mikrotitrasyon Plak OD değeri	Standart hata	Ortalama bakteri sayısı (log ₁₀ kob/m)	Standart hata	
Klorheksidin	0,1679 ^c	0,0399	0,4567 ^d	0,1504	0,176
Kontrol	1,2931 ^{ab}	0,1330	4,0233 ^{ab}	0,0068	4,02
Yeşil çay metanol ekstraktı	0,9099 ^b	0,5907	2,1787 ^c	0,2726	2,161
Yeşil çay steril saf su ekstraktı	1,7957 ^a	0,2534	4,2267 ^a	0,4203	4,009
Kuru çay metanol ekstraktı	1,7232 ^a	0,4684	4,6067 ^a	0,3539	4,726
Kuru çay steril saf su ekstraktı	1,2788 ^{ab}	0,0487	3,4567 ^b	0,1779	3,479

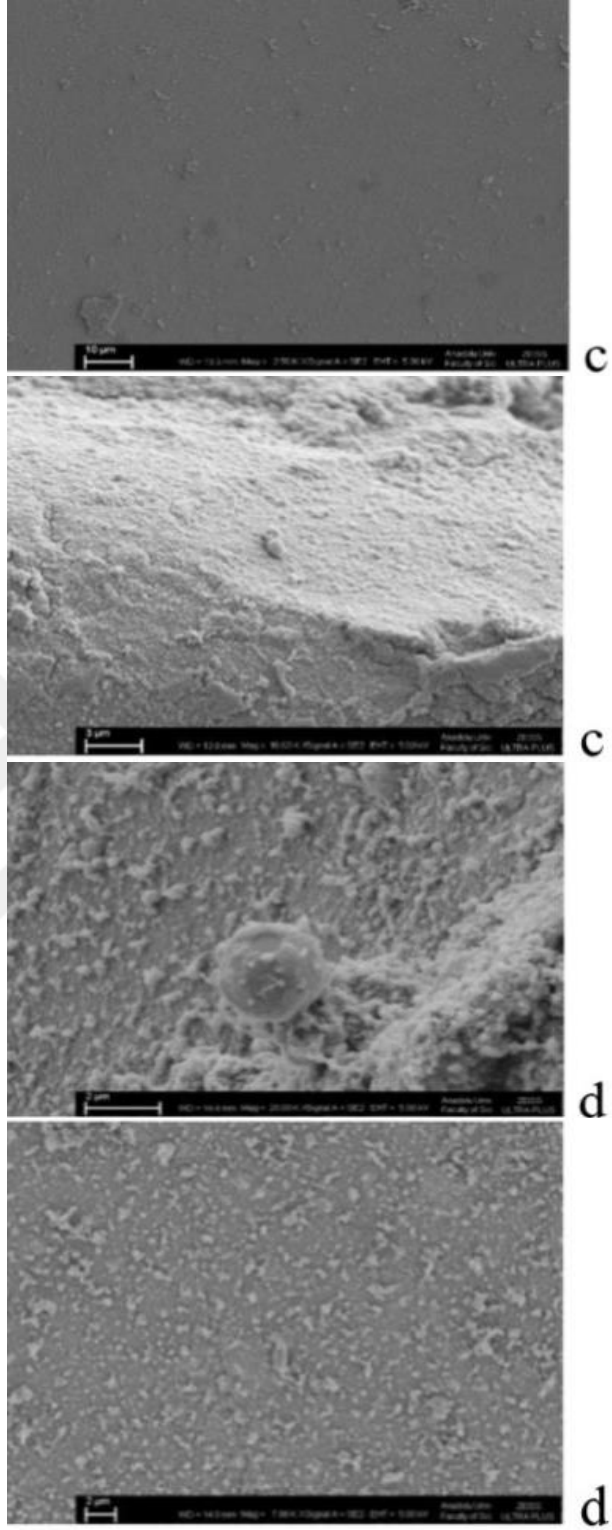
*Üst karakter farklı simgeler, gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (p<0.05).

4.1.5.4. Metal Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları

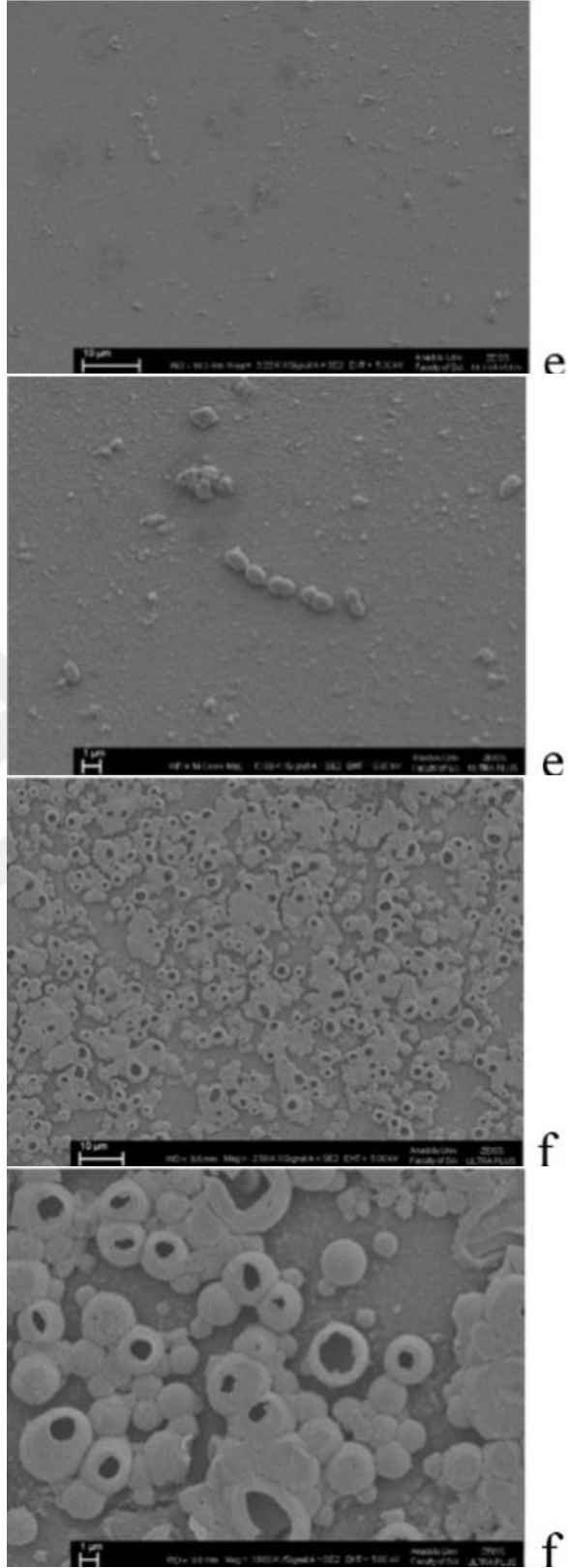
Tüm gruplarda SEM görüntüleri ile biyofilm oluşumu doğrulanmıştır. SEM görüntülerinde yer tutucu oluşturan metal materyallerin yüzeyini kaplayan yoğun bakteri toplulukları ve bu bakterilerin akrilik yüzeyine ve birbirlerine bağlanmasını sağlayan ekstrasellüler matriks oluşumu görülmüştür (Şekil 5).



Şekil 5a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b.Yeşil çay metanol ekstraktı



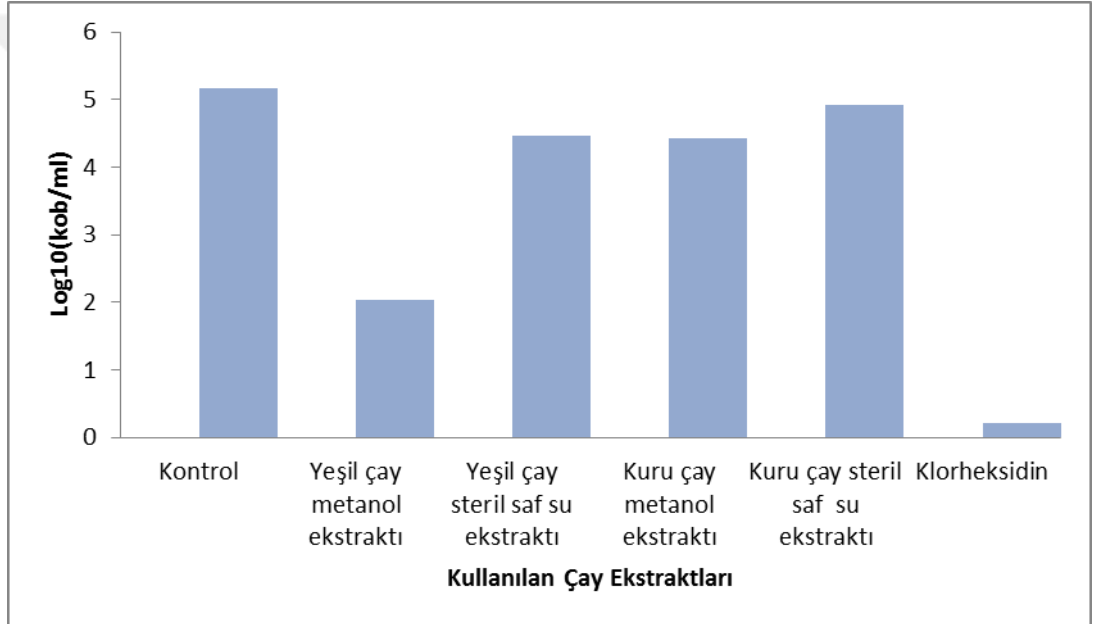
Şekil 5b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su ekstraktı d. Kuru çay metanol ekstraktı



Şekil 5c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı metal materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin

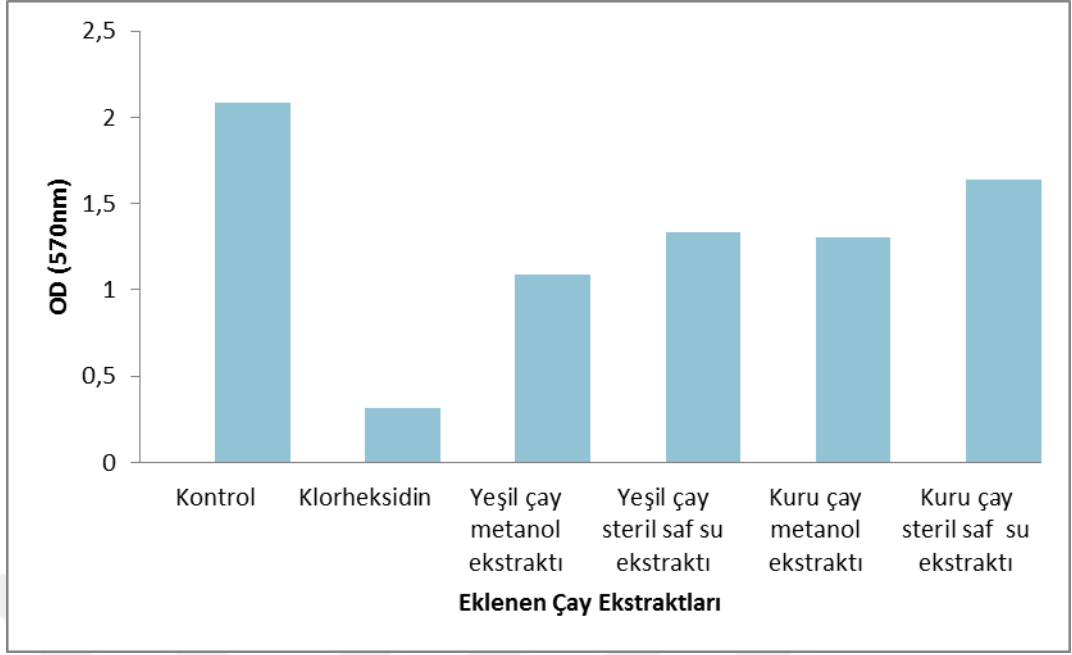
4.1.5.5. Fiber Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait Bulgular

Yer tutucu oluşturan fiber materyallerin üzerinde *S. mutans* 3.3'ün biyofilm oluşturmaya çay ekstraktlarının etkisi farklı olmuştur. Fiber materyallerde biyofilm oluşturan mikroorganizma sayısı logaritmik birimde, çay eklenmeyen kontrol aparatlarda 5,508 kob/ml, klorheksidinde 0,2 kob/ml, yeşil çay metanol ekstraktında ise 2,132 kob/ml olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise yeşil çay steril saf su ekstraktında 5,25 kob/ml, kuru çay metanol ekstraktında 4,638 kob/ml ve kuru çay steril saf su ekstraktında 3,96 kob/ml olarak belirlenmiştir (**Grafik 6**).



Grafik 6. Yer tutucu oluşturan fiber örnekler üzerinde biyofilm oluşturan canlı bakterisayılarının (log10 kob/ml) karşılaştırılması

Spektrofotometrik ölçümlerde de bakteri sayılarına paralel sonuçlar elde edilmiştir. Biyofilm oluşumunun gözlemlendiği optik dansite değerleri (OD 570nm), çay ekstraktı eklenmeyen kontrol materyallerde 2,083, klorheksidin eklenen materyallerde 0,319, yeşil çay metanol ekstraktı eklenen materyallerde ise 1,092 olarak belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise yeşil çay steril saf su ekstraktı eklenen grupta 1,334, kuru çay metanol ekstraktı olan grupta 1,306 ve kuru çay steril saf su ekstraktı olan grupta 1,636 olarak belirlenmiştir (**Grafik 7**).



Grafik 7. Yer tutucu oluşturan fiber materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çay ekstraktlarının etkisinin spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) ile değerlendirilmesi

Yer tutucu oluşturan materyallerden, fiber materyallere uygulanan yeşil çay ve kuru çay yaprağı ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine olan etkileri spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımı ve biyofilm oluşturan canlı bakteri sayısı ile değerlendirildiğinde istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Yapılan istatistiksel analizde, çay ekstraktlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Çay ekstraktları arasında ise yeşil çay metanol ekstraktının etkisinin en yüksek olduğu belirlenmiştir (**Tablo 7**).

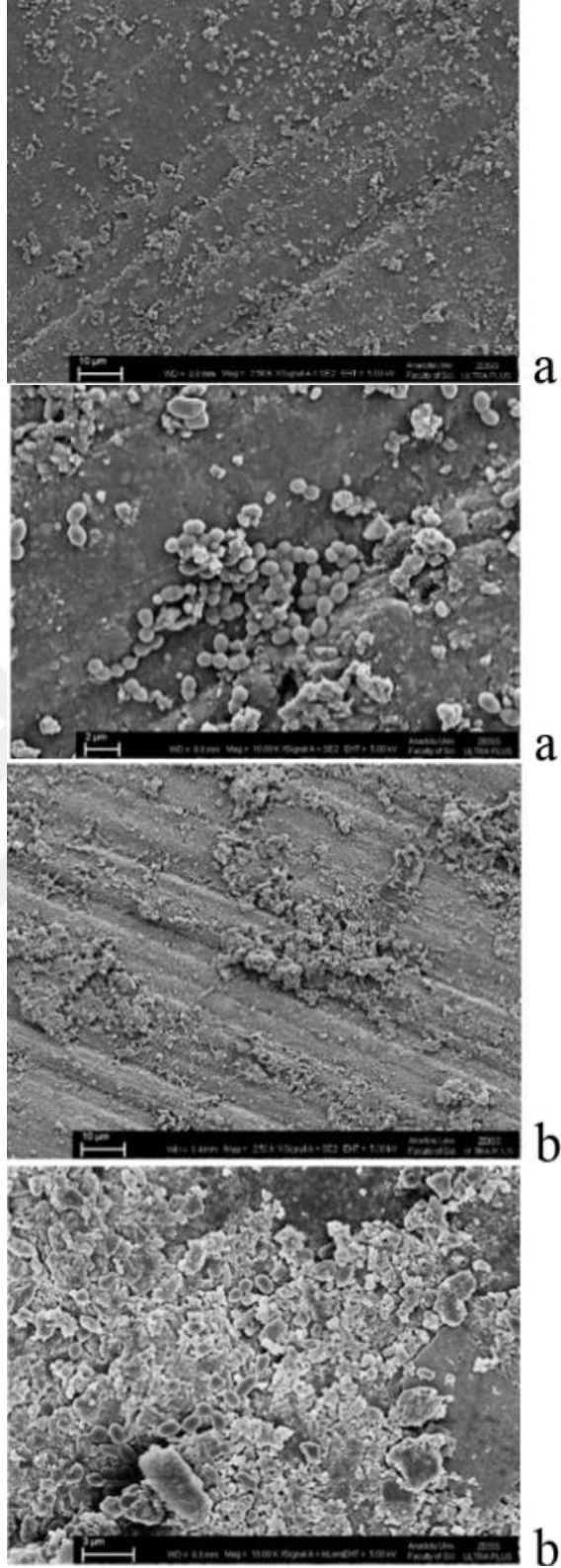
Tablo 7. Fiber materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi

Kullanılan ekstrakt	Ortalama Mikrotitrasyonplak OD değeri	Standart hata	Ortalama bakteri sayısı (log10kob/ml)	Standart hata
Klorheksidin	2,515 ^d	1,808	0,2000 ^c	0,1732
Kontrol	6,251 ^a	1,947	5,1597 ^a	0,3674
Yeşil çay metanol ekstraktı	3,276 ^{cd}	0,840	2,0117 ^b	0,1958
Yeşil çay steril saf su ekstraktı	4,004 ^b	1,266	4,4460 ^a	0,1123
Kuru çay metanol ekstraktı	5,890 ^b	1,550	4,3890 ^a	0,2000
Kuru çay steril saf su ekstraktı	2,757 ^c	1,789	4,7433 ^a	0,4760

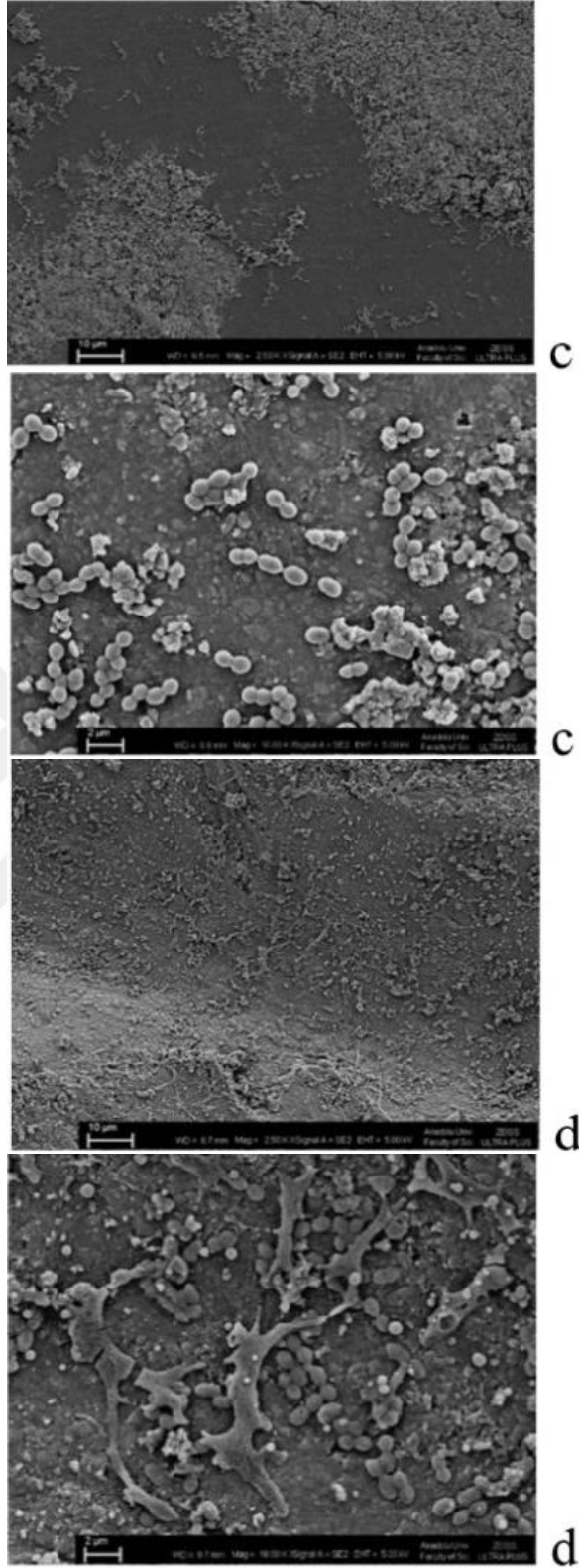
*Üst karakter farklı simgeler, gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ($p < 0.05$).

4.1.5.6. Fiber Materyallerde Biyofilm Oluşumuna Çay Ekstraktlarının Etkisinin Değerlendirmesine Ait SEM Bulguları

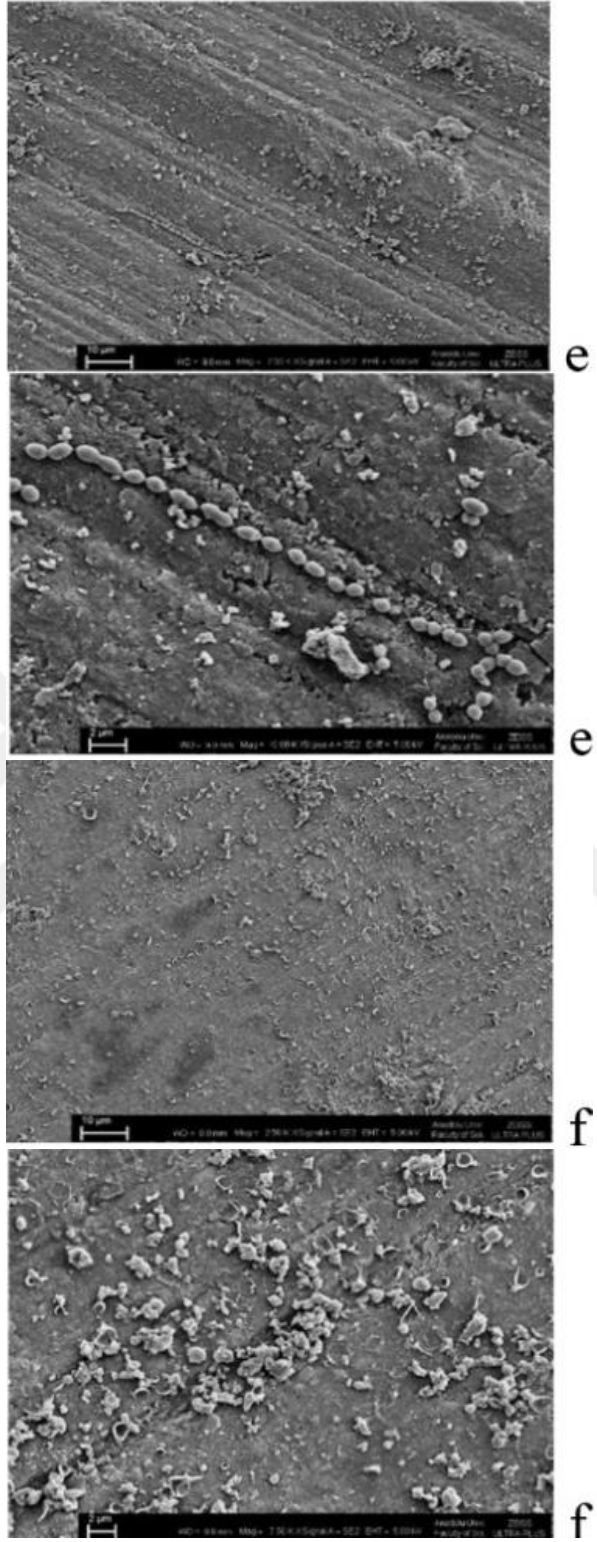
Tüm gruplarda SEM görüntüleri ile biyofilm oluşumu doğrulanmıştır. SEM görüntülerinde yer tutucu oluşturan materyallerin yüzeyini kaplayan yoğun bakteri toplulukları ve bu bakterilerin dentin yüzeyine ve birbirlerine bağlanmasını sağlayan ekstraselüler matriks oluşumu görülmüştür (**Şekil 6**).



Şekil 6a. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); a. Çay ekstraktı ilave edilmemiş b. Yeşil çay metanol ekstraktı



Şekil 6b. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); c. Yeşil çay steril saf su d. Kuru çay metanol ekstraktı



Şekil 6c. Materyal üzerinde çay ekstraktlarının uygulandığı fiber materyalin SEM görüntüleri (X2500 ve X10000); e. Kuru çay steril saf su ekstraktı f. Klorheksidin

4.1.5.7. Kullanılan Yer Tutucu Materyalleri Üzerinde Biyofilm Oluşumunun Karşılaştırılması

Yer tutucu oluşturan materyaller üzerinde biyofilm oluşumun karşılaştırılmasında materyaller üzerinde ortalama bakteri sayısı hesaplanarak sonuçlar elde edilmiştir (**Tablo 8**). En yüksek oranda biyofilm oluşumu metal materyallerde görülmüştür. Sonrasında sırasıyla akril ve fiber materyallerde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

Tablo 8. Kullanılan yer tutucu materyalleri üzerinde biyofilm oluşumu

Kullanılan materyal	Ortalama bakteri sayısı	Standart hata
Metal	1,195 ^b	0,599
Akril	3,361 ^{ab}	2,204
Fiber	4.115 ^a	1,602

*Üst karakter farklı simgeler, gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (p<0.05).

4.2. İn Vivo Çalışma Bulguları

Çalışmamızın in vivo kısmında, izinleri alınmış 6-10 yaş arasında 18 çocukta(8 kız, 10 erkek) ağız içinde yer tutucu materyalleri üzerinde biyofilm formasyonuna karşı yeşil çay ekstraktlarının etkisinin incelenmesi için pilot çalışma yapılmıştır.

Birinci haftanın sonunda, çalışmaya katılan hastaların 8'i kendi istekleri ile çalışmadan ayrılmışlardır. Çalışmaya dâhil olan hastaların 2'sinin apareyleri kırılmıştır. 4 hastanın da apareyleri üzerinde bulunan yer tutucu materyallerinden hazırlanan disklerin, hasta tarafından uygulanan mekanik kuvvet ile düştüğü belirlenmiştir. Çalışma süresince hastaların birçoğunda ebeveynleri tarafından garagaraların düzenli uygulamadığı belirlenmiştir.

Birinci haftanın sonunda, çalışmaya devam eden hastaların apareyleri klinik ortamda incelendiğinde ise üzerlerinde belirgin plak birikiminin olmadığı gözlenmiştir.

Pilot çalışmamızda; hazırlanan apareylerin kalınlıklarının çocukların tolere edebileceklerinden fazla olması, kalınlıkları inceltilmeye çalışılan apareylerin bazı alanlarında kırılmaların görülmesi, apareyler üzerinde bulunan yer tutucu materyallerinden hazırlanan disklerin hastalar tarafından uygulanan mekanik kuvvet ile düşmesi ve yeşil çay ekstraktlarının tatlarının çocuklar tarafından kabul edilebilir olmaması gibi nedenlerden dolayı in vivo çalışma bitirilmiştir.



5. TARTIŞMA

Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların kolonizasyonu ve konakta canlılıklarını sürdürebilmeleri adına oldukça önemli bir virülans faktördür. Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmaların en önemli avantajı, planktonik türdeşlerine oranla dış etkilere karşı daha korunaklı halde olmalarıdır (2).

Dental biyofilm oluşumunda etkili olan faktörler arasında, yüzey özellikleri ve alanı önemli bir role sahiptir. Ağız içi apareylerin, yapılarını oluşturan materyallerin yüzey özellikleri ve retansiyona neden olan yeni yüzeylerin oluşmasını sağladıkları için dental biyofilm oluşumunu artırdıkları belirtilmiştir (16). Sallum ve arkadaşları (96), hastaların aparey kullanım ve sonrasındaki dönemde, ağız dokuları ve dişler üzerinde görülen klinik değişimleri inceledikleri çalışmalarında, apareyin çıkarıldığı dönemde, *S.mutans* sayısında önemli oranda düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Jongsma ve arkadaşları (202), artan yüzey miktarının biyofilm oluşumuna etkisini inceledikleri çalışmalarında, çoklu tel kullanılarak hazırlanan ağız içi apareylerin, tekli tel kullanılarak hazırlanan apareyler ile karşılaştırdıklarında, çoklu tellerde biyofilm oluşumunun daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Mine yüzeyinde oluşan biyofilm yapısının, özellikle ağız içi metal apareylerde oluşan biyofilme göre daha düzensiz ve daha kolay kaldırılabilir olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca biyofilm kaldırıldıktan sonra aparey üzerinde, daha hızlı bir şekilde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Low ve arkadaşlarının (203) ağız içi akrilik aparey yüzeylerini inceledikleri çalışmalarında, akrilik yüzeylerde biyofilm oluşumunun, ağız içi dokulara göre daha hızlı olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalar sıklıkla ortodontik aparey kullanan çocukları veya ileri yaşlarda protetik tedavi gören hastaları kapsamaktadır. Dental biyofilm kompozisyonunu belirlemeye yönelik çalışmalar, çocuk hastalarda özellikle yer tutucu kullanan çocuk hastalarda yaş grubunun küçük olması, çocuklarla yapılacak herhangi bir çalışmada etik izin alınmasının zor olması, karma dişlenme gibi oral florayı etkileyen faktörler nedeni ile kısıtlı sayıda bulunmaktadır.

Çalışmamızda, yer tutucu kullanan hastalarda, dental biyofilmin kaldırılması için mekanik temizliğe katkıda bulunacak çay ekstraktlarının etkinliği incelenmiştir.

Çalışmamızda öncelikle dental biyofilm kompozisyonunun belirlenmesi için, dental biyofilm örneklerinde mikrobiyal tanımlamalar yapılmıştır. Böylelikle kullanılacak ajanların etki mekanizmaları ve etkili oldukları mikroorganizma türleri ile ilgili daha net sonuçların elde edilmesi planlanmıştır.

Çalışmamızda; sabit veya hareketli yer tutucu kullanan, sistemik olarak sağlıklı, herhangi bir ilaç kullanmayan 6-12 yaş grubunda, 4 kız ve 6 erkek çocuk hastadan, tarafımızdan yapılan ve son 2 aydır kullandıkları yer tutucuların akrilik, metal ve fiber kısımlarından steril swap kullanılarak örnek alınmıştır. Örnek alınan çocuklar arasında standardizasyonun sağlanması için öncelikle Dentocult® SM (Orion Diagnostica, Finland) sistemi kullanılarak hastaların *S. mutans* miktarı ölçülmüştür. Geleneksel metotları kullanarak *S. mutans* miktarının belirlenmesi, uzun laboratuvar aşamalarını içermektedir. Bu nedenle, çocuk diş hekimliğinde yaygın olarak kullanımı zorluk yaratmaktadır. Hassasiyet ve doğruluk özellikleri olan plak örneği alınarak *S. mutans* sayısının belirlenmesi tekniği, diş hekimliğinde geleneksel teknik yerine tercih edilmektedir. Ayrıca çocuk hastalarda plak örneğinin alınması, tükürük örneği alınmasına göre daha kolay ve diş çürüğü ile plak arasında direkt ilişkili olması düşünüldükten sonra tercih edilmiştir (200). Alınan örnekler sonucunda, çalışmaya dahil edilmesi planlanan hastaların *S. mutans* sayısı ($>10^5$) standart hale getirilmiştir. Çocuk hastalarda dental biyofilm oluşumu, büyük hastalardan daha az miktarda olduğu için örnek alınmadan önce hastaların 3 gün süreyle oral hijyen alışkanlıklarının kesilmesi tavsiye edilmektedir (96, 198). Çalışmamızda ise; hastaların yaş grubunun küçük olması, yer tutucu kullanımına bağlı plak miktarının artmış olması, zayıf diş fırçalama alışkanlığına sahip olmaları ve gün boyunca sık sık ve yüksek oranda karyojenik gıdaları tüketmelerinden dolayı, hastaların oral hijyen alışkanlığının kesilmesinin doğru olmadığı düşünüldükten sonra, hastalar, standardizasyonun sağlanması için, tarafımızdan sağlanan diş fırçası ve diş macunu ile günlük oral hijyen alışkanlıklarına devam etmişlerdir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak, dental biyofilm örneği alınmadan önce son iki saat herhangi bir şey yememeleri ve içmemeleri konusunda bilgilendirme yapılmıştır. Dental biyofilm

örnekleri, sabah saatlerinde (8.00-11.00) alınmıştır. Örneklerin sabah saatlerinde alınmasının amacı, gün içinde görülen değişiklikleri en aza indirmektir (204).

Dental biyofilm, ağız içerisinde farklı bölgelerde farklı yapısal özelliklere sahiptir. Biyofilm örneğinin alındığı bölge, biyofilm özellikleri açısından çok önemlidir (205). Auschill ve arkadaşları (206) yaptıkları çalışmalarında, sadece bukkal ve lingual yüzeylerden toplanan örneklerin, biyofilmin biyokimyasal yapısını yansıttığını, ara yüzlerden alınan örneklerin ise biyofilmi doğrudan ilgilendirmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca üst çenede özellikle bukkal yüzeyde biyofilm oluşumu, alt çeneyle oranla daha hızlı ve yüksek miktarda olduğu ve çalışmalarda sağlıklı sonuç alınması için bu bölgeden biyofilm örneğinin alınması gerektiği rapor edilmiştir. Özellikle alt çene lingual bölge, dental biyofilm oluşumu açısından fazla retansiyon alanı taşıdığı için çalışmalara dahil edilmemiştir.

Çalışmamızda, materyaller üzerinden plak örneği alırken, üst çenede yer alan aparatlar seçilmiş ve bukkal yüzeylerinden biyofilm örneği alınmıştır.

Çalışmamızda, bakteri tanımlamasında Gram boyama yapılmıştır. Daha sonra kültürler, oksidaz, katalaz ve koagülaz testleri ile hareketlilik durumu açısından incelenmiştir. Kanlı agar ekilerek, hemoliz özellikleri gözlenmiştir. Bakterilerin kullandıkları şeker türüne göre tanımlamalarını yapan VİTEC II (Biomeriux, France) testi ile tanımlamaları yapılmıştır. Çalışma için seçilen suşların tanımlanması, Otomatik Ripoprinter (DuPont, USA) kullanılarak doğrulanmıştır. Çalışmamızda, elde edilen sonuçların doğrulanması için birden fazla metot ile tanımlamalar güçlendirilmiştir. Bu sayede oluşabilecek hataları minimize etmek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, yer tutucu kullanan çocuk hastalardan alınan biyofilm örneklerinde; *S.dysgalactie 6.1.4.1*, *S. mutans 3.3*, *E. faecium 10.2*, *S. anginosus 2.1b* mikroorganizmaları izole edilmiştir.

Çalışmamıza benzer olarak, daha önce yapılan çalışmaların birçoğunda *S. mutans*, dental biyofilmden izole edilmiştir ve en baskın patojenlerden biri olarak tanımlanmıştır. Bu duruma ek olarak, dental biyofilmden *S. mutans* ile birlikte sıklıkla *S. sobrinus*, *S. mitis* ve *S. salivarius* izole edilmiştir (17,64). Lakade ve arkadaşları

(207) yaptıkları çalışmada, dental biyofilmde en baskın patojenin *S. mutans* olduğunu ve bu durum sonucunda anti plak ajanlarının incelendiği çalışmalarda sıklıkla *S. mutans* kullanıldığını belirtmişlerdir. Güngör ve arkadaşlarının (208) çalışmalarında, sistemik olarak sağlıklı çocuklarda dental biyofilmin kompozisyonunda; *pediokokus spp* (%11.7), *laktokokus spp* (%23.5) *laktobacillus spp* (%47), *weissella confusa* (%5.8) ve *S. mutans* (%11.7) bakterilerinin bulunduğu belirlenmiştir. Crielaard ve arkadaşlarının (209) farklı yaş gruplarındaki çocukların oral mikrobiyal kompozisyonlarını inceledikleri çalışmalarında, çocukların farklı dönemlerinde oral biyofilmlerinde, *Proteobakteriler*, *Aktinobakteriler*, *Bakteroidetes*'in baskın bakteri grupları oldukları belirlenmiştir. Papaioannou ve arkadaşlarının (205) 3-12 yaş grubu çocuk hastalarda yaptıkları çalışmada, dişlerin farklı yüzeylerinde oluşan biyofilmin kompozisyonu değerlendirilmiş ve tüm yüzeylerde *S. mutans* ile beraber *S. oralis*, *S. mitis*, *S. infantis* ve *S. salivarius*'un görüldüğü rapor edilmiştir. Langfelt ve arkadaşlarının (210) genç erişkin hastalarda oral biyofilmin kompozisyonunu belirledikleri çalışmalarında, *Firmicutes*, *Proteobakteriler*, *Aktinobakteriler*, *Bakteroidetes*, *Fusobakteri*, *Spiroket*, *SR1* ve *TM7* olmak üzere 8 ana mikroorganizma türü olduğu bildirilmiştir. Holdbrook ve arkadaşlarının (211) çürüklü ve çürüksüz bireylerde oral floranın kompozisyonunu inceledikleri çalışmalarında, özellikle çürük başlangıcı olan bireylerde, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *Pnömokok*, *Stafilokok coag.*, *Lactobacillus sp.* ve *S. mutans*'ın yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Çürüklü ve çürüksüz bireylerin oral floralarının incelendiği bir diğer çalışmada ise, *Laktobacilli*, *Actinomyces*, *Bifidobacteria*, *Veillonella*, *Propionibacteria*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis*'in baskın bakteri türleri olduğu gözlenmiştir (212).

Çalışmalar arasında, yapılan mikroorganizma tanımlamalarında çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum, yapılan çalışmaların sıklıkla büyük hastalarda yapılması, çocuk hastalarda yapılan çalışmaların ise farklı yaş gruplarını içermesi ile açıklanabilir. Ayrıca sonuçlarda görülen farklılık, çalışma grubunda olan cinsiyet, sistemik durum, çevre şartları, beslenme alışkanlıkları, etnik farklılıklar, karma dişlenme döneminde olmaları, psikolojik durum gibi nedenlere bağlanabilir. Çalışmamızda, *S. mutans* dışında belirlenen bakteriler, özellikle çocuklarda önceki

çalışmalarda rapor edilen dental biyofilimde yer alan bakteriler arasında bulunmamaktadırlar. Bu durumun, hastaların kullandıkları apareylerin materyallerinin yüzey özelliklerinden veya apareylerin kontaminasyonuna bağlı bakteri değişiminden kaynaklandığı şeklinde açıklanabilir. Ayrıca çalışmamıza katılan hastaların da farklı yaş grubunda, cinsiyette olmaları, farklı beslenme alışkanlıklarına sahip olmaları ve karma dişlenme döneminde olmalarının sonuçları etkileyebileceği düşünölmüştür.

Çalışmamızda, izole edilen mikroorganizmalara ek olarak, hazır suş halinde alınan *S. mutans* kullanılmıştır. Ağız içinden izole edilen bakterilerin, genetik mutasyona daha duyarlı oldukları, kullanılacak antimikrobiyallere karşı direnç kazanmış ve daha fazla biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir. Hazır suş olarak temin edilen mikroorganizmaların ise, daha önce herhangi bir antimikrobiyal ajana maruz kalmadıkları ve başka mikroorganizmalar ile gen alışverişi yapmadıklarından dolayı biyofilm oluşturmaya yönelik yeni özellikler kazanmadıkları belirtilmiştir (213). Böylece ağzıdan izole edilen mikroorganizmalar ile hazır suş olarak alınan mikroorganizmalar karşılaştırılarak, hem mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin incelenmesinde hem de kullanılacak ajanların etkinliğinin incelenmesinde, sonuçların güvenilirliğinin sağlanması planlanmıştır.

Mikroorganizmaların, biyofilm oluşturma özelliklerinin incelendiği in vitro çalışmalarda, mikrotitrasyon plaka, hücre költür model sistemi ve sıvı akışı model sistemi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır(214,215). Fakat klinik ortamda biyofilm oluşumu ile in vitro ortamda biyofilm oluşumu arasında tam anlamda bir korelasyon sağlanamadığı bildirilmiştir (214). Biyofilmin költatif ve miktar açısından incelenmesinde, birçok metot geliştirilmiştir ancak farklı bakteri türlerinin biyofilm formasyonunun incelenmesinde standart bir yöntem henüz bulunamamıştır (198). Dental biyofilmin incelendiği çalışmaların birçoğunda, mikrotitrasyon plaka yöntemini kullanılmıştır (198,199,215). Bu yöntem, mikroorganizmaların büyümesinin dişında farklı biyolojik testlerin uygulanmasına da olanak sağlamaktadır. Ayrıca ucuz, hızlı ve uygulaması kolay olan bir metottur. Mikrotitrasyon plaka yöntemi ile kolayca inkübasyon sıcaklık, nem, kesme gerilmesi

ve O₂ ve CO₂ varlığı ya da yokluğu konsantrasyonu gibi birçok parametre ölçülebilir (199). Stepanovic ve arkadaşları (198) tüp testi, mikrotitrasyon plaka testi ve modifiye mikrotitrasyon plaka testini karşılaştırdıkları çalışmalarında, tüp testi ve modifiye mikrotitrasyon plaka testinin sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmelerine rağmen, modifiye mikrotitrasyon plaka testinin, nicel anlamda doğruluk açısından daha güvenilir olduğunu belirtmişlerdir. Tüp testinin, uygulaması kolay ve basit bir yöntem olduğunu fakat uygulayıcı bu tekniğe aşina değilse sonuçların sayılmasının çok zor olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca mikrotiter plaka testi dışındaki testlerin yorumlanmasında, özellikle zayıf reaksiyonlarda, gözlemcilerin standart bir yorumlama yapamamalarının, sonuçların güvenilirliğini etkilediği de belirtilmiştir. Modifiye mikrotitrasyon plaka yönteminin içerisine eklenen asetik asit, hem bakterilerin tüp duvarlarına yapışan kısmını da boyamaya dahil ettiği, hem de hava-sıvı arası boşlukların boyanarak sonucu etkilemesini engellediği için daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağladığı bildirilmiştir. Priya ve Brundha (215), *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunu inceledikleri çalışmalarında, besiyeri, inkübasyon periyodu gibi birçok faktör inceledikleri için mikrotitrasyon plaka yöntemini kullandıklarını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, yer tutucu kullanan çocuklardan izole edilen mikroorganizmaların, biyofilm oluşturmalarının ve çay ekstraktlarının etkisinin incelenmesinde, modifiye mikrotitrasyon plaka testi ve canlı bakteri sayımı kullanılmıştır. Mikrotitrasyon plaka testinde, oluşan biyofilm yoğunluğuna bakılarak değerlendirilme yapılmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların canlılıkları ile ilgili bilgi vermemektedir. Canlı bakteri sayım tekniği ise mikrobiyolojide altın standart olarak bilinmektedir ve mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilmler araştırmacı tarafından direkt belirlendiği için biyofilm formasyonunun doğruluğu açısından sonuçlarımıza güvenilirlik sağlayacağı düşünülmüştür (216).

Şeker, karyojenik mikroorganizmaların davranış merkezini oluşturmaktadır. Farklı mikroorganizmalar, farklı şekerleri metabolize etmektedirler. Daha önce yapılan çalışmalarda, şeker içeren besinlerin karyojenik potansiyelinin; karbonhidratların tipi (glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritler, sukroz, maltoz ve laktoz gibi disakkaritler ve polisakkaritler), miktarı, içerdiği koruyucu komponentleri

(proteinler, yağlar, Ca, P, F), fiziksel ve kimyasal özellikleri (sıvı, katı, çözünürlük, pH, tamponlama kapasitesi, salya akıtıcı özellikleri) gibi birçok faktöre bağlı olduğu belirtilmiştir (217,218).

Çalışmamızda, ağız içinden izole edilen farklı mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesinde öncelikle, hangi şeker ortamında biyofilm oluşturdıkları araştırılmıştır. Bu amaçla; glikoz, früktoz, galaktoz, laktoz, sükroz, maltoz, galaktoz şekerleri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların kullandıkları şeker tipinin belirlenmesinin, hem dental biyofilmi oluşturan mikroorganizma türlerinin belirlenmesi hem de bu türlerin oluşturduğu dental biyofilm oluşumunun engellenmesi açısından bilgi sahibi olmamızı sağlayacağı ve probleme yönelik çözüm stratejisi geliştirmemiz açısından çalışmamızın güvenilirliğini artıracığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda, izole edilen mikroorganizmalar içinde en yüksek oranda biyofilm oluşumu *S. dysgalactia*'da gözlenmiştir. Ağızdan izole edilen *S. mutans* ise ikinci en yüksek biyofilm oluşumu gözlenen mikroorganizmadır. Sonrasında, *S. anginosus* ve *E. faecium*'un biyofilm oluşumu sağladığı belirlenmiştir. Hazır suş olarak alınan *S. mutans*, en düşük düzeyde biyofilm oluşumu göstermiştir. Ağızdan izole edilen mikroorganizmaların, hazır alınan suşa oranla daha yüksek oranda biyofilm oluşturmaları, ağız içinde çeşitli çevresel şartlara karşı genetik mutasyona uğradıkları, bu yüzden daha dirençli ve biyofilm oluşturmaya daha yetenekli olabilecekleri şeklinde açıklanabilir. Ağızdan izole edilen *S. mutans*'ın, yüksek biyofilm formasyonu göstermesi aslında şaşırtıcı bir sonuç değildir. Böylelikle, materyal metodun oluşturulması sırasında planlanan, izole edilen mikroorganizmalar ile hazır halde alınan şusun biyofilm oluşturmalarındaki beklenen sonuçlar, çalışmamızın güvenilirliğini sağlamıştır.

Ağızdan izole edilen *S. mutans*, çalışmamızda en yüksek oranda biyofilm oluşumu göstermemiş olmasına rağmen, biyofilm oluşumu ve antimikrobiyal ajanların incelendiği çalışmaların birçoğunda *S. mutans* tercih edilmesi nedeni ile sonuçlarımızın karşılaştırılması için yer tutucu apareylerinde biyofilm oluşumunun incelenmesinde tercih edilmiştir.

Tüm bakterilerde en yüksek düzeyde biyofilm oluşumu, sükröz ve glikoz şekerlerinin olduğu ortamda görülmüştür. Ferrazzano ve arkadaşları (219), karyojenik mikroorganizmaları inceledikleri çalışmalarında, sonuçlarımıza benzer olarak, en yüksek biyofilm oluşumunun sükröz eklenen ortamda olduğunu belirlemişlerdir. Dibdin ve arkadaşlarının fermente olabilen karbonhidratları inceledikleri çalışmalarında (218), sükrözün bütün fermente olabilen karbonhidratlar arasında, *S. mutans*'ın EPS sentezininin sağlanmasında en karyojenik şeker olduğunu belirtmişlerdir. Lindhe ve arkadaşları (220), *S. mutans* ve *S. sanguis*'un sükrözden ekstrasellüler polisakkarit üretirken diğer şekerlerden EPS oluşturamadıklarını ve biyofilm oluşumunun görülmediğini belirtmişlerdir. Sükrözün, *S. mutans* tarafından biyofilm matriksi sentezinde kullanılmasından dolayı, bütün fermente olabilen karbonhidratlar arasında en önemli ve en karyojenik olan şeker olduğu rapor edilmiştir (218, 220). Kullanılan şekerin tipi dışında, sürekli alınmasında dental biyofilmin gelişimi için önemli olduğu belirtilmiştir (220, 221).

Çalışmamızda, yer tutucu apareyleri üzerinde *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunun incelenmesinde şeker olarak da glikoz kullanılmıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda, şeker olarak sükröz kullanılmasına rağmen glikoz kullanılmasının nedeni ise mikrotitrasyon plaka testinde glikozun mikroorganizmaları bir arada tutarak sağlıklı sonuçlar alınmasını sağlamasıdır. Glikozun, sonuçların kullanılan şeker tipine bağlı olarak değişimini etkilemediği bildirilmiştir (199). Bu durumda, apareyleri oluşturan materyaller üzerinde, biyofilm oluşumu incelendiğinde kullanılan şeker tipinin, biyofilm oluşumunu pozitif yönde etkilemesi engellenerek, daha net sonuçlar alınmasını sağlayacağı düşünülmüştür.

Biyofilm yapısı, farklı zamanlarda farklı yapısal, fiziksel ve genetik özellikler sergilemektedir. Bakterinin bir yüzeye tutunmasıyla başlayan biyofilm oluşumu dinamik bir olaydır. Diş yüzeyi temizlendikten 8 saat sonrasında dişlerin yakınındaki yanak ve dil mukozasından veya tükürükten kaynaklanan bakteriyel birikintiler plak oluşumunun ilk safhasını oluşturmaktadır. Bu safhadaki plak, tükürükten çökelen müsin, epitel hücreleri, lenfositler, lökositler ve yiyecek artıklarını içerir ve oluşan plak, genç plak olarak adlandırılır. Ortaya çıkan ilk mikrobiyal bağlantı, zayıf ve geri dönüşebilen karakterdedir. Başlangıç bağlantısını takiben, organizmalar sessiz bir

faza girerler. Sessiz faz sürecinde organizmalar genetik yapılarını değiştirebilirler. Genetik materyaldeki bu değişikliğin, bağlanmadan hemen sonra şekillendiği bilinmektedir. Biyofilmler, ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluştururlar. Hücreler arasında DNA transferi gerçekleşir. Böylece genetik yapısı değişen hücreler çevreden gelebilecek olumsuz etkilere karşı daha çok direnç kazanmış olur. Sekiz-kırk sekiz saat arasında geçen dönem, hızlı mikroorganizma üreme safhası olarak bilinmektedir. Bu safhada mikroorganizmalar plaktaki diğer hücreleri ve besin maddelerini kullanarak çoğalır. *S. mutans* başta olmak üzere bir grup mikroorganizma, ortamdaki karbonhidratlardan EPS sentezi yapar. Glukanlar halindeki bu EPS'ler, plağın dişe daha sıkı yapışmasını sağlar. Bu safha, olgun plak adını da alır. Bu evrede oluşmuş biyofilm yapısı, çevreden gelebilecek olumsuz etkilere karşı daha dirençli hale gelir. Kırk sekiz saatin sonunda oluşan biyofilm yapısında mikroorganizmaların sayısında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, çeşitliliğinde artış göze çarpar. Başlangıçta hâkim olan aerob streptokoklar, plak kalınlaştıkça yerini anaerob ve filamentöz mikroorganizmalara bırakır. Ancak üst tabakada halen aerob mikroorganizmalar mevcuttur (44). Biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında mikroorganizmaların sergiledikleri fenotipik özellikler birbirinden oldukça farklı olabilir. Biyofilm oluşumundaki bu değişkenlik, antimikrobiyal ajanların biyofilm bakterileri üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda önemli bir konudur. Biyofilm çalışmalarında, biyofilm oluşum süresine ilişkin bir standardizasyon belirlenmemiştir. Deney süresi; kullanılan analitik metotların hassasiyetine, araştırılan konuya ve kullanılan modele bağlı olarak 45 dakika ile 6 ay kadar sürebilmektedir (216, 221).

Çalışmamızda izole edilen mikroorganizmalar, biyofilm formasyonunun incelenmesinde ve *S.mutans*'ın yer tutucu apareylerini oluşturan materyaller üzerinde biyofilm oluşumlarına çay ekstraktlarının etkisinin incelenmesinde, kullanılan metottan kaynaklı; canlı bakteri sayımı metodunda 16-24 saat, modifiye mikrotiter plaka yönteminde ise 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmamızda süre, kullanılan metot esas alınarak belirlenmiştir. Bu durumun, konu ile ilgili yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırma olanağı sağlayacağı düşünülmüştür.

Dental biyofilm oluşumunun engellenmesi ve kaldırılmasında mekanik temizliğin içerdiği diş fırçalama, diş ipi kullanımı ve ara yüz fırçası kullanımı anahtar rol oynamaktadır. Fakat yapılan toplum tabanlı çalışmalarda zaman, motivasyon ve bireysel el yeteneği gerektirdiği için yeterli ve etkili mekanik temizliğin sağlanamadığı belirlenmiştir (222, 223). Farklı fırçalama tiplerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, mekanik temizliğin tek başına etkili olmadığı, özellikle fissürlerde, pitlerde ve gingival marjinlerde, dental biyofilm devamlılığını sürdürmek ve patojenler gelişmeye devam etmekte olduğu belirlenmiştir. Biyofilmin kaldırılmasında mekanik temizliğe ek olarak antiplak ajanlarının kullanılması önerilmiştir. Ayrıca, antimikrobiyallerin de tek başlarına yeterli olmayacağı mutlaka mekanik temizlik ile birlikte kullanılması gerektiği belirtilmiştir (224). Mekanik yöntemlerin, antiplak ajanların penetrasyonunu sağlayan biyofilm aralanması için ilk enerjiyi oluşturduğu belirlenmiştir (225).

Özellikle çocuk hastalarda, yaş aralığının küçük olması, el kol koordinasyonunun gelişmekte olması, özellikle de yer tutucu kullanan çocuklarda fırçalama alışkanlığının kazandırılmasının zor olması gibi sebeplerden dolayı, dental biyofilmin kaldırılmasında mekanik temizliğe destek olarak gargara formundaki antimikrobiyal ajanların kullanımı önerilmektedir (5).

Chx günümüzde en yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajandır. Yapılan birçok çalışmada, pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır (11, 154, 161). Chx'in öncelikle, uygulama anında bakterisit, mine yüzeyindeki pelikula ve ağız içi dokulara absorpsiyonu sonucu bakteristatik etki ile plak oluşumunu önlediği belirtilmiştir (7, 98).

Chx'in, dental biyofilmin oluşmasının engellenmesinde ve kaldırılmasında diğer antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırıldığı birçok çalışmada, daha yüksek düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir (226-228). Larsson ve arkadaşları (226), klorheksidin/timol içeren antimikrobiyal ajanın antibakteriyel etkisini, ağız içi aparey kullanan hastalardan topladıkları plak üzerinde inceledikleri çalışmalarında, Chx'in total canlı bakteri miktarını etkilemediğini ancak 7.günde *S.mutans* oranını anlamlı derecede azalttığını bildirmişlerdir. Çalışma sonunda, klorheksidin/timol içeren antimikrobiyal ajanların, erken supragingival plakta ağız bakterilerinin canlılığını ve

metabolik aktivitesini belli oranda azalttığı sonucuna varmışlardır. Lakade ve arkadaşları (227), %0.03'lük triklosan, %0.05'lik sodyum florid ve xylitol ve %0.2'lik Chx'i karşılaştırdıkları çalışmalarında, Chx uygulanan grupta diğer gruplara göre *S.mutans* sayısında daha fazla azalma olduğu sonucunu elde etmişlerdir. Jenkins ve arkadaşları (228) yaptıkları çalışmada, aynı konsantrasyondaki 3 farklı antimikrobiyal ajanın plak oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada %0.05'lik CPC, Chx ve triklosan kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, bütün gargaraların kontrol grubuna göre plak oluşumunda anlamlı derecede azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir. CPC ve Chx'in plak oluşumunun engellenmesi üzerine etkisi, triklosandan çok daha iyi bulunmuştur. CPC ve Chx uygulanan gruplar arasında ise anlamlı derecede farklılık olmadığı rapor edilmiştir. Twetman ve arkadaşları (229), ortodontik tedavi gören çocuklarda, Cervitec cilanın, plak *S.mutans* değerleri üzerine etkisini araştırmışlar, 1. ayın sonunda, test grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir etki olduğunu bildirmişlerdir.

Chx, sıklıkla %0.2'lik ve %0.12'lik konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Cousido ve arkadaşları (230), yetişkin hastalarda yaptıkları çalışmada, her iki konsantrasyonda 30 sn maximum etki görüldüğünü, 7 saat sonrasında %0.2'lik Chx'in %60-80 oranında etkisinin devam ettiğini rapor etmişlerdir. Yan etkilerinin azalması düşünülerek, yetişkinlerde oral biyofilmin oluşumunun engellenmesinde %0.12'lik Chx'in günde iki kere 10 ml 1 dk çalkalanmasının yeterli olduğu belirtilmiştir. Gusberti ve arkadaşları (231), in vivo koşullarda yaptıkları çalışmada, deneysel gingivitisli hastalarda, %0.12'lik Chx ve H₂O₂'nin klinik ve mikrobiyolojik etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma için seçilen 32 kişi, 3 gruba ayrılmıştır. Denekler 21 gün boyunca ağız hijyeni uygulamasından kaçınmış, günde 2 defa; 1. grup %0.12'lik Chx, 2. grup %1'lik H₂O₂, 3. grup ise antimikrobiyal etkisi olmayan bir ajanla gargara yaptırılmıştır. Çalışma sonucunda %0.12'lik Chx ile ağızını çalkalayan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gingivitis oluşumunda %95, plak skorlarında ise %80 oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Mikrobiyolojik çalışmalar sonucunda ise %0.12'lik Chx uygulanan grupta, plakta yer alan fakültatif anaerob bakterilerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş olduğu bildirilmiştir. %0.12'lik Chx ve %12'lik 3 farklı bitki ekstraktının gingivitisli hastalarda dental biyofilme etkisinin incelendiği çalışmada, her iki grubunda

etkisinin 12 saat sürdüğü rapor edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (232).

Çalışmamızda, Chx'in diğer antiplak ajanlarına göre dental biyofilmin kaldırılmasında daha etkili olduğu sonucuna dayanarak, pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ayrıca uygulanan konsantrasyonun, etki şiddeti ve süresini etkilememesi aynı zamanda yan etkilerini azaltması nedeni ile %12'lik Chx kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak da herhangi bir antimikrobiyal ürün olmadan oral hijyen prosedürü sağlandığında, biyofilm oluşumunun nasıl etkileneceğinin incelenmesi için steril saf su kullanılmıştır.

Günümüzde, kullanılan antimikrobiyal ajanların oluşabilecek olası yan etkileri ve maliyetleri göz önüne alınarak, bitkisel kaynaklı tedaviler popüler hale gelmiştir. Mishra ve arkadaşları (233) yaptıkları çalışmada, bitkisel bir gargara, probiyotik ve %0.2'lik Chx'i karşılaştırmışlar, antimikrobiyal etki açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Sharman ve arkadaşları (234) çocuk hastalarda yaptıkları çalışmalarında, bitki esaslı gargara ve Chx'in etkisini, plak indeksi ve gingival indeks kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda, gruplar arasında önemli derecede bir farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Ağız içi sabit apacey kullanan çocuklarda yapılan bir çalışmada ise, Chx'in ve misvak özlü gargaranın *S. mutans* sayısı üzerine etkisi incelenmiş ve istatistiksel farklılık olsa da misvak bitkisinin etkili olduğunu belirlemişlerdir (235).Çiftçi ve arkadaşları (236), ratlarda probiyotik bakterilerin diş çürüğü oluşumuna etkisini inceledikleri çalışmalarında, *S. mutans* sayısında önemli ölçüde azalma olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmacılar, hasta ağızından izole edilen probiyotik bakterilerin, *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunun engellenmesinde, hazır suş bakterilere oranla daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Güngör ve arkadaşları (208), çocuk hastalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin, 10 gün süre ile gargara formunda uygulanmasından sonra, ağız içerisinde *S. mutans* sayısında önemli ölçüde düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Probiyotiklerin kullanımlarındaki dezavantajın, etki sürelerinin kısa olmasına bağlı olarak uzun süre kullanılması gerektiği olduğunu bildirmişlerdir.

Erişilebilen kaynaklarda yapılan taramalar sonucunda, çok sayıda bitki türünün ağız sağlığı için çeşitli çalışmalarda kullanıldığı rapor edilmiştir(8-10). Bu kadar çok tür olmasına rağmen klinik uygulamada özellikle; çocuk hastalarda kullanılabilir, tadı kabul edilebilir, etki süresi uzun, günlük ve rutin uygulanabilecek bitkisel ürün sayısı sınırlıdır.

Çay bileşenleri, erişilebilir, yaygın bir şekilde günlük kullanımda olan bir bitkidir. Uzun yıllardır geleneksel tıpta rutin olarak kullanılmaktadır. Siyah çay ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma, tıbbi amaçla kullanılabilirliğini ispatlamıştır (109-112,158). Fakat siyah çayın elde edilmesi sırasında yapraklarda oluşan fermentasyon, içerisindeki yararlı bileşenler olan polifenol miktarını azaltmaktadır. Ayrıca yapısında bulunan yüksek miktardaki kafein, çocuklarda kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır. Bu özelliklerden dolayı, yeşil ve beyaz çayın tıbbi amaçla kullanılması için yeni çalışmalara yönelinmiştir. Beyaz çay, yeşil çayda olduğu gibi çok az miktarda fermentasyona maruz kalmakta ve yüksek oranda polifenol içermektedir. Fakat az miktarda üretilmediği için erişilebilirliği zor ve maliyeti yüksektir. Bu durum, günlük rutin kullanımı zorlamaktadır. Yeşil çay ise, hem yüksek polifenol içeriği açısından hem de günlük rutin kullanılmasında kolay erişilebilirliğe sahip olması açısından tıbbi tedavilerde daha çok tercih edilmektedir. Yeşil çay içerisinde bulunan kateşin, *S. mutans*'a karşı inhibitör etki göstererek çürük ve gingivitis oluşumunu engellemektedir. Tükürük ve plaktaki pH değerini dengelemektedir. Herhangi bir şey yedikten sonra asit oluşumunu azaltmakta ve normal değerlere düşürmektedir. Ayrıca, yüksek oranda kateşinin alımı, periodontitis ve gingivitis üzerinde olumlu etkilere sahiptir (10,11).

Hambire ve arkadaşları (237), 9-12 yaş aralığında, 60 çocukta yaptıkları çalışmalarında, Chx, yeşil çay ve floridi oral biyofilmin kaldırılmasına olan etkileri açısından karşılaştırmıştır ve gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Yeşil çayın kullanıldığı grupta, pH'nın diğer gruplara göre daha yüksek değerde olduğu görülmüştür. Phelan ve arkadaşları (238) yaptıkları çalışmada, yeşil çay, siyah çay, kuşburnu, böğürtlen, limonlu soğuk çay ve şeftali çayının pH değerlerini karşılaştırmışlardır. Bitki çaylarında pH değeri 3.2'ye kadar düşerken, yeşil ve siyah çayda pH 4.8'de kalmıştır. Bu durum, yeşil ve siyah çayın ağız pH değerini istenilen

aralığa çekerek, çürük oluşumunu azaltabileceğini göstermektedir. Smullen ve arkadaşları (239), kırmızı üzüm, kahve, yeşil çay, biberiye ve adaçayının *S. mutans*'a karşı antimikrobiyal etkilerini inceledikleri çalışmalarında, yeşil çayın diğer bitkilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yeşil çayın %0.5'lik, Chx'in %0.2'lik ve neem bitkisinin %2'lik (*azadirachta indica*) sulu ekstraktlarının, plak indeksi, gingival indeks, oral hijyen indeksi, ve tükük pH değerine etkilerinin incelendiği çalışmada, yeşil çayın Chx'den sonra neeme göre daha fazla etkili olduğu gözlenmiştir. Fakat çalışmaya katılan hastalar, yeşil çay gargarasının tadının Chx'den daha kötü olduğunu belirtmişlerdir. Hastalara uygulanan anket sonucunda, tat açısından %80 oranında klorheksidin, %78 oranında yeşil çay ve %60 oranında neem bitkisinin kabul edilebilir olarak değerlendirildiğini bildirmişlerdir. Üç hafta süren çalışmada, herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (240).

Zhao ve arkadaşları (241), farklı çayların periodontal dokulara etkisini inceledikleri çalışmalarında, yeşil çay, siyah çay ve oolong çay arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Ferrara ve arkadaşları (242), farklı ülkelerden farklı çayların antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, yeşil çayın, diğer gruplara göre önemli ölçüde yüksek oranda antimikrobiyal özellik gösterdiğini saptamışlardır. Cabrera ve arkadaşları (105), farklı çayları değerlendirdikleri çalışmalarında, beyaz çayın, içeriğindeki polifenol miktarına bağlı olarak, yeşil çaya göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Antimikrobiyal özelliği açısından değerlendirildiğinde ise, belirgin bir fark bulunmamıştır.

Yeşil çayın antimikrobiyal spektrumunu kesin olarak belirlemek zordur, çünkü yapılan çalışma sonuçları birbirleri ile çelişkilidir. Bu çalışma sonuçlarının farklı oluşu, kullanılan duyarlı ve dirençli tanımlarının farklılığı ve farklı test yöntemleri kullanılmasına dayandırılabilir. Ancak çalışmacıların, çalışma yaptıkları ortamların ve değerlendirme yapılan merkezlerin farklı olması da nedenler arasındadır. Farklı kaynaklardan elde edilen sonuçlar yerine tek bir merkezden incelemelerin yapılması daha kesin sonuçlar açısından faydalı olabilir. Yapılan

çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde yeşil çayın, dental biyofilm oluşumun engellenmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmaktadır.

Bitki esaslı ajanların kullanılmasında akla gelen ilk soru, herhangi bir yan etkiye sahip olup olmamalarıdır. Hambire ve arkadaşları (237) yaptıkları çalışmalarında, 6-16 yaş aralığındaki çocuklarda, günlük düzenli yeşil çay kullanımının (576 mg) herhangi bir yan etkiye neden olmadığını rapor etmişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda, yeşil çayın anti alerjen olduğu belirlenmiştir (243-245). Fakat, yeşil çayın sahip olduğu bu özellikler, tüm yeşil çay türlerini kapsamamaktadır. Yeşil çayın yetiştiği bölgenin iklimi, rakımı, toprak özellikleri, yağış miktarı, yaprakların saklanması, kuruma süreci gibi fiziksel şartlar, içeriğini dolayısıyla sahip olduğu özellikleri de değiştirmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda, uzak doğu orijinli yeşil çaylar kullanılmıştır (10,11). Bunun aksine, ülkemizde tüketilen yeşil çayın, %78 oranında Türkiye, Rize bölgesi orijinli olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda Rize bölgesinden temin edilen yeşil çay ve taze çay yaprakları kullanılmıştır. Çalışmamıza, hem yeşil çay hem de işlenmemiş çay bitkisi yaprakları dâhil edilmiştir. Yeşil çayın işlenmesi sırasında yapısında gerçekleşen az miktarda fermantasyon, polifenol bileşiklerinin miktarını değiştirmektedir(10). İşlenmemiş çay yapraklarının ise, fermantasyon olmadığı düşünülerek yeşil çaya oranla daha yüksek polifenol ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olması beklenmektedir. Çalışmamızda her iki çayın kullanılmasının amacı, işlem sırasında yapraklarda oluşan fermantasyonun, antimikrobiyal aktiviteye etkisinin incelenmesi olarak açıklanabilir.

Depolama sırasında oluşabilecek mikrobiyal kirlenme göz önüne alınarak çay yaprakları yaş halde alınmıştır. Yaprakların yapısında bulunan suyun, saklanma aşamasında küf oluşumuna neden olabileceği düşünülerek kuru halde saklanmıştır.

Çayın, içeriği ve özellikleri açısından türü kadar hazırlanan ekstrakta kullanılan solvent tipi de önemlidir. Ekstraktlarda kullanılan solvent tipi, bitki içerisinde bulunan polifenollerin etkinliği ve miktarını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda solvent olarak sıklıkla; metanol, etanol, hekzan gibi alkol içerikli materyaller ve steril saf su kullanılmıştır (243, 246-248).

Archana ve Abraham (243), farklı çayların metanol kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının polifenol içeriklerini inceledikleri çalışmalarında, taze yaprakta 105 mg/ml, yeşil çayda 86 mg/ml, siyah çayda 62 mg/ml polifenol bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yeşil çayın ve kuru çay steril saf su, metanol ve etanol ekstraktlarının polifenol içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, kuru çayın polifenol içeriğinin, yeşil çaya göre daha yüksek oranda olduğu belirlenirken, ekstraktlar içinde en yüksek polifenol oranı, metanol ekstraktında görülmüştür (246). Sun ve Ho (247), yeşil çayın farklı ekstraktlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, metanol ekstraktında polifenol miktarının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Kullanılan solvent, ekstrakt tipi ve kullanılan yaprak arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, en etkili solvent metanol, en etkili yaprak ise çay bitkisinin taze yaprağı olarak rapor edilmiştir (248). Moreno ve arkadaşları (249), metanol ekstraktının yapıda bulunan polifenoller ile korelasyon içinde olduğunu, ayrıca yeşil çayın diğer bitkilere göre antimikrobiyal özelliğinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Çay bitkisinin yaprakları ve yeşil çayın daha önceki çalışmalarda polifenol oranı en yüksek olarak rapor edilen metanol ve hekzan ile hazırlanan ekstraktları çalışmamızda kullanılmıştır. Böylece daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırma olanağı sağlanmıştır. Alkolden kaynaklı oluşabilecek toksisitenin önlenmesi düşünülerek, ekstraktlardaki alkolün tamamı uzaklaştırılmıştır. Bunun yanısıra, rutin kullanılan çay formunun etkisinin incelenmesi amacı ile steril saf su kullanılarak da ekstrakt hazırlanmıştır.

Çalışmamızda, yer tutucu kullanan çocuk hastalardan izole edilen bakteriler için yeşil çayın ve çay bitkisinin kuru yapraklarından elde edilen metanol, hekzan ve su ekstraktlarının MIC ve MBC değerleri, duyarlılık durumu araştırılan mikroorganizmalara karşı antimikrobisellerin etkinliğinin incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılan mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Küçük hacimlerde çalışılması ve pratik bir yöntem olmasının yanı sıra kantitatif veriler ortaya koyması, bu metodun avantajlarıdır (250). Bu durum, daha önceden yapılan çalışmalarla karşılaştırmalar yapılmasına olanak sağlamaktadır. Fakat yapılan çalışmaların çoğunda değerler mg/ml cinsinden değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan materyallerin özellikle polisaj aşamasında yüzey alanlarının değiştiği

düşünülmektedir. Bu durumun sonuçları etkilememesi için birim hacim baz alınarak µl/ml birimi ile hesaplama yapılmıştır.

Yapılan birçok çalışmada, yeşil çay içerisinde bulunan kateşinin *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerine inhibitör etkisi olduğu, MIC değerinin 50 ile 1000 µg/ml arasında ve konsantrasyon değerinin ise en iyi, demleme yöntemi ile bulunduğu belirlenmiştir (138,178). Önemli ölçüde bakterisidal etki, 1mg/ml EGCG konsantrasyonunda gözlenmiştir (154). Yapılan çalışmalarda, yeşil çayda bulunan polifenollerden *S. mutans*'a karşı en etkili bileşiğin gallokateşin olduğu ve MIC değerinin 250 mg/ml olması gerektiği belirlenmiştir (151,251). Naderi ve arkadaşları (252), çalışmalarında siyah ve yeşil çayın metanol ekstraktını (%95'lik) kullanmışlardır. Yeşil çayın MIC değerini 150 mg/ml, siyah çayın 50 mg/ml, yeşil çayın MBC değerini 400 mg/ml, siyah çayın ise 200 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Awadalla ve arkadaşları (253), yeşil çayın antimikrobiyal özelliğini inceledikleri çalışmalarında, *S. mutans*'a karşı MIC değerinin 250 mg/ml olduğu sonucuna varmışlardır. Mankovskaiz ve arkadaşları (254) tarafından yapılan çalışmada ise, yeşil çayın MIC değeri 31.25-62.25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Xu ve arkadaşları (255), yeşil çay kateşinlerinin *S. mutans*'a etkisini araştırdıkları çalışmalarında, MIC değerini 15.6 µg/ml belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, yeşil çayın MIC değerinin 15.6 µg/ml ile 1000 µg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir.

Kullanılan çay ekstraktlarının MIC değerleri; kuru çay metanol ekstraktının çalışmaya dâhil edilen tüm bakterilere karşı MIC değerinin 63.5µl/ml olduğu belirlenmiştir.

Kuru çay hekzan ekstraktının MIC değerleri, *S.dysgalactie 6.1.4.1*'e karşı 15µl/ml, *S. mutans 3.3*, *S. anginosus 2.1b* ve *S. mutans ATCC*'ye karşı 30µl/ml, *E. faecium 10.2*'ye karşı ise 45 µl/ml olduğu saptanmıştır.

Kuru çay steril saf su ekstraktının MIC değerleri, *S. mutans ATCC*, *E. faecium 10.2* ve *S. mutans 3.3*'e karşı 312.5 µl/ml, *S.anginosus 2.1b*'ye karşı 625 µl/ml ve *S.dysgalactie 6.1.4.1*'e karşı 125µl/ml olduğu belirlenmiştir.

Yeşil çay metanol ekstraktının MIC değerleri ise *S.anginosus* ve *S.dysgalactie*'ye karşı 9.5µl/ml, *S. mutans* 3.3 ve *S. mutans ATCC*'ye karşı 19µl/ml ve *E. faecium* 10.2'ye karşı 32 µl/ml olduğu belirlenmiştir.

Daha önceden yapılan çalışmalarla farklı sonuçların elde edilmesi, kullanılan çay bitkisinin farklı bölgelerden elde edilmesi ve farklı yöntemlerle ekstraktın hazırlanması olarak açıklanabilir. Ayrıca kullanılan birimin de farklılık göstermesi, diğer çalışmalarla karşılaştırılmasında zorluğa neden olmaktadır. Ayrıca çalışmamızda Chx dışında kullanılan ekstraktlarda, MBC değeri belirlenememiştir. Çay ekstraktlarında MBC değerinin belirlenmesi için çok yüksek konsantrasyonlara ihtiyacımız vardır. Bu durum, çalışmamızın eksik noktası olarak tanımlanabilir.

Çalışmamızda, kullanılan ekstraktlar arasında yeşil çayın metanol ekstraktının, kullandığımız tüm bakteri türleri için en etkili ekstrakt tipi olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizmalara karşı etkili olan diğer ekstraktlar etki sırasına göre, yeşil çay steril saf su ekstraktı, kuru çay steril saf su ekstraktı, kuru çay hekzan ekstraktı, yeşil çay hekzan ekstraktı ve kuru çay metanol ekstraktıdır.

Daha önce yapılan çalışmalarda sıklıkla en etkin solvent olduğu belirlenen yeşil çay metanol ekstraktına karşın, kuru çay steril saf su ekstraktı da yüksek düzeyde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Bu durum, kuru çay bitkisinin yaprakları işlenmemiş olduğundan yapısında yüksek oranda polifenol olabileceği, farklı solventlerle elde edilen ekstraktlarında da yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olabileceği şeklinde açıklanabilir. Ekstraktların, çalışmamızda kullanılan bakterilere göstermiş oldukları etkiler göz önüne alınarak, yer tutucu oluşturan materyaller üzerinde biyofilm oluşumunun kaldırılmasında, yeşil çay ve kuru çay yapraklarının, metanol ve steril saf su ile hazırlanan ekstraktları kullanılmıştır.

Yeşil çay ve çay bitkisinin yapraklarının metanol, hekzan ve su kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının, yer tutucu kullanan çocuk hastalardan izole edilen bakterilere etkisinin incelendiği çalışmamızda, ekstraktların hiçbirinin test bakterileri üzerine bakterisidal etkili olmadığı görülmüştür. Ekstraktlar, bakteriyostatik etki göstermişlerdir. Simonti ve arkadaşları (160) ve Braliford ve arkadaşları (161), yeşil çay içerisinde bulunan kateşinlerin, antimikrobiyal

özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, çalışmamıza benzer olarak, ekstraktların bakteriyostatik etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda biyofilm formasyonunun incelendiği aşamalarda, mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilmler, yoğunluk ve canlılık yönünden incelenmiştir. Mikroorganizmaların, yer tutucu materyallerinin yüzey özellikleri ile olan ilişkileri incelenmemiştir. Kullandığımız materyallerin yüzey özelliklerinin biyofilm formasyonuna etkisinin daha iyi karşılaştırılabilmesi için görüntüleme yöntemleri arasında en eski ve en yaygın kullanılan yöntem olan SEM görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Lawrence ve arkadaşları (256) yaptıkları çalışmalarında, KLTM tekniğinde örnekler hazırlanırken transmisyon veya tarama elektron mikroskopisinde karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerin oluşmadığını belirlemişlerdir. Fakat KLTM ile sıklıkla cam ve diş minesinden hazırlanan ışığı geçirme özelliğine sahip sınırlı sayıda örnek incelenebilmektedir. Çalışmamızda hazırlanan örnekler, kalınlıklarından ve materyallerinden kaynaklı ışığı geçirmediği ve pürüzlü bir yüzeye sahip oldukları için, KLTM ile inceleme yapılamamıştır. SEM ile görüntüleme yönteminde, örneklerin hazırlanması sırasında dehidrasyon veya deformasyon gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıktığına dair sonuçlar olsa da literatürde en sık kullanılan yöntem olduğu için sonuçların karşılaştırılmasına olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

Biyofilm oluşumun incelendiği çalışmalarda, kullanılan örneklerin sterilizasyon yöntemi önemli bir husustur. Mikrobiyolojik çalışmalarda; otoklavlar, kuru hava sterilizasyonu, klorun kullanıldığı kimyasal sterilizasyon, X-ışını, gama-ışını gibi iyonize radyasyonun kullanıldığı radyasyon sterilizasyonu, 10,8°C'nin üzerindeki ısılarda gaz halinde bulunan etilen oksit kullanıldığı gaz sterilizasyonu, formaldehit ve alkol buharının kullanıldığı kimyasal buhar sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır (257). Takeuchi ve arkadaşları (258), 2 farklı antimikrobiyal ajanın biyofilm oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, biyofilm oluşumunu sağlamak için kullandıkları hidroksiapatit disklerin sterilizasyonunu otoklav kullanarak yapmışlardır. Akrilik ve fiber örnekler, otoklavda kimyasal ve yüzey özellikleri değişeceği için %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir (197). Çalışmamızda yer tutucu yapılarını oluşturan materyaller üzerinde biyofilm

formasyonu ve kaldırılmasının incelenmesinden önce, bu materyallerde oluşabilecek kontaminasyonu en aza indirmek ve sonuçların güvenilirliğini sağlamak için dezenfeksiyon ve sterilizasyon yapılmıştır.

Çalışmamızda, yer tutucu aparatını oluşturan akrilik, metal band ve çelik tel ve fiber materyalleri üzerinde ağızdan izole edilen *S.mutans*'ın biyofilm oluşturmaya yeşil çay ve kuru çayın metanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının etkisi, canlı bakteri sayımı ve mikrotiter plaka yöntemi ile incelenmiştir ve her iki yöntemde de tüm gruplarda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Kullanılan mikrotitrasyonplaka ve canlı bakteri testlerinin sonuçları birbirleri ile uyumludur. Bu durum, çalışmamızda sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan tüm materyaller üzerinde *S.mutans* biyofilm oluşturmaya karşı kullanılan çay ekstraktlarında tüm gruplarda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Akril materyallerde, yeşil çay metanol ekstraktından sonra sırası ile kuruçay steril saf su, kuruçay metanol ekstraktı ve yeşil çay su ekstraktı etkinlik göstermiştir. Metal materyallerde, yeşil çay metanol ekstraktından sonra sırası ile kuru çay su, yeşil çay su ve kuru çay metanol ekstraktı etkili olmuştur. Fiber materyallerde ise yeşil çay metanol ekstraktından sonra sırası ile kuru çay metanol, yeşil çay su ve kuru çay steril saf su ekstraktı etkili olmuştur.

Çalışmamızda kullanılan aparatlar tek tek değerlendirildiğinde, kullanılan tüm materyallerde, kontrol grubu olarak kullanılan Chx, *S. mutans*'ın biyofilm formasyonuna karşı en etkili antimikrobiyal ajan olmuştur. Yapılan birçok çalışmada etkinliği kanıtlanan Chx'in, çalışmamızda beklenen sonuçları göstermesi, çalışmamızın güvenilirliğine katkıda bulunmuştur (226-228).

Yeşil çay metanol ekstraktı, Chx'i takip eden antimikrobiyal etkinlik göstermiş ve kullanılan ekstraktlar arasında en etkili olmuştur. Farklı çay tiplerinin farklı ekstraktlardaki polifenol içeriğinin incelendiği çalışmalarda, elde edilen bulgular çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir (243-249). Elde edilen sonuçlar neticesinde, bitki ekstraktlarında bulunan polifenollerin, Chx'e benzer şekilde antimikrobiyal aktivite gösterebileceği düşünülmektedir.

Yer tutucu materyallerinden hazırlanan örneklerin tamamında, yeşil çay metanol ekstraktı en yüksek miktarda antimikrobiyal aktivite göstermiş olmasına rağmen kullanılan örneklerin tamamında tüm çay ekstraktları antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Çalışmamızda kullanılan materyaller, farklı yüzey özelliklerine ve yapısına sahiptirler. Kullanılan ekstraktların, materyallerin özellikleri farklı olmasına rağmen benzer etki göstermeleri, antimikrobiyal etkilerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Fakat, yeşil çay steril saf su, kuru çay steril saf su ve kuru çay metanol ekstraktı, farklı materyallerde küçük miktarlarda farklı etkiler göstermişlerdir. Bu durum, kullanılan materyallerin çalışma öncesinde özenli bir şekilde yüzeylerinin polisaj yapılmasına rağmen yapılarındaki pürüz miktarının sonuçları etkileyebileceği şeklinde açıklanabilir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan materyaller çalışma öncesinde steril edilmelerine rağmen, sonrasında tam anlamda steril olup olmadıkları kontrol edilmediği için, sonuçlardaki farklılıkların kontaminasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Konuyla ilgili yapılacak yeni çalışmalarda sterilizasyonun kontrol edilmesi ile daha etkin sonuçlar elde edilebilir. Yeşil çayın metanol ekstraktından sonra kuru çayın her iki ekstraktının da etkili olması, yeşil çayın etkinliğinin kullanılan solvente bağlı olduğu sonucunu gösterebilir. Ayrıca, kuru çay yaprakları herhangi bir işleme uğramadıkları için, polifenol miktarlarının, yeşil çaya oranla daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, çay bitkisinin işlenmemiş yaprağının daha yüksek oranda polifenol komponenti içerdiği sonucu, çalışmamızı doğrulamaktadır (105,241,242).

Yer tutucu hastalarında yapılan klinik gözlemlerde, su kullanılarak sadece yıkanan apaneler üzerinde dental plağın uzaklaşmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda da tüm gruplar arasında negatif kontrol grubu olarak kullandığımız steril saf suyun, en düşük oranda biyofilm formasyonunu engellediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, klinik gözlemlerimizi doğrulamaktadır ve ağız içinde kullanılan tüm apaner tiplerinde, herhangi bir antimikrobiyal ajan kullanmadan yapılan oral hijyen uygulamasının, dental biyofilm formasyonunun engellenmesinde etkili olmayacağı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, kullanılan materyeller arasında en yüksek oranda biyofilm oluşumu metal, en düşük biyofilm oluşumu ise fiber örneklerde görülmüştür. Metal

örnekler üzerinde en yüksek oranda biyofilm formasyonu gözlenmesi, beklemediğimiz bir sonuçtur. Çalışmamıza benzer olarak, Jongsma ve arkadaşlarının (202) farklı materyallerden oluşan ağız içi apareyleri, dental biyofilm oluşumu açısından değerlendirdikleri çalışmalarında, metal (paslanmaz çelik) materyallerin, en yüksek yüzey gerilimine ve en yüksek plak retansiyonu kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Altın ve çelik tellerin dental biyofilm oluşumu açısından değerlendirildiği çalışmada ise, altın tellerin yüzey pürüzlülüklerinden dolayı daha yüksek oranda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (202). Çalışmamızda, materyallere ait yüzey özelliklerinin yanısıra, kullanılan metal örneklerde çalışma öncesinde çok iyi cila yapılmış olmasına rağmen, mikroskobik düzeyde pürüzlülük ve lehimin düz olmayan bir yüzey oluşturmasının biyofilm formasyonunu arttırdığı da düşünülebilir. Ayrıca deney aşamasında metal örneklerin şekli ve ağırlıkları, akril ve fiber örneklere göre kuyucuklar içinde çalışmayı zorlaştırmışlardır. Bu nedenle de biyofilm oluşumunun etkilendiği düşünülmektedir. Akrilik örneklerde ise fiber örneklere kıyasla daha yüksek oranda biyofilm formasyonu belirlenmiştir. Akrilik materyallerin parlak ve cilalı görünmesine karşın, sahip oldukları pürüzlü yapıları düşünüldüğünde, sonuçlar şaşırtıcı değildir. Erişkin hastaların akrilik protezlerinin incelendiği çalışmalarda, akrilik yüzeylerin pürüzlü yapılarının, protezin diğer bileşenlerine oranla mikroorganizmalar için daha uygun ortam hazırladığı belirlenmiştir (260, 261). Çocuk hastalarda akrilik apareylerin temizliğinin incelendiği çalışmada, cilalı yüzeylerin hastalar tarafından daha iyi temizlendiği, doku ile temas eden yüzeylerin ise daha az temizlenmesinden kaynaklı daha fazla dental plak oluşumu gözlendiği bildirilmiştir (262). Kırzioğlu ve arkadaşları (263), fiber yer tutucuları değerlendirdikleri çalışmalarında, hasta tarafından temizlenmesinin kolay olduğunu ve yüzey özelliklerinden dolayı dental plak oluşumunun diğer yer tutuculara oranla daha az olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızın aksine, Tanner ve arkadaşlarının (258), cam fiber materyali ile akrilik materyalin kuru ve tükürük ile kaplanmış hallerinin *S. mutans*'ın bağlanması açısından değerlendirildiği çalışmalarında, kuru halde iki grup arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, fakat tükürük ile kaplandıklarında cam fiber materyalinde daha yüksek sayıda *S. mutans* adezyonu görüldüğü rapor edilmiştir. Çalışmamızda da gönüllülerden alınan tükürük ile materyal yüzeyleri kaplanmış olmasına rağmen, in

vitro ortama taşınan tükürüğün yapısının değişmiş ve tükürük dışındaki ağız içi ortam şartları sağlamadığından dolayı sonuçlar farklılık göstermiştir.

Çalışmamızda, yer tutucu materyalleri üzerinde mikroorganizmaların biyofilm formasyonu oluşturmaları ve çay ekstraktlarının etkisi mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. Mikroorganizmaların yüzey ile olan ilişkilerinin incelenmesi için elde edilen örneklerin SEM görüntüleri incelendiğinde, en fazla ve en net biyofilm oluşumu akrilik ve fiber materyallerde gözlenmiştir. Mikrotitrasyon plaka ve canlı bakteri sayım yöntemi ile elde edilen sonuçlar, SEM görüntüleri ile farklılık göstermektedir. Akrilik materyallerin yüzey özelliklerinden kaynaklı biyofilm formasyonu görülmesi beklenen bir durum olmasına rağmen, fiber örneklerde metal örneklere oranla daha net biyofilm oluşumu görüntülenmesi şaşırtıcı bir sonuçtur. Metal örneklerde yüksek oranda biyofilm formasyonu saptanmasına rağmen SEM görüntülerinde belirlenememesi; materyallerin görüntülemeye hazırlanması aşamasında uygulanan kimyasallardan etkilenebileceği, şekillerinden dolayı mikroskoba yerleştirilmelerinde sorun yaşanabileceği ve elde edilen görüntülerin etkilenmiş olabileceği şeklinde düşünülmektedir. Çalışmamızda olduğu gibi çalışmaların çok yönlü olması, farklı teknikler ile elde edilen sonuçların yorumlanmasını ve daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır.

Sonuç olarak, yer tutucu aparatlarını oluşturan akrilik, metal ve fiber materyaller üzerinde, ağızdan izole edilen *S.mutans*'ın biyofilm formasyonu oluşturduğu gözlenmiş ve bu formasyonun engellenmesi için kullanılan çay ekstraktları içinde, yeşil çay metanol ekstraktının Chx'e yakın düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu konuda daha geniş ve kesin kanıtlar için daha uzun vadeli çalışmalara gerek olsa da yeşil çayın dental biyofilmin kaldırılmasında, bitki içerikli destek ürünlerden biri olduğu üzerinde durulmaktadır. Özellikle yeşil çay ve bileşenlerinin, oral hijyenin sağlanmasında ümit vaat ettiği ve ilerleyen dönemlerde çocuklarda başarı ile kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, yeşil çayın *invivo* olarak kullanılabilmesi için, çalışmamızda bahsedilen zayıf noktaların tamamlandığı *in vitro* çalışmalara gerek vardır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Yer tutucu kullanan çocuk hastaların dental biyofilm örneğinden izole edilen mikroorganizmalar; *S. mutans* 3.3, *S. anginosus* 2.1.b, *S. dysgalactie* 6.1.4.1 ve *E. faecium* 10.2'dir.

2. İzole edilen mikroorganizmalar ve hazır olarak alınan suş *S. mutans* ATCC 25175, biyofilm oluşturmaları açısından mikrotitrasyon plaka ve canlı bakteri yöntemi açısından değerlendirildiklerinde, en yüksek düzeyde biyofilm oluşu sırası ile; *S. dysgalactie* 6.1.4.1, *S. mutans* 3.3, *S. anginosus* 2.1.b, *E. faecium* 10.2 ve *S. mutans* ATCC 25175'tir.

3. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları; glikoz, sükroz, galaktoz, maltoz, furktoz, rafinoz olan 6 farklı şeker ortamında incelenmiştir. Bu şekerler içerisinde en fazla oranda biyofilm oluşumu sükroz ve glikozda görülmüştür.

4. Kullanılan ekstraktların hiç birisinin test bakterileri üzerine bakterisidal etkili olmadığı görülmüştür. Ekstraktlar, bakteriyostatik etki göstermiştir.

5. Çalışmamızda, MIC değeri, ekstraktlara göre değişmiştir. Kuru çay ekstraktının MIC değeri 125-625 µg/ml arasında değişirken, yeşil çay ekstraktının MIC değerleri 625-1250 µg/ml arasında olmuştur. Chx için MIC değeri 0.0011 mg/ml'dir.

6. Kullanılan çay ekstraktlarının MBC değeri, çok yüksek konsantrasyonlarda belirleneceği düşünüldüğü için saptanamamıştır.

7. Ağızdan izole edilen mikroorganizmaların biyofilm formasyonlarına kuru çay yaprağı ve yeşil çay metanol, hekzan ve distile su ekstraktlarının etkisi incelendiğinde, tüm gruplarda, en etkili ekstraktın yeşil çay metanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir.

8. Yer tutucu apareyini oluşturan akrilik, fiber ve metalörnekler üzerinde ağızdan izole edilen *S. mutans*'ın biyofilm oluşumuna çay ekstraktlarının etkisi incelendiğinde; in vitro şartlar altında, *S. mutans*'ın biyofilm oluşturmaya karşı

kullanılan çay ekstraktlarında tüm grupta en etkili ekstrakt, yeşil çay metanol ekstraktı olmuştur. Sonrasında akrilik materyallerde, sırası ile kuruçay steril saf su ekstraktı, kuruçay metanol ekstraktı ve yeşil çay su ekstraktı etkinlik göstermiştir. Metal materyallerde, sırası ile kuruçay su ekstraktı, yeşil çay su ekstraktı ve kuruçay metanol ekstraktı etkili olmuştur. Fiber materyallerde sırası ile kuruçay metanol ekstraktı, yeşil çay su ekstraktı ve kuruçay steril saf su ekstraktı etkili olmuştur.

9. Çalışmamızda SEM sonuçları değerlendirildiğinde, en net ve yüksek biyofilm oluşumu akrilik ve fiber materyallerde görülmüştür. Metal materyaller üzerinde ise net görüntüler eldeedilememiştir.

10. Çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında, yer tutucu kullanan ocuk hastalarda, mekanik temizliğe destek olarak yeşil çay özellikle metanol ekstraktının antimikrobiyal ajan olarak kullanılmak üzere geliştirilebileceği düşünülmektedir. Ancak, konuyla ilgili daha fazla in vivo ve in vitro çalışmaya ihtiyaç vardır.

ÖZET

Yeşil Çay Ekstraktlarının Yer Tutucu Apareylerini Oluşturan Materyaller Üzerinde Dental Biyofilm Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi

Diş çürüğünün oluşumu birçok etkene bağlıdır. En önemli sebep mikroorganizmalar, özellikle de *S. mutans*'dir. Yapılan çalışmalarda, yer tutucu kullanan çocuk hastalarda *S. mutans* sayısında artış olduğu saptanmıştır. Biyofilmin ortadan kaldırılması için mekanik temizlik ile birlikte klorheksidin diglukonat, en sık olarak kullanılan kimyasal ajandır. Uzun süre etkin bir tedavi sağlamış olmasına karşın, yan etkileri bulunmaktadır. Doğal bitkisel ürünler, günlük hayatta ve geleneksel tedavilerde rutin olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, çay ekstraktlarının yer tutucu oluşturan apareyler üzerinde biyofilm oluşumuna etkisinin in vitro olarak incelenmesidir.

Çalışmaya dahil edilen grup, Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Bölümü'nde yer tutucu tedavisine devam eden çocuklardan seçilmiştir. Yer tutucular üzerinden biyofilm örnekleri alınıp bakteri tanımlamaları yapılmıştır. İzole edilen bakterilere çay ekstraktlarının etkisi spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Yer tutucu oluşturan materyaller üzerinden ağız içinde izole edilen bakterilerin oluşturduğu biyofilme çay ekstraktlarının etkisi, canlı bakteri sayısı ve mikrotitrasyon plaka yöntemi olmak üzere 2 yolla izlenmiştir.

Ağızdan izole edilen bakterilerin en yoğun olarak biyofilm oluşumları sükroz ve glikoz olan ortamda görülmüştür. Bakteriler arasından en yoğun biyofilm oluşumu ise *S. mutans*'de gözlenmiştir. Yer tutucu oluşturan materyaller üzerinde biyofilm oluşumuna karşı en etkili ekstraktın, yeşil çay metanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir.

Yeşil çayın, diş çürüğünün önlenmesinde en ucuz, güvenilir ve kolay ulaşılabilir destek ürünlerden biri olduğu üzerinde durulmaktadır. Çocuklarda başarı ile kullanılma potansiyeli bulunabilir. Ancak bu konu ile ilgili daha birçok çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, Yer Tutucular, Yeşil Çay, Oral Mikroorganizmalar

ABSTRACT

Analysis of The Effects of Green Tea Extracts Against The Formation of Biofilm on TheMaterials of Space Maintainers

The formation of dental caries depends on several factors and the most important microorganism, particularly, *S. mutans*. An increase in the incidence of *S. mutans* in children using space maintainer has been detected. Chlorhexidine digluconate with mechanical cleaning is the most commonly used chemical agent to remove biofilm. Although providing an effective treatment for a long time, it has side effects. For centuries, the useage of plant extracts as a routine in daily life and traditional treatments is known.

The aim of this study is to investigate the effects of green tea to formation of biofilms forming on space maintainer in children.

The study grup were selected from Pediatric Dentistry Clinic, Faculty of Dentistry, Suleyman Demirel University in children with space maintainer. Biofilm samples were taken from space maintainer and determined the biofilm. The effects of green tea and dried tea leaves to oral biofilm of bacteria isolated from the extracts were evaluated by spectrophotometer. The effect of tea extracts against biofilm on space maintainer material was monitorized in two ways. One of them was counting live bacteria method and other was micro-titre plaque method.

The greatest concentration of selected isolates of biofilm formation was observed on glucose and sucrose. Compared to other selected isoletes, *S. mutans* to created the most dense biofilm. The most effective extract against biofilm forming materials on the space maintainers was determined that methanol extract of green tea.

In the prevention of tooth decay, it is emphasized that green tea is the most cheap, reliable and easily accessible product. It's potential to be used with success in children can be found. However, many more studies on this subject are needed.

Keywords: Biofilm, Space Maintainers, Green Tea, Oral Microorganisms

KAYNAKLAR

1. Ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; 94(1):1-9.
2. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46: 202-56.
3. Larsson K, Glantz PO. Microbial adhesion to surfaces with different surface charges. *Acta Odontol Scand*. 1981; 39(2): 79-82.
4. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J Clin Periodontol*. 1985; 12: 360-8.
5. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29(11): 965-74.
6. Scheie A.A. The role of antimicrobials. in: Fejerskov O, Kidd E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. Denmark, Copenhagen: Blackwell Publishing Ltd, 2003: p. 179-188.
7. Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(10): 957-64.
8. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2007; 25(4): 164-8.
9. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 92(2-3): 281-9.
10. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res*. 1991; 25(6): 438-43.
11. Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*. 2001; 50(4): 299-302.
12. Aydın M. Mikrobiyal Biyofilmler ve Aerosoller. İçinde Cengiz AT. *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji*. Ankara: Günes kitapevi Ltd. Sti, 2004: s. 176-9.
13. Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182(10): 2675-9.
14. Zobell CE. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol*. 1943; 46(1): 39-56.
15. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am*. 1978; 238(1): 86-95.

16. Rutter PR, Abbott A. A study of the interaction between oral streptococci and hard surfaces. *J Gen Microbiol.* 1978; 105(2): 219-26.
17. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995; 15: 169-75.
18. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
19. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
20. Palmer RJ. Peter Hirsch and biofilms: microbial ecology's role in a "new" field. *Microb Ecol.* 2004; 47(3): 200-4.
21. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 881-90.
22. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4): 847-67.
23. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137: 10-5.
24. Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM. The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbiol.* 1999; 1: 447-55.
25. Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol.* 2000; 40(2): 75-84.
26. James GA, Beaudette L, Costerton JW. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J. Industrial Microbiology.* 1995; 15: 257-62.
27. Davison J. Genetic exchange between bacteria and environment. *Plasmid.* 1999; 42: 73-91.
28. Yılmaz M, Celik G Y. Bakteriyel Ekstrasellüler Polisakaritler (EPS). *Mikrobiyoloji Dergisi.* 2007; 5: 7-13.
29. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 2001; 147(1): 3-9.
30. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994; 176(8): 2137-42.
31. Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Birmingham JJ, Allison C. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(8): 3502-11.
32. Lagido C, Wilson IJ, Glover LA, Prosser JI. A model for bacterial conjugal gene transfer on solid surfaces. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003; 44(1): 67-78.

33. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 21: 1318-22.
34. Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol*. 2001; 9(1): 9-10.
35. Møller S, Sternberg C, Andersen JB, Christensen BB, Ramos JL, Givskov M, Molin S. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(2): 721-32.
36. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987; 41: 435-64.
37. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis*. 2003; 9: 16-22.
38. Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *International Journal Antimicrobial Agents*. 2009; 33: 8-13.
39. Pattı JM, Allen B L, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*. 1994; 48: 585-617.
40. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res*. 1997; 11: 160-7.
41. Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 2001; 413:860-4.
42. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998; 280(5361): 295-8.
43. Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng*. 2008; 10: 145-67.
44. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol*. 2002; 13(3): 228-33.
45. Cooper M, Johnston LH, Beggs JD. Identification and characterization of Uss1p(Sdb23p): a novel U6 snRNA-associated protein with significant similarity to core proteins of small nuclear ribonucleoproteins. *EMBO J*. 1995; 14(9): 2066-75.
46. Saraçlı MA. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi*. 2006; 48: 244-50.
47. Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes Dev*. 2001; 15: 1468-80.

48. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(2): 224-45.
49. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol.* 2005; 43: 101-9.
50. McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2003; 185: 274–84.
51. Rickard AH, Palmer RJ, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, Bassler BL, Kolenbrander PE. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol.* 2006; 60: 1446- 56.
52. McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 387(2): 445-53.
53. Li YH, Tang, N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2002; 184: 2699–708.
54. Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent.* 2010; 38: 11-5.
55. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44: 79-87.
56. Palmer RJ Jr, Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun.* 2001; 69(9): 5794-804.
57. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM: Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001; 80: 1436–40.
58. Takenaka S, Iwaku M, Hoshino E. Artificial *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and confocal laser scanning microscopic analysis. *J Infect Chemother.* 2001; 7: 87–93.
59. Marsh PD, Bradshaw DJ. Microbial community aspects of dental plaque. In: Newman HN, Wilson M, eds. *Dental Plaque Revisited*. Cardiff: BioLine, 1999: p. 237–53.
60. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(3): 183-9.
61. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-32.

62. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1996; 50: 513-52.
63. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2006; 42: 47-79.
64. Marsh PD, Nyvad B. The oral microflora and biofilms on teeth. In: Fejerskov O, Kidd E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management.* Denmark, Copenhagen: Blackwell Publishing Ltd, 2003: p. 29-48
65. Bowden GH, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1): 81-99.
66. Fletcher M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol.* 1991; 32: 53-85.
67. Edgar WM, Higham SM. Plaque fluid as a bacterial milieu. *J Dent Res.* 1990; 69: 1332-6.
68. Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *Journal of Oral Rehabilitation.* 1998; 25: 52-8.
69. Palmer RJ Jr, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(3): 263-8.
70. Murphy DB, Davidson MW. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging.* 2th. Ed., New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012, p. 474-9.
71. Bridier A, Meylheuc T, Briandet R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESE and FESEM). *Micron.* 2013; 48: 65-9.
72. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning.* 1997; 19(5): 324-36.
73. Keevil, C.W. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Sci Technol.* 2003; 47: 105-16.
74. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 459-67.
75. Netuschil L., Reich, E., Unteregger, G., Sculean, A., Brex, M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol.* 1998;43: 277-85.
76. Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg BJ, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and environmental microbiology.* 1997; 63(11): 4543-51.

77. Grychtol S, Viergutz G, Pötschke S, Bowen WH, Hoth-Hannig W, Leis B, Umanskaya N, Hannig M, Hannig C. Enzymes in the in-situ pellicle of children with different caries activity. *Eur J Oral Sci.* 2015; 28: 319-26.
78. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2016;6: 1534.
79. Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. *Microb Pathog.* 2015; 15: 173-4.
80. Ferreira NO, Andruccioli MC, Nelson-Filho P, Zanella EP, Consolaro A, Romano FL, Matsumoto MA. Bacterial biofilm on successful and failed orthodontic mini-implants—a scanning electron microscopy study. *Microsc Res Tech.* 2015; 78(12): 1112-6.
81. Freitas AO, Markezan M, Nojima Mda C, Alviano DS, Maia LC. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. *Dental Press J Orthod.* 2014; 19(2): 46-55.
82. Arweiler NB, Netuschil L, Beier D, Grunert S, Heumann C, Altenburger MJ, Sculean A, Nagy K, Al-Ahmad A, Ausschill TM. Action of food preservatives on 14-days dental biofilm formation, biofilm vitality and biofilm-derived enamel demineralisation in situ. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(3): 829-38.
83. Shpack N, Greenstein RB, Gazit D, Sarig R, Vardimon AD. Efficacy of three hygienic protocols in reducing biofilm adherence to removable thermoplastic appliance. *Angle Orthod.* 2014; 84(1): 161-70.
84. Neppelenbroek KH. The importance of daily removal of the denture biofilm for oral and systemic diseases prevention. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(6): 547-8.
85. Rajab LD. Clinical performance and survival of space maintainers: evaluation over a period of 5 years. *ASDC J Dent Child.* 2002; 69(2): 156-60.
86. Qudeimat MA, Fayle SA. The longevity of space maintainers: a retrospective study. *Pediatr Dent.* 1998; 20(4): 267-72.
87. Ireland AJ, Soro V, Sprague SV, Harradine NW, Day C, Al-Anezi S, Jenkinson HF, Sherriff M, Dymock D, Sandy JR. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res.* 2014; 17(2): 115-23.
88. Gomes SC, Varela CC, da Veiga SL, Rösing CK, Oppermann RV. Periodontal conditions in subjects following orthodontic therapy. A preliminary study. *Eur J Orthod.* 2007; 29(5): 477-81.
89. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnet AJ. Incidence of spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod.* 1982; 81: 93-8.

90. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary Streptococcus mutans levels in patients before, during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991; 100: 35-7.
91. Simsek S, Yilmaz Y, Gurbuz T. Clinical evaluation of simple fixed space maintainers bonded with flow composite resin. *J Dent Child.* 2004; 71(2): 163-8.
92. Sasa IS, Hasan AA, Qudeimat MA. Longevity of band and loop space maintainers using glass ionomer cement: A prospective study. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009; 10: 6-10.
93. Garg A, Samadi F, Jaiswal JN, Saha S. 'Metal to resin': a comparative evaluation of conventional band and loop space maintainer with the fiber reinforced composite resin space maintainer in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2014; 32(2): 111-6.
94. Yeluri R, Munshi AK. Fiber reinforced composite loop space maintainer: An alternative to the conventional band and loop. *Contemp Clin Dent.* 2012; 3: 26-8.
95. Saravanakumar MS, Siddaramayya J, Sajjanar AB, Godhi BS, Reddy NS, Krishnam RP. Fiber technology in space maintainer: a clinical follow-up study. *J Contemp Dent Pract.* 2013; 14(6): 1070-5.
96. Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Wilson Sallum A, Sallum EA. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004; 126(3): 363-6.
97. Wilson M: Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44: 79–87.
98. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997; 15:55-62.
99. Van Rijkom HM, Truin GJ, Van 'T Hof Ma. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res.* 1996; 75: 790-5.
100. Duke JA, Atchley A.A. Proximate analysis, in: *The Handbook of Plant Science in Agriculture*, B.R. Christie (Ed.), Boca Raton, FL: CRC Press, 1984, p. 307-320.
101. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(1): 61-4
102. Ono K, Nakane H, Meng ZM, Ose Y, Sakai Y, Mizuno M. Differential inhibitory effects of various herb extracts on the activities of reverse transcriptase and various deoxyribonucleic acid (DNA) polymerases. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37(7): 1810-2.

103. Kashket S, Paolino VJ, Lewis DA, Van Houte J. In vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. *Arch Oral Biol.* 1985; 30: 821–26.
104. Doddanna SJ, Patel S, Sundarrao MA, Veerabhadrappe RS. Antimicrobial activity of plant extracts on *Candida albicans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2013; 24(4): 401-5.
105. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr.* 2006; 25(2): 79-99.
106. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1698-702
107. Doğan H. Dünya’da ve Türkiye’de Çay Üretimi ve Gelişimi. *Tarım ve Yaşam Dergisi.* 1998; 4: 22-30.
108. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 633-636.
109. Jain A, Manghani C, Kohli S, Nigam D, Rani V. Tea and human health: the dark shadows. *Toxicol Lett.* 2013; 220(1): 82-7.
110. Butt MS, Imran A, Sharif MK, Ahmad RS, Xiao H, Imran M, Rsool HA. Black tea polyphenols: a mechanistic treatise. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014; 54(8): 1002-11.
111. Lombardo Bedran TB, Morin MP, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Black Tea Extract and Its Theaflavin Derivatives Inhibit the Growth of Periodontopathogens and Modulate Interleukin-8 and β -Defensin Secretion in Oral Epithelial Cells. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0143158.
112. Lantano C, Rinaldi M, Cavazza A, Barbanti D, Corradini C. Effects of alternative steeping methods on composition, antioxidant property and colour of green, black and oolong tea infusions. *J Food Sci Technol.* 2015; 52(12): 8276-83.
113. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin Med.* 2010;5:13.
114. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 1992; 21(3): 334-50.
115. Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63(9): 1621-3.
116. Altug T, Elmacı Y. Gıdalarda doğal olarak bulunan lezzet bileşenleri. İçinde; *Gıda Kimyası, Saldanlı B (Eds).* 1. Baskı. Ankara: Hacettepe Yayınları, 1998, s. 453-86.
117. Xie B, Shi H, Chen Q, Ho CT. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* 1993; 17: 77-84.

118. Schneider C, Segre T. Green Tea: Potential Health Benefits Am Fam Physician. 2009; 79(7): 591-4.
119. Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE, Min WK. In vivo antioxidant effect of green tea. Eur J Clin Nutr. 2000; 54: 527-9.
120. Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MB. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. J Nutr Biochem. 2004; 15(9): 506-16.
121. Taş S, Sarandol E, Ziyank S, Aslan K, Dirican M. Effects of green tea on serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutr Res. 2005; 25: 1061-74.
122. Cooper R, Morr  DJ, Morr  DM. Medicinal benefits of green tea: part II. Review of anticancer properties. J Altern Complement Med. 2005; 11(4): 639-52.
123. Nagano J, Kono S, Preston DL, Mabuchi K. A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki. Cancer Causes Control. 2001; 12(6): 501-8.
124. Suzuki Y, Tsubono Y, Nakaya N, Suzuki Y, Koizumi Y, Tsuji I. Green tea and the risk of breast cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. Br J Cancer. 2004; 90: 1361-3.
125. Kaur S, Greaves P, Cooke DN, Edwards R, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH. Breast cancer prevention by green tea catechins and black tea theaflavins in the C3(1) SV40 T,t antigen transgenic mouse model is accompanied by increased apoptosis and a decrease in oxidative DNA adducts. J Agric Food Chem. 2007; 55(9): 3378-85.
126. Li N, Han C, Chen J. Effects of tea on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamsters. Wei Sheng Yan Jiu. 1999; 28(5): 289-92.
127. Cheng TO. All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. Int J Cardiol. 2006; 108(3): 301-8.
128. Wang H, Wen Y, Du Y, Yan X, Guo H, Rycroft JA, Boon N, Kovacs EMR, Mela DJ. Effects of catechin enriched green tea on body composition. Obesity. 2010; 18: 773-9.
129. Rains TM, Agarwal S, Maki KC: Antiobesity effects of green tea catechins. a mechanistic review. J Nutri Biochem. 2011; 22: 1-7.
130. Westerterp-Plantenga MS. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. Physiol Behav. 2010; 100: 42-6.
131. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006; 290(6): 1550-6.

132. Diepvens K, Kovacs E.M.R, Lejeune M.P.G.M, Nijs I.P.V, Vogels N, Westerterp-Plantenga M.S. Effects of green tea on resting energy expenditure and substrate oxidation during weight-loss in overweight in females. *British Journal of Nutrition*. 2005; 94(6): 1026-34.
133. Li M, Liu JT, Pang XM, Han CJ, Mao JJ. Epigallocatechin-3-gallate inhibits angiotensin II and interleukin-6-induced C-reactive protein production in macrophages. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(4): 912-8.
134. Sirk T. W, Brown E. F, Friedman M, and Sum A K. Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *J. Agric. Food Chem*. 2009; 57: 6720–8.
135. Sirk T W, Brown E F, Sum A K, Friedman M. Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *J. Agric. Food Chem*. 2008; 56: 7750–8.
136. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Res*. 1999; 33(6): 441-5.
137. Zhang YM, Rock CO. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem*. 2004; 279(30): 30994-1001.
138. Sakanaka S, Okada Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52: 1688–92.
139. Okamoto M, Leung KP, Ansai T, Sugimoto A, Maeda N. Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18(3): 192-5.
140. Okamoto M, Sugimoto A, Leung KP, Nakayama K, Kamaguchi A, Maeda N. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(2): 118–120.
141. Gradisar H, Pristovsek P, Plaper A, Jerala R. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J Med Chem*. 2007; 50(2): 264-71.
142. Yam T S, Hamilton-Miller J M T, Shah S. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2 synthesis and β -lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 211–6
143. Sudano Roccaro A, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(6): 1968-73.

144. Lee KM, Yeo M, Choue JS, Jin JH, Park SJ, Cheong JY, Lee KJ, Kim JH, Hahm KB. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter*. 2004; 9(6): 632-42.
145. Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT. Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(6): 1369-74.
146. Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res*. 2005; 68(2): 66-74.
147. Okubo S, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against *Trichophyton*. *Nihon Saikingaku Zasshi*. 1991; 46(2): 509-14.
148. Chosa H, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Antimicrobial and microbicidal activities of tea and catechins against *Mycoplasma*. *Kansenshogaku Zasshi*. 1992; 66(5): 606-11.
149. Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(1): 69-74.
150. Elvin-Lewis M, Vitale MK, Opjas T. Anticariogenic potential of commercial teas. *J Prosther Dent*. 1980; 6: 273-6.
151. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1989; 53: 2307-11.
152. Moazenzadeh M. Anticariogenic effect of tea: A review of literature. *J Dent. Oral Hyg*. 2013; 5(9): 89-91.
153. Linke HA, LeGeros RZ. Black tea extract and dental caries formation in hamsters. *Int J Food Sci Nutr*. 2003; 54(1): 89-95.
154. Touyz LZ, Amsel R. Anticariogenic effects of black tea (*Camellia sinensis*) in caries prone-rats. *Quintessence Int*. 2001; 32: 647-50.
155. Yu H, Oho T, Tagomori S, Morioka T. Anticariogenic effects of green tea. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 1992; 83: 174-80.
156. Wu-Yuan CD, Chen CY, Wu RT. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of *mutans streptococci*. *J Dent Res*. 1988; 67(1): 51-5.
157. Kashket S, Paolino VJ, Lewis DA, van Houte J. In-vitro inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. *Arch Oral Biol*. 1985; 30(11-12): 821-6.
158. Zhang J, Kashket S. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. *Caries Res*. 1998; 32: 233-8.

159. Park JH, Tanabe Y, Tinanoff N, Turng BF, Lilli H, Minah GE. Evaluation of microbiological screening systems using dental plaque specimens from young children aged 6–36 months. *Caries Res.* 2006; 40: 277–80.
160. Simonetti G, Simonetti N, Villa A. Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. *J Chemother.* 2004; 16(2): 122-7.
161. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adams SE, Allison C, Beighton D. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res.* 2001; 80(9): 1828-33.
162. Tsuchiya H, Sato M, Kato H, Okubo T, Juneja LR, Kim M. Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci.* 1997; 703(1-2): 253-8.
163. Neta T, Takada K, Hirasawa M. Low cariogenicity of trehalose as substrate. *J Dent.* 2000; 28: 571–6.
164. Elvin-Lewis M, Steelman R. The anticariogenic effects of tea drinking among Dallas school children. *Journal of Dental Research.* 1986; 65:198.
165. Onisi M. The feasibility of a tea drinking program for dental public health in primary schools. *Journal of Dental Health.* 1985; 35: 134-44
166. Jones C, Woods K, Whittle G, Worthington H, Taylor G. Sugar, drinks, deprivation and dental caries in 14-year-old children in the north west of England in 1995. *Community Dent Health.* 1999; 16(2): 68-71.
167. Awadalla HI, Ragab MH, Fayed MT, Abbas MO, Bassuoni MW, Evaluation of the effect of green tea on dental caries and composite restorations. *TAF Prev Med Bull.* 2011; 10(3): 269-74.
168. Wei SH, Hattab FN, Mellberg JR. Concentration of fluoride and selected other elements in teas. *Nutrition.* 1989;5(4): 237-40.
169. Chan JT, Koh SH. Fluoride content in caffeinated, decaffeinated and herbal teas. *Caries Res.* 1996; 30(1): 88-92.
170. Simpson A, Shaw L, Smith AJ. The bio-availability of fluoride from black tea. *J Dent.* 2001; 29: 15–21.
171. Yoshiharu M, Kazuko K, Yukio H, Toshio T. Anti-demineralizing potential of bottled sugar-free green tea beverages in vitro. *Oral Sci Int.* 2009; 6: 21-26.
172. DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Minah GE, Niehaus C. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol.* 1989; 16(5): 311-5.
173. Kaur H, Jain S, Kaur A. Comparative evaluation of the antiplaque effectiveness of green tea catechin mouthwash with chlorhexidine gluconate. *J Indian Soc Periodontol.* 2014; 18(2): 178-82.

174. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T. Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A- stimulated human gingival fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*. 2009; 24: 391-6.
175. Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol*. 1993; 64(7): 630-6.
176. Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, et al. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *J Periodontol*. 2008; 79: 174-80.
177. You SQ. Study on feasibility of Chinese green tea polyphenols (CTP) for preventing dental caries. *Chin J Stomatol*. 1993; 28(4): 197-9.
178. Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Arch Pharm Res*. 1998; 21(3): 348-52.
179. Sakanaka S, Aizawa M, Kim M, Yamamoto T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996; 60: 745-9.
180. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S. Improvement o periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study. *J Periodontal Res*. 2002; 37: 433-8.
181. Kudva P, Tabasum ST, Shekhawat NK. Effect of green tea catechin, a local drug delivery system as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis patients: A clinicomicrobiological study. *J Indian Soc Periodontol*. 2011; 15(1): 39-45.
182. Awadalla HI, Ragab MH, Bassuoni MW, Fayed MT, Abbas MO. A pilot study of the role of green tea use on oral health. *Int J Dent Hyg*. 2011; 9: 110-6.
183. Rosenberg M, McCulloch CAG. Measurement of oral malodor. Current methods and future prospect. *J Periodontol*. 1992; 63: 776-82.
184. Lodhia P, Yaegaki K, Khakbaznejad A, Imai T, Sato T, Tanaka T, et al. Effect of green tea on volatile sulfur compounds in mouth air. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2008; 54: 89-94.
185. Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A, Guedon D, Netsch MI, Kreuter MH, Schmidlin CB, Schrenk D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. *Food Chem Toxicol*. 2005; 43: 307-14.
186. Takabayashi F, Tahara S, Kanerko T, Harada N. Effect of green tea catechins on oxidative DNA damage of hamster pancreas and liver induced by Nnitrosobis (2-oxopropyl) amine and/or oxidized soybean oil. *Biofactors*. 2004; 21: 335-37.
187. Sakamoto Y, Mikuriya H, Tayama K, Takahashi H, Nagasawa A, Yano N, Yuzawa K, Ogata A, Aoki N. Goitrogenic effects of green tea extract catechins by dietary administration in rats. *Arch Toxicol*. 2001; 75: 591-6.

188. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(7): 1864-73.
189. Fernández PL, Pablos F, Martín MJ, González AG. Study of catechin and xanthinetea profiles as geographical tracers. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(7): 1833-9.
190. Willson KC. "Coffee, Cocoa and Tea." New York: CABI Publishing, 1999, p.42-52.
191. Lo'pez FF, Cabrera C, Lorenzo ML, Lo'pez MC. Aluminum content in foods and beverages consumed in the Spanish diet. *J Food Sci.* 2000; 65: 206–10.
192. Costa LM, Gouveia ST, Nóbrega JA. Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. *Anal Sci.* 2002; 18(3): 313-8.
193. Van het Hof KH, Kivits GA, Weststrate JA, Tijburg LB. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52(5): 356-9.
194. McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21: 1–13.
195. Smullen J., Koutsou G.A., Foster H.A., Zumbé' A, Storey, D.M. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 2007; 41: 342–9.
196. Gopal J, Muthu M, Paul D, Kim DH, Chun S. Bactericidal activity of green teaextracts: the importance of catechin containing nano particles. *Sci Rep.* 2016; 6: 19710.
197. Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A. A simple approach to examine early oral microbial biofilm formation and the effects of treatments. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(5): 297-302.
198. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000; 40(2): 175-9.
199. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006.
200. Cardoso GA, Salgado JM, Cesar Mde C, Donado-Pestana CM. The effects of green tea consumption and resistance training on body composition and resting metabolic rate in overweight or obese women. *J Med Food.* 2013; 16(2): 120-7.
201. Spyrides SM, Prado Md, Araujo JR, Simão RA, Bastian FL. Effects of plasma on polyethylene fiber surface for prosthodontic application. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(6): 614-22.

202. Jongsma MA, van der Mei HC, Atema-Smit J, Busscher HJ, Ren Y. In vivo biofilm formation on stainless steel bonded retainers during different oral health-care regimens. *Int J Oral Sci.* 2015; 7(1): 42-8.
203. Low B, Lee W, Seneviratne CJ, Samaranyake LP, Haegg U. Ultrastructure and morphology of biofilms on thermoplastic orthodontic appliances in 'fast' and 'slow' plaque formers. *Eur J Orthod.* 2011; 33: 577-83.
204. Jensen B, Barthall D. A new method for estimation of SM count in saliva. *J Dent Res.* 1989; 68: 471-86.
205. Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(3): 183-9.
206. Auschill TM, Artweiller NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 48-53.
207. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the Mutans streptococcus count in plaque. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2014; 32(2): 91-6.
208. Güngör ÖE, Kırzioğlu Z, Dinçer E, Kıvanç M. Who will win the race in children's oral cavities? Streptococcus mutans or beneficial lactic acid bacteria? *Benef Microbes.* 2013; 4(3): 237-45.
209. Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics.* 2011; 4: 22.
210. Langfeldt D, Neulinger SC, Heuer W, Staufenbiel I, Künzel S, Baines JF, Eberhard J, Schmitz RA. Composition of microbial oral biofilms during maturation in young healthy adults. *PLoS One.* 2014; 9(2): e87449.
211. Holbrook WP, Magnúsdóttir MO. Studies on strains of Streptococcus mutans isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland. *J Oral Microbiol.* 2012; 4: 10-5.
212. Lif Holgersson P, Öhman C, Rönnlund A, Johansson I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PLoS One.* 2015 28; 10(5): e0128534.
213. Fournier A, Payant L, Bouclin R. Adherence of Streptococcus mutans to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998; 114(4): 414-7.
214. Hamilton M, Heersink J, Buckingham-Meyer K, Goeres D. *The Biofilm Laboratory.* Bozeman, Montana: Cytergy Publishing, 2003, p.104.
215. Priya S, Brundha S. Biofilm Formation by Streptococcus Serotypes on Dental Plaque. *International Journal of Advanced Medicine.* 2013; 1 :7-10.

216. Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbialbiofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2010; 83(2): 89-105.
217. Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am*. 1999; 43(4): 635-64.
218. Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*. 1988; 67(6): 890-5.
219. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*. 2009; 80(5): 255-62.
220. Linke HA, LeGeros RZ. Black tea extract and dental caries formation in hamsters. *Int J Food Sci Nutr*. 2003; 54(1): 89-95.
221. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995; 9(3): 214-30.
222. Bascones A, Morante S, Mateos L, Mata M, Poblet J. Influence of additional active ingredients on the effectiveness of non-alcoholic chlorhexidin mouthwashes: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2005; 76(9): 1469-75.
223. Yap AU, Tan BW, Tay LC, Chang KM, Loy TK, Mok BY. Effect of mouthrinses on microhardness and wear of composite and compomer restoratives. *Oper Dent*. 2003; 28(6): 740-6.
224. Jongsma MA, van de Lagemaat M, Busscher HJ, Geertsema-Doornbusch GI, Atema-Smit J, van der Mei HC, Ren Y. Synergy of brushing mode and antibacterial use on in vivo biofilm formation. *J Dent*. 2015; 43(12): 1580-6.
225. Barnett ML. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. *J Am Dent Assoc*. 2003; 134(6): 699-704.
226. Sköld-Larsson K, Borgström MK, Twetman S. Effect of an antibacterial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. *Clin Oral Investig*. 2001; 5(2): 118-21.
227. Lakade LS, Shah P, Shirol D. Comparison of antimicrobial efficacy of chlorhexidine and combination mouth rinse in reducing the *Mutans streptococcus* count in plaque. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2014; 32(2): 91-6.
228. Jenkins S, Addy M, Newcombe RG. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol*. 1994; 21: 441-4.
229. Twetman S, Hallgren A, Petersson LG. Effect of an antibacterial varnish on *mutans streptococci* in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries Res*. 1995; 29(3): 188-91.

230. Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(4): 397-402.
231. Gusberti FA, Sampathkumar P, Siegrist BE, Lang NP. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1988; 15: 60-7.
232. Bhate D, Jain S, Kale R, Muglikar S. The comparative effects of 0,12% chlorhexidine and herbal oral rinse on dental plaque-induced gingivitis: A randomized clinical trial. *J Indian Soc Periodontol*. 2015; 19(4): 393-5.
233. Mishra R, Tandon S, Rathore M, Banerjee M. Antimicrobial and plaque inhibitory potential of herbal and probiotic oral rinses in children: a randomized clinical trial. *Indian J Dent Res*. 2014; 25(4): 485-92.
234. Sharma R, Hebbal M, Ankola AV, Murugaboopathy V, Shetty SJ. Effect of two herbal mouthwashes on gingival health of school children. *J Tradit Complement Med*. 2014; 4(4): 272-8.
235. Salehi P, Momeni Danaie SH. Comparison of the antibacterial effects of persica mouthwash with chlorhexidine on streptococcus mutans in orthodontic patients. *DARU*. 2006; 14(4): 178-92.
236. Çiftçi Z, Kırzıoğlu Z, Nazıroğlu M. 2.45 Ghz Elektromanyetik Radyasyon Dış Gelişimi ve Çürük Oluşumuna Yatkınlık üzerine Etkisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Koruyuculuğunun İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Isparta, 2014; 59-64.
237. Hambire CU, Jawade R, Patil A, Wani VR, Kulkarni AA, Nehete PB. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% Camellia sinensis extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015; 5(3): 218-26.
238. Phelan J, Rees J. The erosive potential of some herbal teas. *J Dent*. 2003; 31(4): 241-6.
239. Smullen J, Finney M, Storey DM, Foster HA. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(4): 964-73.
240. Balappanavar AY, Sardana V, Singh M. Comparison of the effectiveness of 0,5% tea, 2% neem and 0,2% chlorhexidine mouth washes on oral health: a randomized control trial. *Indian J Dent Res*. 2013; 24(1): 26-34.
241. Zhao L, La VD, Grenier D. Antibacterial, antiadherence, antiprotease, and anti-inflammatory activities of various tea extracts: potential benefits for periodontal diseases. *J Med Food*. 2013; 16(5): 428-36.
242. Ferrara L, Montesano D, Senatore A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Farmaco*. 2001; 56(7): 397-401.

243. Archana S, Abraham J. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 1 (8); 149-52
244. Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 2003; 170 (8); 4335–41.
245. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 2007; 81; 519–33.
246. Yao LH, Jiang YM, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J, Raymont K, Lisle A, Xu Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry.* 2004; 84: 253-63.
247. Sun T, Ho C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry.* 2005; 90: 743-9.
248. Türkmen Erol N, Sarı F, Polat G, Velioglu YS. Antioxidant and Antibacterial Activities of Various Extracts and Fractions of Fresh Tea Leaves and Green Tea. *Tarım Bilimleri Dergisi.* 2009; 15 (4): 371-8.
249. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res.* 2006; 40(2): 223-31.
250. Kitani K, Yokozawa T, Osawa T. Interventions in aging and age-associated pathologies by means of nutritional approaches. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1019: 424-6.
251. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. *Caries Res.* 1999; 33(6): 441-5.
252. Naderi NJ, Niakan M, Kharazi Fard MJ, Zardi S. Antibacterial activity of Iranian green and black tea on streptococcus mutans: an in vitro study. *J Dent.* 2011; 8(2): 55-9.
253. Awadalla H. I, Ragab M.H, Fayed M.T, Abbas M.O, Bassuoni M. W. Evaluation of the effect of green tea on dental caries and composite restorations TAF. *Prev Med Bull.* 2011; 10(3): 269-74.
254. Mankovskaia A, Lévesque CM, Prakki A. Catechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(2): 203-7.
255. Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(3): 1229–36.
256. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol.* 1991; 173: 6558-67.

257. Elmas EY. Şekersiz (Tatlandırıcı) Sakızlara İlave Edilen Florid İçerikli Bileşiklerin Mine Başlangıç Çürük Lezyonları Üzerindeki Remineralizasyon Etkisinin, İnsitu Değerlendirilmesi. İstanbul Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007;78-92.
258. Takeuchi Y, Guggenheim B, Filieri A, Baehni P. Effect Of Chlorhexidine/Thymol And Fluoride Varnishes On Dental Biofilm Formation In Vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007 115: 468–72.
259. Tanner J, Vallittu PK, Söderling E. Effect of water storage of E-glass fiber-reinforced composite on adhesion of *Streptococcus mutans*. *Biomaterials.* 2001; 22(12): 1613-8.
260. Auschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB. Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin Oral Investig.* 2004; 8(2): 9 - 101.
261. Budtz-Jørgensen E. Clinical and microbiological evaluation of chemical immersion cleansers for patients with denture stomatitis. *Quintessenz.* 1984; 35(10): 1933-40.
262. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995; 74(5): 1152-61.
263. Kirzioğlu Z, Ertürk MS. Success of reinforced fiber material space maintainers. *J Dent Child.* 2004; 71(2):158-62.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Begüm	Soyadı	Gök
Doğum Yeri	Kırşehir	Doğum Tarihi	01.05.1985
Uyruğu	T.C.	Telefon	0 533 300 58 47
Email	Bgm.gk40@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	Süleyman Demirel Üni. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Isparta	2016
Yüksek Lisans	Ankara Üni. Diş Hekimliği Fakültesi	2008
Lisans	Ankara Üni. Diş Hekimliği Fakültesi	2007
Lise	Hacı Fatma Erdemir Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Diş Hekimi	Özel Kaman Tıp Merkezi	2008-2009

Yabancı Dilleri	KPDS/ÜDS Puanı	Diğer Puan
İngilizce-Orta	ÜDS; 67.2	

EKLER

Ek 1. Etik İzin


T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

SAYI : B.08.6.YÖK.2.SD.F.71.0.05.10.050/ 509

KONU : Etik Kurul Kararı

Sayın: Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumlu araştırmacı olduğunuz “Bitki ekstraktlarının ve probiyotiklerin oral biofilm üzerine etkinliklerinin incelenmesi” isimli çalışmanızın kurulumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 06.02.2013 tarih ve 33 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Mustafa AKCAM
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

EKİ: 1 Adet Etik Kurulu Kararı (2 Sayfa)

**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
İLAÇ DIŞI KARAR FORMU**

BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Bitki ekstraktlarının ve probiyotiklerin oral biofilm üzerine etkinliklerinin incelenmesi			
	VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Sorumlu : Prof.Dr. Zuhal KIRZIOĞLU Yardımcı : Dt. Begüm GÖK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Pedodonti			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Klinik Araştırma			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif Çalışma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.02.2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>			
DİĞER	<input type="checkbox"/>			

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
İLAÇ DIŞI KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 33	Tarih: 06.02.2013
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNYANI ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Mustafa AKÇAM

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mustafa AKÇAM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr Halil AŞCI	Farmakoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.A.Nesimi KİŞİOĞLU	Halk Sağlığı	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mustafa TÜZ	Kulak Burun Boğaz Hast.	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Fatih GÜLTEKİN	Tıbbi Biyokimya	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serpil DEMİRCİ	Nöroloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Doğan ERDOĞAN	Kardiyoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mekin SEZİK	Kadın Hastalıkları ve Doğum	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Zeynep Dilek AYDIN	İç Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Derya YILDIRIM	Ağız Diş ve Çene Radyolojisi	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Metin TOPCUOĞLU	Hukuk	SDÜ Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Kenan Ahmet TÜRKDOĞAN	Acil Tıp	Isparta Devlet Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Kadir KARAKUŞ	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Isparta Devlet Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzman Halil KARAKOÇ	Biyomedikal	SDU Araştırma Uyg. Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Osman PARÇAOĞLU	Sivil Üye	Osman Fotokopi İSPARTA	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Toplantıda Bulunma

Ek 2. Hasta Onam Formları

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yeşil çayın biyofilm üzerindeki anti-bakteriyel etkisinin değerlendirilmesi amaçlanan çalışmamızda çocuğunuz için özel olarak hazırlanacak yer tutucular, üst veya/ve alt çenelerine yerleştirilecektir. Çocuğunuz çalışmamıza; yer tutucu üzerinde oluşan oral biyofilm elde etmemizi sağlamak amacıyla katılacaktır. Bu uygulama çocuğunuz için hiçbir şekilde rahatsızlık ve risk taşımamaktadır.

Çocuğunu çalışma kapsamında ihtiyacı olan yer tutucuları hekiminizin önerdiği şekilde kullanacaktır. Yer tutucusunuz kullanırken 3 hafta süre ile günde 2 kez 10 ml yeşil çayın metanol veya su ile hazırlanacak ekstraktını 5 saniye çalkalama yapacaktır. Günlük alışkanlıkları ve gereksinimlerinde herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Tarafımızdan sağlanacak yaşına aralığına uygun diş fırçası ve flor içermeyen diş macunu ile dişlerini diş hekiminin önerdiği şekilde fırçalayacaktır. Hekiminizin sizin için oluşturduğu randevularda tükürük ve yer tutucu üzerinden alınacak biyofilm örneği ile çalışmamızın sizinle ilgili kısmı tamamlanmış olacaktır. Çalışmayı devam etmenize neden olacak herhangi bir sağlık sorununda hekiminizi bilgilendirmeniz gerekmektedir.

Bu klinik çalışmada çocuğumun yer almasını kabul ediyorum. Çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım.

Tarih :

Hastanın Adı-Soyadı :

Hastanın Yaşı- Cinsiyeti : Hastanın İmzası :

Velinin Adı-Soyadı : Veli İmzası :

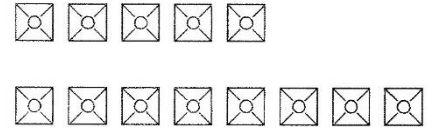
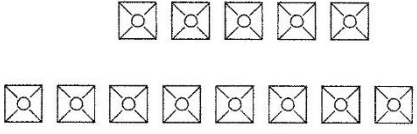
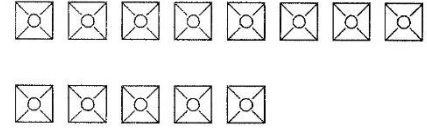
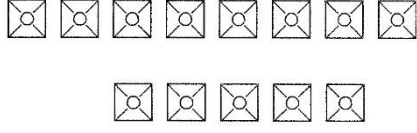
Tanıklık eden kurum yetkilisi imzası :

Araştırmacı imzaları :

BİOFİLM ÖRNEĞİ ALINCAK HASTA BİLGİ EDİNME FORMU

Adı Soyadı:	Tel no:
Adresi:	Doğum tarihi:
Doğum yeri:	
Çocuğun Sosyal Güvencesi:	
Anne ve Babanın Meslekleri:	
Anne ve Babanın Eğitim Durumu:	
Kardeş Sayısı:	
Kaçıncı Çocuk Olduğu:	
Medikal Bir Problemi Var Mı? Varsa Nedir?	
Herhangi Bir Alerjisi Var Mı?	
Son İki Ay İçerisinde Antibiyotik Kullanıldı mı?	
Son 2 ay içerisinde herhangi bir medikal tedavi aldı mı?	
Rutin Olarak Probiyotik Ürün Kullanılıyor mu?	
Son 2 Ay İçerisinde Flor Uygulaması Yapıldı mı?	
Kullanılmakta Olan Bir Tatlandırıcı Ürün Var mı?	
Dişlerini Hangi Sıklıkla Fırçalıyor?	
Kullanılan Diş Macunu?	
Diş İpi Kullanılıyor mu?	
Gargara Kullanılıyor mu?	

Ağız İçi Muayene Bulguları



Çürük lezyonu

- Ç 0 Opak renklenmeli çürük
Ç 1 Mine çürüğü
Ç 2 Dentin çürüğü
Ç 3 Pulpa perforasyonu
Ç 4 Sadece kökü içeren çürük

Evet

Hayır

Dişlerde florozis var mı?

Diş etinde kanama varlığı?

Diş etinde enfeksiyon varlığı?

Biofilm Örneklerinin Alınması

Kullanılan Ağız İçi Aparey:

Kullanım Süresi:

Aparey Temizliğinde Ne Kullanılıyor:

Biofilm Örneklerinin Alındığı Saat:

Hareketli Protez

Alt Çene

Destek Diş Kroşe Teli Akrilik Gövde Akrilik Diş Oral Mukoza

Üst Çene

Destek Diş Kroşe Teli Akrilik Gövde Akrilik Diş Oral Mukoza

Sabit Döküm

Destek Diş Döküm Gövde

Sabit Fiber

Destek Diş Fiber Gövde

EBEVEYN ONAMI:

Pedodonti kliniğinde yapılacak olan işlemler ve sonuçları hakkında bilgilendirildim. Yapılacak tedavileri, ağız içi apareyler, ağız dokuları ve dişler üzerinden plak örneği alınmasını ve bilimsel çalışmalarda kullanılmasını onaylıyorum.

Ebeveyn Adı Soyadı:

Tarih ve İmza: