



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ
ANABİLİM DALI

CAD/CAM RESTORATİF MATERYALLERİN YÜZEY ÖZELLİKLERİ VE
BAKTERİYEL ADEZYONUN İNCELENMESİ

Dt. Deniz TAYFUN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çağatay BARUTÇUGİL

2020-ANTALYA



Dt. Deniz TAYFUN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

CAD/CAM RESTORATİF MATERYALLERİN YÜZEY ÖZELLİKLERİ VE
BAKTERİYEL ADEZYONUN İNCELENMESİ

Deniz TAYFUN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Çağatay BARUTÇUGİL

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TDH-2017-3003 proje numarası ile desteklenmiştir.

ONAY SAYFASI

Deniz TAYFUN tarafından sunulan bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir. 05/02/2020

Üye : Doç. Dr. Nurcan ÖZAKAR İLDAY Atatürk Üniversitesi

İmza

Üye : Doç. Dr. Çağatay BARUTÇUGİL Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşe DÜNDAR Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, 08/01/2020 tarih ve 4/5 sayılı Yönetim Kurulu kararıyla belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Diş Hekimliği Fakültesi Kurum Yöneticisi

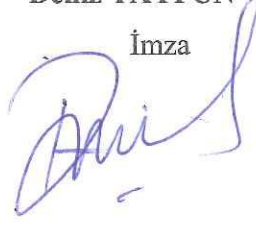
ETİK BEYAN

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 beyan ederim.

Aday

Deniz TAYFUN

İmza



TEŐEKKÖR

Uzmanlık TEZ'imin gerçekleştirilmesinde, çalıőmasında ve yazımında katkıları olan değerli Hocalarıma ve Akademi camiası çalıőanlarına, T.C. Devlet'inin Saygın Kurumlarına, beni bu gÖnlere getiren ve her daim desteklerini esirgemeyen baőta canım ailem olmak Özere tÖm sevenlerime sonsuz saygılarımı ve içtenlikle ŐÖKRAN'larımı sunarım.



ÖZET

CAD/CAM RESTORATİF MATERYALLERİN YÜZEY ÖZELLİKLERİ VE BAKTERİYEL ADEZYONUN İNCELENMESİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, 4 rezin esaslı CAD/CAM blok ile 1 lösit güçlendirilmiş cam seramik CAD/CAM bloğun, standart polisaj ve bitim işlemi sonrası yüzey özelliklerini ve *S. Mutans* ile *S. Mitis* ile olan etkileşimlerinin KLTM ve SEM yardımıyla incelenmesidir.

Materyal ve Metot: Çalışmada IPS Empress CAD, VİTA Enamic, Lava Ultimate, Shofu Blok HC ve Cerasmart test materyali olarak belirlenmiştir. Hassas kesme cihazı yardımıyla bloklardan 10 mm x 10 mm x 1 mm boyutunda kesitler alınarak toplam 80 numune hazırlanmıştır (n=16). Daha sonra numuneler rastgele seçilerek iki alt gruba ayrılmıştır (n=5). Numunelerin polisaj işlemi Sof-Lex diskler ve cila pastası kullanılarak gerçekleştirildikten sonra, profilometre yardımıyla pürüzlülük değerleri (Ra) belirlendi. Petri kaplara yerleştirilen steril numuneler yapay tükürük ile kaplanarak pelikül oluşumu için 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Daha sonra tüm numuneler *S. mutans* ve *S. mitis* içeren %5 glikoz BHI besiyerinde, 35 °C ve %5 CO₂ ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bakteri koloni sayımı mikroyuvar okuyucu yardımıyla belirlenmiştir.

Bulgular: İstatistiksel analiz Kruskal Wallis H testi ve post hoc Dunn-Bonferroni testi uygulanarak değerlendirildi. Pürüzlülük analizi sonucu LAV ve CER'nın, VIT ve IPS'ye göre istatistiksel olarak farklı olduğu (p<0,05), SHF grubunda ise bir farklılık bulunamamıştır (p>0,05). Hidrofobiklik testi sonucunda IPS grubunun istatistiksel olarak farklılık sergilediği (p<0,05), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık görülmemiştir. En düşük hidrofobiklik değerleri IPS ve VIT için elde edilmiştir. En düşük serbest yüzey enerjisi (γ_{tot} [mN/m]) değerleri CER grubunda olduğu görülmüş, bunu sırasıyla SHF, LAV, VIT ve IPS grupları izlemiştir. *S. mutans* ve *S. mitis* bakteri koloni (10⁸ CFU/ml) sayılarının karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Sonuç: Yapılan bu in vitro çalışmanın sınırlamaları dahilinde, yüzey özelliklerindeki farklılıklara rağmen, biyofilm oluşumunda bir farklılık görülmemiştir. Pelikül'in, biyofilm oluşumunda etkin rol oynadığı, adherent yüzey farklılıkları üzerinde değişiklik oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: CAD/CAM, bakteriyel adezyon, pürüzlülük, hidrofobiklik, SEM, konfokal



ABSTRACT

SURFACE FEATURES OF CAD / CAM RESTORATIVE MATERIALS AND INVESTIGATION OF BACTERIAL ADHESION

Objective: The aim of this study is to investigate the surface properties of 4 resin-based CAD / CAM blocks and 1 leucite reinforced glass ceramic CAD / CAM block after standard polishing and finishing, and their interactions with *S. Mutans* and *S. Mitis*.

Material and Method: IPS Empress CAD, VITA Enamic, Lava Ultimate, Shofu Blok HC and Cerasmart test materials were determined in the study. A total of 80 samples were prepared by taking 10 mm x 10 mm x 1 mm sections from the blocks with the help of a precision cutting device (n = 16). The samples were then randomly selected and divided into two subgroups (n = 5). After polishing, the samples were carried out using Sof-Lex discs and polishing paste, the roughness values (Ra) were determined by using the profilometer. Sterile samples placed in Petri dishes were covered with artificial saliva and incubated for 1 hour at 37 °C for pellicle formation. Then, all samples were incubated for 24 hours in 5% glucose BHI medium containing *S. mutans* and *S. mitis* in 35 °C and 5% CO₂ medium. Bacterial colony count was determined with the aid of a microplate reader.

Results: Statistical analysis was evaluated by Kruskal Wallis H test and post hoc Dunn-Bonferroni test. As a result of the roughness analysis, LAV and CER were statistically different compared to VIT and IPS (p <0.05) and no difference was found in the SHF group (p > 0.05). As a result of the hydrophobicity test, statistically significant difference was found in the IPS group (p <0.05) but no significant difference between the other groups. The lowest hydrophobicity values were obtained for IPS and VIT. The lowest free surface energy (γ_{tot} [mN / m]) values were found to be in the CER group, followed by the SHF, LAV, VIT and IPS groups, respectively. No significant difference was found between the groups when comparing *S. mutans* and *S. mitis* bacterial colony (10⁸ CFU / ml) numbers (p > 0.05).

Conclusion: Within the limitations of this in vitro study, no differences in biofilm formation were observed despite differences in surface properties. Pellicle has been shown to play an active role in biofilm formation and to create adherent surface differences.

Keywords: CAD / CAM, bacterial adhesion, roughness, hydrophobicity, SEM, confocal

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(G_{TOT})	Total etkileşim enerjisini
(ΔG_{adh}^{AB})	Polar veya asit-baz ara yüzey serbest enerjisi
(3D)	Üç boyutlu
(AFM)	Atomik kuvvet mikroskobu
(AMS)	Yapay ağız sistemi
(BHI)	Brain heart infusion
(BİS-GMA)	Bisfenol-A glisidil dimetakrilat
(CAD/CAM)	Bilgisayar destekli tasarım/ bilgisayar destekli üretim
±	Artı ve eksi
(CER)	Cerasmart
(DLVO)	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
(DMA)	Dimetilmetakrilat
(EDS veya EDX)	Enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi
(EPS)	Hücre dışı polisakaritler
(GA)	Lifshitz-van der Waals çekim kuvvetleri
(GE)	Elektrostatik itici kuvvetler
[HT]	Yüksek sıcaklık
[HT-HP]	Yüksek basınç
(İK)	İndirekt kompozit
(IPS)	IPS Empress CAD
(IR)	Kızılötesi
(KLTM)	Konfokal lazer taramalı mikroskop
(LAV)	Lava ultimate
(LDS)	Lityum disilikat seramikler
(LSP)	Lityum silikat / fosfat
(ODTÜ)	Ortadoğu Teknik Üniversitesi
(PBS)	Fosfat tamponlu salin
(PICN)	İnorganik fazlı in filtre seramik ağ

(PMMA)	Polimetil metakrilatlar
(PRP)	Prolin'den zengin proteinler
(QS)	Quorum sensing
(Ra)	Rautment
(RMS)	Rezin matriks seramikler
(S)	Streptococcus
(SEM)	Taramalı elektron mikroskobu
(SHF)	Shofu blok HC
(SYE)	Serbest yüzey enerjisi
(TEGDMA)	Trietilen glikol dimetakrilat
(UDMA)	Üretan dimetakrilat
(UV)	Ultraviöle
(VIT)	VITA enamic
(XPS)	X-ışını fotoelektron spektroskopis
(Zr)	Zirkonya
(γ_d)	Dağıtıcı bileşen
(γ_p)	Kutupsal bileşenler
(γ_{tot})	Total yüzey enerjisi
(ΔG_{adh})	Ara adezyon serbest enerjisi
(γ_{bl})	Bakteri-sıvı ara yüzey enerjisi
(γ_{sb})	Yüzey- bakteri ara yüzey serbest enerjisi
(γ_{sl})	Yüzey-sıvı ara yüz serbest enerjisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Güncel seramik materyallerin sınıflandırılması

Şekil-2: Polimerin infiltre edilmiş seramik ağ (PICN) ve dağılmış dolduruculu kompozit polimerin (siyah ok ile işaretlenen alan) mikro yapısının şematik gösterimi. (Turuncu oklar seramik yapıyı göstermektedir.)

Şekil-3: Biyofilm oluşumunun aşamaları

Şekil-4: (a) Dinamik plak oluşum sürecinin dört aşamalı şematik gösterimi, (b) Negatif yüklü bir bakteri ile negatif yüklü bir yüzey arasında Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO) teorisine göre uzun süreli etkileşimi

Şekil-5: Bakteri adezyonunda etkili yüzey parametreleri şematik olarak gösterilmiştir

Şekil-6: Young denklemindeki miktarları gösteren bir sıvı damlasının şeması

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1- Kullanılan materyaller ve içerikleri

Tablo 2- Yüzey pürüzlülüğü değerleri ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar

Tablo 3- Su, dimetil sülfoksit, etilen glikol temas açısı verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4- SYE ölçümü değerleri

Tablo 5- Yüzeye tutunan bakteri koloni sayıları



RESİMLER

Resim 1: Elmas disk ve düşük hızlı hassas kesme cihazın görünümü.

Resim 2: Dijital kumpas yardımıyla boyutları ölçülerek seçilen standart numuneler

Resim 3: Sof-Lex ekstra ince polisaj diskleri

Resim 4: Kalibrasyon el cihazı, Handpiece Counter 2

Resim 5: Polisaj işlemi sonunda elde edilen yüzeyin görünümü

Resim 6: a) Theta KSV goniometre b) su, dimetilsulfoksit ve etilen glikol ile yapılan damla testi

Resim 7: a) SEM-EDS testi öncesi numunelerin kaplama ünitesinde altın palladium ile kaplanması b) Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu

Resim 8: Pürüzlülük testi için kullanılan profilometre cihazının görünümü

Resim 9: S. mutans ve S. mitis süspansiyonlarının hazırlanması

Resim10: Steril edilmiş numunelerin S. mutans ve S. mitis için belirlenen petri kaplarındaki görünümü

Resim 11: Numunelere, %5 glikoz içeren BHI sıvı besiyeri eklenmesi

Resim 12: LIVE/DEAD® BacLight L13152 bakteri boyama kit'in görünümü

Resim 13: Kullanılan konfokal lazer tarama mikroskobu LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany) argon-helium'un görünümü

Resim 14: IPS (a), VIT (b), LAV (c), SHF (d), CER (e) gruplarının 5000x ve 20000x büyütmede SEM görüntüleri

Resim 15: IPS (a), VIT (b), LAV (c), SHF (d), CER (e) gruplarının EDS analiz görselleri

Resim 16: IPS (a1- S.mutans, a2- S. mitis), LAV (b1- S. mutans, b2- S. mitis), CER (c1- S. mutans, c2- S. mitis), VIT (d1- S. mutans, d2- S. mitis), SHF (e1- S. mutans, e2- S. mitis) gruplarının KTLM analiz görselleri

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLOLAR DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.2. CAD/CAM materyallerin gelişimi	4
2.2.1. Geleneksel rezin kompozit materyallerin bileşenleri	4
2.2.2. İndirekt kompozit (IK)'ler.....	5
2.3. CAD/CAM rezin esaslı sistemler	7
2.3.1. Dağılmış dolduruculu CAD/CAM bloklar	8
2.3.2. PICN materyaller.....	8
2.4. Cam-seramik CAD/CAM bloklar	9
2.4.1. Lösit güçlendirilmiş cam-seramikler.....	9
2.4.2. Lityum disilikat seramikler	10
2.4.3. Oksit seramik zirkonya seramikleri.....	10
2.5. Ağız-diş sağlığında oral mikrobiyata'un rolü	10
2.5.1. Mikrobiyata ve biyofilm.....	11
2.5.2. Biyofilm oluşumu.....	11
2.5.3. Biyofilmin olgunlaşması	14
2.5.4. Quorum sensing (QS).....	14

2.6. Bakteriyel adezyonda etkili non-spesifik biyokimyasal mekanizmalar ve fizikokimyasal etkileşimler	15
2.6.1 Bakteriyel adezyonda adherentin yüzey özelliklerinin etkisi.....	20
2.6.2. Yüzey şarjı.....	20
2.6.3. Yüzey pürüzlülüğü ve yüzey topoğrafyası.....	21
2.6.4. Yüzey serbest enerjisi (SYE)	22
2.6.5. Yüzeyin kimyasal yapısı	22
2.6.. Yüzey sertliği	22
2.7. Adherentin yüzey özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan test metodları	23
2.7.1. Pürüzlülük ölçümü	23
2.7.2. SEM-EDS.....	23
2.7.3. Yüzey serbest enerjisi (SYE) ve kontak açısı ölçümü	24
2.7.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM).....	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	28
3.1.Çalışmada kullanılan materyaller	28
3.2. Örneklerin hazırlanması	28
3.3. Örneklerin polisaj işlemleri ve uygulama aşamaları	30
3.4. Temas açısı ve serbest yüzey enerjisi ölçümü (SYE).....	31
3.5. Taramalı elektron mikroskop (SEM/ EDS) görüntüleme.....	32
3.6. Pürüzlülük ölçümü	32
3.7. Yapay tükürüğün elde edilmesi	33
3.8. Seçilen bakterilerin çoğaltılması ve bakteri kültürünün elde edilmesi.....	33
3.8.1. Numunelerin hazırlanması	33
3.8.2. Fosfat tamponlu salin (PBS) hazırlanması.....	33
3.8.3. Kullanılan besiyerleri	34
3.8.4. Bakteri süspansiyonunun hazırlanması	34

3.8.5. Numunelere bakteri adezyonunun sağlanması.....	35
3.8.6. Bakteri sayımının yapılması.....	36
3.9. Bakterilerin boyanması.....	36
3.10. Konfokal lazer taramalı mikroskopuyla görüntüleme	37
3.11. İstatiksel analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Yüzey pürüzlülüğü bulguları.....	39
4.2. Temas açısı ve serbest yüzey enerjisi bulguları	39
4.3. SEM/EDS bulguları.....	40
4.4. Bakteri sayımı bulguları	45
4.5. Konfokal lazer taramalı mikroskopu (KLTM) bulguları	45
5.TARTIŞMA.....	47
6.SONUÇ	61
KAYNAKLAR	62

1. GİRİŞ

Günümüzde modern diş hekimliği tedavi planlamalarına yönelik materyal seçiminde belirlenen kriterlere uygun ve öngörülen gereksinimleri bir arada karşılayabilecek özelliklere sahip materyallere duyulan ihtiyaç, belirgin şekilde öne çıkmıştır. Yapısal bütünlüğün korunmasını amaçlayan mükemmel mekanik / işlevsel özellikler ve biyouyumluluk bu özelliklerin başlıcalarından olup, bunların yanısıra doğal renk uyumu ve uygun anatomik form gibi estetik beklentileri karşılayacak, uzun dönem sürdürülebilirliği etkileyecek optimum parlatalabilirlik gibi avantajlar, arzu edilen birçok özelliklerin arasında sayılmaktadır (1).

Materyal özelliklerinin iyileştirilmesi doğrultusunda, dental materyaller alanında yeni organik yapılar hariç, özellikle doldurucu partiküllerinin gelişimi ivme kazanmıştır (2). Doldurucu konfigürasyonu, oranı ve monomer kimyasındaki yeniliklere paralel, polimerizasyon dinamiklerinin modifikasyonu da gelişim göstermiştir.

Bilgisayar destekli tasarım / bilgisayar destekli üretim (CAD/CAM) teknolojisi, günümüzde kullanılan materyal formunda devrime yol açarak (3), CAD/CAM uygulamalarına yönelik materyal gelişimini tetiklemiştir. Bu yenilikler, dental materyal bilimi içerisinde aktif araştırma alanlarından birinin doğmasına yol açmıştır (4). Son yıllarda CAD/CAM materyalleri alanındaki çalışmalar, seramiklerin dayanıklılık ve renk stabilitesi gibi avantajlı özelliklerini, kompozit rezinlerin düşük abraziv ve elastik özellikleriyle harmanlamayı başararak, yeni formülasyonları ortaya çıkarmıştır (5).

Ağız boşluğu, polimikrobiyal biyofilmlerin bulunduğu karmaşık yapıda olan dinamik bir ekosistemi temsil eder (6). Çürük lezyonlarından sorumlu birçok bakteri türünün, çevre yumuşak ve sert dokularda meydana gelen biyofilmlerden izole edildiği, bu alanda görülen hastalıkların, sıklıkla oral mikroflorada meydana gelen dengenin bozulmasıyla ilgili olduğu uzun zamandır bilinmektedir.

Ağız içerisinde dental restoratif materyallerin yüzeylerinde biyofilm oluşumunun önemi, ayrıca sürdürülebilirlik yönünden mikroorganizma adezyonuna karşı olan duyarlılıkları, günümüzde belirgin şekilde vurgulanmıştır (7, 8). Rezin esaslı kompozit materyallerin, özellikle karyojenik biyofilmlerin gelişimine karşı duyarlı olduklarının

anlaşılması (9, 10) materyal özellikleriyle olan ilişkilerinin araştırılması zorunluluğunu getirmiştir.

Dental restorasyonların başarısızlıklarında sekonder çürük gelişimi ve biyofilm başlıca sebepler olarak gösterildiğinden (11, 12), tercih edilen materyallerin yüzeyindeki başlangıç bakteri adezyonunun olası etkilerinin anlaşılması halen cevap bekleyen soruların başındadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. CAD/CAM teknolojisinin kısa tarihi

Diş hekimliğine yönelik CAD/CAM sistemleri 1980'lerde ortaya çıkmıştır. Özellikle güncel dental CAD/CAM sistemlerin gelişmesine katkıda bulunan üç öncü isim vardır. Dr. Duret, dental CAD/CAM alanında, 1971'den itibaren ağızdaki abutment dişin optik izleniminin elde edilmesiyle başlayan sistemler dizisinin yardımıyla, fonksiyonel oklüzal yüzeye sahip kronlar tasarlayarak ve frezeleyerek üretmeyi başarmıştır. Bu başarısını dental CAD/CAM sistemlerinin gelişimine yön verecek olan Sopha® System'ı geliştirerek sürdürmüştür (3).

Daha sonraları CEREC® sisteminin geliştiricisi olan Dr. Moermann (13), bu yeni teknolojiyi klinikte kullanarak bir inlay tasarımı yapmış ve kompakt bir cihaz yardımıyla seramik bloktan üretilmesini başarmıştır. Sistemin aynı gün seramik restorasyonların elde edilmesine izin veriyor olması, yenilikçi bir etki yaratarak hızla CAD/CAM teriminin diş hekimliği alanında yaygınlaşmasına yol açmıştır.

Bunu gelişmeleri Procera® sisteminin geliştiricisi Dr. Andersson takip ederek, bu akımı önceleri kompozit veneer restorasyonların üretim prosesinde (14), sonraları seramik çerçevelerin imalatına dahil ederek, CAD/CAM teknolojisini daha da geliştirmiştir.

İlk dönem CAD/CAM sistemleri, inlay, onlay ve tek kronları üretebilmekteydi. Şimdilerde ise, CAD/CAM teknolojileri, tasarım sistemleri, freze makineleri ve diğer aletler yardımıyla, inlay / onlay ve kronlar dışında, veneerlerden, implant abutmentlar ve sabit veya hareketli protetik restorasyonlara kadar geniş bir yelpazeyi içinde barındırmaktadır.

Hali hazırda en belirgin imalat yöntemi milledme olsa da üç boyutlu (3D) baskı gibi ilave teknolojiler giderek daha popüler hale gelmektedir. Gelecekte daha iyi yazıcılar ve ilave restoratif materyallerin geliştirilmesiyle, 3D baskı tercih edilen üretim süreci haline gelebilecektir.

İmal edilebilecek restorasyonların spektrumu, freze makinesine, kullanılan bloğunun boyutuna ve seçilen materyalin özelliklerine bağlıdır. Materyal seçimi kompozit

rezinlerden, polimetil metakrilatlardan (PMMA'lar), zirkonya (Zr) veya silika bazlı ve yüksek dayanıma sahip seramiklere kadar değişmektedir.

Tüm avantajlarına rağmen, CAD/CAM teknolojisinin ortak kullanımı henüz tam olarak yaygınlaşmamıştır. Yüksek başlangıç ve bakım maliyetleri yanında gereken eğitim süreci ve geleneksel yöntemlerin kabul edilebilirliğinin devam etmesi, engel olarak görülebilir (15).

2.2. CAD/CAM materyallerin gelişimi

2.2.1. Geleneksel rezin kompozit materyallerin bileşenleri

Geleneksel bir rezin kompozit materyalin başlıca bileşenleri aşağıdaki gibidir:
(16)

- Yüksek moleküler ağırlıklı esas monomerler ve düşük moleküler ağırlıklı seyreltici monomerler
- İnorganik doldurucular
- Silan ajanlar, polimerizasyon inhibitörleri, initiatör / aktivatör bileşenler ve ultraviyole dengeleyiciler

Günümüzde rezin kompozit materyallerin yaklaşık %50'si, aromatik dimetakrilat sistemine dayanmaktadır. Asıl monomer genellikle bisfenol-A glisidildimetakrilat (BİS-GMA)'dır. Yüksek viskoziteye sahip bu temel monomerin seyreltilmesi için düşük molekül ağırlıklı monomerler ilave edilerek, organik yapının temeli oluşturulur. İnorganik doldurucular ise, rezin kompozit materyallerin özelliklerinde önemli bir rol oynar. Bunlar;

- Basınç dayanımı, elastik modül ve sertlik gibi mekanik özellikleri geliştirmek
- Termal genleşme katsayısını azaltmak
- Polimerizasyon büzülmesini azaltmak
- Polimerizasyon sırasında oluşan ısıyı azaltmak
- Restorasyonun estetiğine katkıda bulunmak

- Radyopak bir materyal üretiminin (baryum veya stronsiyum camları kullanılıyorsa) sağlanmasında kullanılmaktadırlar.

Kompozit rezin materyallerin son bileşenleri silan ajanları ve ultraviyole (UV) polimerizasyon önleyicilerdir. Polimerin doldurucu ile takviye edilmesini sağlamak için, iki bileşenin birbirine bağlanması esastır. Bunu sağlamak için doldurucu materyal bir vinil silan bileşiği ile işleme tabii tutulur.

2.2.2 İndirekt kompozit (IK)'ler

Mevcut IK'leri birbirinden ayıran ve etkileyen en önemli özellikler;

- Üretim prosesinin tipi (geleneksel ve endüstriyel CAD/CAM bloklar)
- Mikro yapısal içerik (dağılık doldurucular)
- Polimerizasyon modu (yüksek sıcaklık [HT] veya yüksek sıcaklık- yüksek basınç [HT-HP])
- Resin matriks bileşimi
- Doldurucu tipi, boyutu ve hacim içeriğidir.

IK'ler, direkt kompozitler gibi tabakalanarak uygulanan materyallerdir. Aynı bileşime ve yapıya sahip olsalar da, kavite marjinaleri veya diş dokuları üzerindeki polimerizasyon büzülme geriliminin olumsuz etkisini önlemek amacıyla ekstra oral olarak fotopolimerize edilirler (17). Işıkla aktive olan rezin kompozitlerin polimerizasyon etkinliğini, ışık ünitesi ve parametreleri (ışıklandırma zamanı ve modu), sıcaklık, materyalin bileşimi (foto başlatıcı, monomerler, doldurucular, pigmentler), viskozitesi ve optik özellikleri gibi birçok faktör etkileyebilir (18). Sonuç olarak, dönüşüm derecesi sınırlıdır ve uygulayıcıya bağlıdır. Farklı parametrelere bağlı olarak direkt veya indirekt olarak ışıkla polimerize olan kompozitler için, dönüşüm derecesinde yaklaşık %40- %75 arasında değişen in vitro değerler rapor edilmiştir (19, 20).

Işınım yüzeyden derinliğe doğru değiştiğinden, polimerleşme homojen değildir, bu da materyal içinde gerilim stresleri oluşturur (21). Bu dezavantajların, mekanik özellikler ve serbest monomerlerin salınımı üzerinde olumsuz bir etkisi vardır (22-24). Bazı ürünler için, sıcaklığın uygulanmasına izin veren (>100°C) tamamlayıcı özel polimerizasyon üniteleri geliştirilmiştir. Isı ile polimerizasyon, dönüşüm derecesi (19)

ve fleksural dayanımı (25) arttırdığı ve reaksiyona girmemiş monomerleri azalttığı gösterilmiştir (26). Isı'nın polimerizasyona etkisi şu şekilde yorumlanabilir;

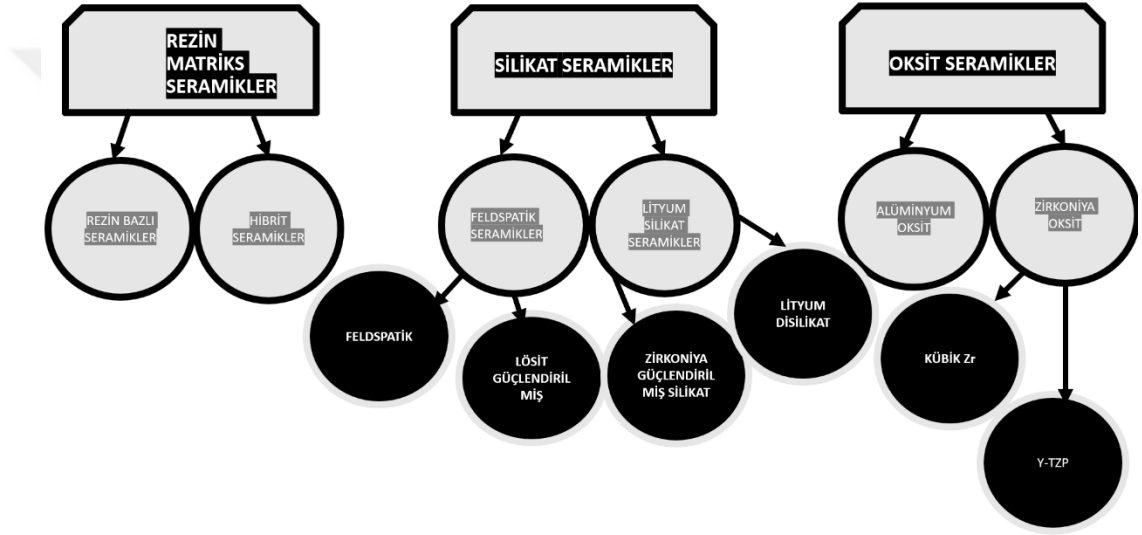
- tepkimeye girmemiş monomerlerin uçucu hale gelmesini sağlayarak uzaklaştırmak
- çift bağ dönüşümünü, monomerlerin hareketliliğini ve polimer zincirlerin çapraz bağlamasını arttırmak (19, 26)

Polimerizasyon modu, mekanik davranışları iyileştirici tek parametre değildir. Doldurucu partiküllerinin türü, büyüklüğü, hacim oranı ve rezin matris olan bağları, genellikle mekanik özellikler üzerinde önemli faktörler olarak belirtilir. Doldurucu içeriğinin artırılmasıyla, gerilme/basınç dayanımı, sertlik/elastikiyet modülü de artırılabilir (23, 27). Çok parametreliliği bir özellik olan aşınma direncinin, doldurucu içeriğinden (22, 27) ve partikül büyüklüğü dışında, geometrik yapı ve dağılım düzeyinden (28) yüksek oranda etkilendiği gösterilmiştir.

Doldurucu içeriğinin küçük boyutlara sahip olmasının avantajı, yapılan bazı klinik çalışmaların sonuçlarıyla doğrulanmıştır (29). Örneğin, Nguyen ve ark., HT-HP dağınık dolduruculara sahip deneysel kompozitleri analiz ederek, mekanik özelliklerin doldurucu içeriği ile artış gösterdiğini doğrulamıştır (30). Bununla birlikte, hacimce %60'ın üzerinde doldurucu içeriği, doldurucuların karışımında karşılaşılan zorluk nedeniyle bükülme dayanımı azaltma eğilimindedir. CAD/CAM blokları için kullanılan endüstriyel prosesler, doldurucu içeriğinin artırılmasına izin verirler.

Günümüzde çok sayıda CAD/CAM sistemi mevcuttur (31). İntraoral tarayıcılar, daha gerçekçi sanal tasarım / yazılım yüzeyleleriyle önemli ölçüde daha iyi, daha hızlı ve daha küçük hale gelmiştir. Frezeleme veya 3 boyutlu baskı olanakları gibi hızlı prototipleme ile ekran tasarımı ve bilgisayar destekli üretimi içeren bu sanal ortam, çeşitli restorasyonların herhangi bir fiziksel model olmadan üretilmesine olanak sağlar. Geleneksel tekniğe göre dijital olarak üretilen restorasyonların, hasta tercihi olmaları yanısıra, restorasyonların mükemmel marjinal uyumları önemli avantajları olarak gösterilebilir (32, 33). Homojen endüstriyel kalıplar ve blokların uygulanması nedeniyle, imalat ve klinik uygulama sırasında hataların görülme sıklığı azalmıştır (34).

İndirekt restorasyonların CAD/CAM ile üretiminde, cam seramikler/seramikler ve rezin kompozitler olmak üzere iki tip materyal mevcuttur (Şekil-1). Seramikler iyonik ve/veya kovalent bağlarla bağlanmış metalik ve metalik olmayan elementler içeren kristalimsi materyaller olarak tanımlanırken, camlar ise amorf yapılardır (35). Cam seramikler, camsı faz'ın matris görevini, seramiğin ise takviye doldurucu olarak işlev gördüğü kompozit tip materyallerdir (36). Rezin kompozitler, inorganik (seramik veya cam-seramik veya camlar), organik veya bunların bileşimlerinin doldurucular ile takviye edilmesiyle meydana gelen polimerik bir matristen oluşan materyallerdir (37).



Şekil-1; Güncel seramik materyallerin sınıflandırılması

2.3. CAD/CAM rezin esaslı sistemler

Rezin matris seramikler (RMS), kırılğan olmayan polimerlerin pozitif avantajlarını, üstün estetik sonuç veren seramiklerle bir araya getirerek yeni bir CAD/CAM seramik materyal grubunu oluşturur (5). Literatürde bu yeni materyal grubunun doğru sınıflandırılmasıyla ilgili devam eden tartışmalar olsa da, rezin matris sistemler pazarlama stratejileri nedeniyle “hibrit seramik” veya “nanoseramikler” olarak adlandırılmaktadır (38). Ancak, bu ticari isimler materyale özgü doğru kimyasal bileşimi yansıtmamaktadır. Mikro yapıları ve polimerizasyon modlarına bağlı olarak RMS’ler 2 gruba ayrılır;

1) yüksek sıcaklık ile polimerize, dağılmış doldurucu partiküller içeren ağırlıklı organik faz'a sahip olanlar

2) yüksek sıcaklık / yüksek basınç ile polimerize, ağırlıklı inorganik fazlı in filtre seramik ağ (PICN) materyaller (5, 38).

2.3.1. Dağılmış dolduruculu CAD/CAM bloklar

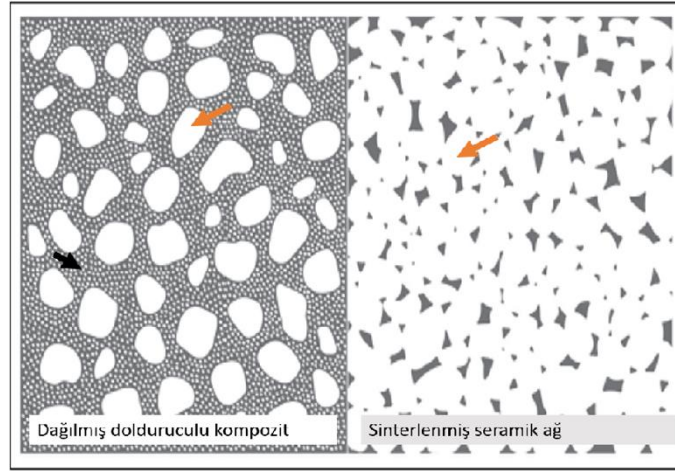
Piyasada pazarlanan ilk CAD/CAM bloğu, matris bileşimi aynı firmanın Z100 direkt kompozit ürünüyle benzer olan, Bis-GMA ve trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) içinde ağırlıkça %85 zirkonya-silika doldurucu içeren Paradigma MZ100 (3M ESPE, St. Paul, MN, ABD)'dür. Daha sonra aynı firma tarafından, ağırlıkça %79 oranında zirkonya-silisyum nano doldurucuya sahip (dağınık veya kümelenmiş tanecikler formunda) "Nanoseramik" Lava Ultimate tanıtılmıştır. Direkt kompozitler ile aynı dolduruculara sahip olmasına rağmen, asıl farklılık üretilen dimetakrilattan (UDMA) oluşan ve fotopolimerize edilmek yerine tamamen ısı ile polimerize olan matris dayanmaktadır. UDMA, Bis-GMA'dan daha yüksek çift bağ konsantrasyonuna sahip olduğundan, daha iyi dönüşüm, çapraz bağlanma ve ışıkla polimerizasyon reaktivitesi sergiler (39).

Materyal bilimindeki gelişmeler GC (GC Corporation, Tokyo, Japonya) ve Shofu (Shofu Inc., Kyoto, Japonya) firmalarının, sırasıyla Cerasmart ve Shofu Block HC' yi hibrit seramik materyal grubuna katmıştır. Bileşim veya doldurucu boyutu tam olarak aynı olmasa da bu yeni kompozit blokların tümü, HT polimerize olan UDMA esaslı bir matris ile dağılmış doldurucu içeren materyallerdir. Seramik ve PICN CAD/CAM bloklarla karşılaştırıldıklarında mekanik özellikler açısından aynı gruba dahil edilirler (40).

2.3.2. PICN materyaller

1980'lerde Vita firması, pazarlanan cam in filtre seramiklerden esinlenerek (In Ceram Sistem; Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Almanya), önceden sinterlenmiş cam-seramik iskelet yapının polimerize edilmiş bir monomer ile infiltrasyonu, yeni bir materyalin elde edilmesini sağlamıştır. PICN'ler, dağılmış doldurucu içeren kompozit materyallerden önemli ölçüde farklılık gösterir. Seramik ağ birbirine bağlı (dağınıkların aksine) parçacıklarla 3 boyutlu bir yapı oluşturarak, gerilimleri her

yönden daha etkili şekilde dağıtabilen ve parçalanmaya karşı direnci arttırabilen gerçek bir iskelet yapı oluşturur (41) (Sekil-2).



Şekil-2; Polimerin infiltre edilmiş seramik ağ (PICN) ve dağılmış dolduruculu kompozit polimerin (siyah ok ile işaretlenen alan) mikro yapısının şematik gösterimi. (Turuncu oklar seramik yapıyı göstermektedir.)

Vita Enamic, bir UDMA ve TEGDMA karışımı ile infiltre seramik ağ materyalidir. Seramiklerin hacim oranı yüksek olması sebebiyle “hibrit seramik” olarak tanımlanan ilk materyal olmuştur. PICN'ler ayrıca sıklıkla çift ağ materyaller, seramik bazlı iç içe geçen faz materyaller veya iç içe geçen faz seramik-rezin kompozitler olarak da adlandırılmaktadır (38).

2.4. Cam-seramik CAD/CAM bloklar

İlk CAD/CAM seramikler, ince grenli feldspat yapıda olup (VITA Mark II; VITA-Zahnfabrik) geleneksel feldspatik seramiklerden geliştirilmişlerdir. Bu feldspatik CAD/CAM seramiklerin mikro yapısal karakterizasyonu, sodyum potasyum alüminyum silikat ve potasyum sodyum alüminyum silikat'tan oluşan iki kristalizasyon modeliyle ilişkilidir. Materyal karakteristik olarak düşük dayanım gösterirken, Weibull modülü yüksektir (42).

2.4.1. Lösit güçlendirilmiş cam-seramikler

IPS Empress CAD (Ivoclar-Vivadent), feldspatik bir cam-seramik içine gömülü %40'a kadar lösit kristalleri içeren ilk nesil CAD/CAM bloklarından üretilmiş bir seramiktir.

Lösit kristallerinin çekirdeklenmesi ve kristalleşmesini sağlayan $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-K}_2\text{O-Na}_2\text{O}$ cam sistemidir (43). IPS Empress CAD, üreticiye göre 185 MPa'lık bir bükülme direnci sergilerken, 16.10'luk yüksek Weibull modülüne sahiptir (44).

2.4.2 Lityum disilikat seramikler (LDS)

Lityum disilikat kristalleri çökeltilen cam-seramik yapıların üretilmesiyle, önemli ölçüde daha yüksek dayanıklılık (kontrollü nükleasyon ve büyüme) elde edilmiştir (45). İki başarılı prekürsör sistem dışında (Empress 2 ve IPS e.max Press; Ivoclar-Vivadent), $\text{SiO}_2\text{-Li}_2\text{OK}_2\text{O-ZnO-P}_2\text{O}_5\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$ sisteminden katı hal reaksiyonu yoluyla (45) lityum disilikat cam seramik IPS e.max CAD (Ivoclar-Vivadent) tasarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, LDS cam seramiklerin diğer cam seramiklere göre yaklaşık 3- 4 kat daha yüksek karakteristik dayanıklılık ve yüksek Weibull modülüne (44) sahip olduğu bulunmuştur. Yeterli translüsenesi ve renk çeşitliliği, bu materyallerin monolitik restorasyonlarda kor olarak veya apatit içeren veneer seramiklerle birlikte kullanılabilirliğini mümkün kılmıştır (46).

2.4.3. Lityum silikat / fosfat cam-seramikler

2013 yılında, zirkonya takviyeli lityum silikat cam-seramik (VITA Suprinity, VITA Zahnfabrik; Celtra, Celtra Duo, Dentsply-Sirona) olarak da adlandırılan yeni bir grup lityum silikat / fosfat (LSP) CAD/CAM materyal tanıtılmıştır.

2.5.Oksit seramik zirkonya seramikler

1990'ların başında, CAD/CAM teknolojisi zirkonyayı diş hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılabilir hale getirdi. Yoğun monokristal homojenlik ile karakterize edilen materyal düşük ısı iletkenliğine, düşük korozyon potansiyeline ve iyi radyoopasiteye sahiptir. “Dönüşüm sertleşmesi” denilen bir fenomen nedeniyle, zirkonya, eşsiz bükülme dayanımı değerleri (900 ila 1.200 MPa) ve yüksek kırılma dayanıklılığı ortaya koymaktadır (47). Yapılan çalışmalarda, çok yüksek karakteristik dayanıklılık ve yüksek Weibull modülü değerlerini doğrulamıştır (44).

2.4. Ağız-diş sağlığında oral mikrobiyata'nın rolü

Genetik ve çevresel faktörler oral mikrobiyatada değişikliklerden sorumludur, ancak biyofilm mikroorganizmaları ve konakçı arasındaki denge sayesinde, oral

mikrobiyatada homeostaz korunur. Bununla birlikte, bir risk faktörü olduğunda parazitik ilişki hüküm sürmeye başlar ve patojenik-karyojenik mikroorganizmaların aktivitelerinin artması sonucu hastalık gelişir.

Her bireyin oral mikrobiyatası, bağışıklık sistemi kadar benzersizdir. Bu nedenle, hastalıklara karşı alınan yaygın önlemler tüm bireyler için aynı etkinlikte olmayıp, her bireyin bağışıklık sisteminin belirlediği kendi risk potansiyeli vardır.

2.4.1. Mikrobiyata ve biyofilm

Dental plak, biyofilm olarak tanımlanan bakterilerin oluşturduğu öncü yapılardan biridir (48, 49). İnsan ağız boşluğundan 700'den fazla bakteri türü izole edilmiştir ve bunların çoğu dental biyofilm ile ilişkilidir. Uzun yıllar süren araştırmalar, biyofilmin diş yüzeyinde sabit bir matriks içinde yer alan ve hücre dışı polisakaritler (EPS) ile çevrili, özelleşmiş, koordineli, çoklu mikroorganizma yaşam biçimi olduğunu göstermiştir. Bu yapı çevresel olarak dağılmış mikro kolonilerin, özellikle birbiriyle etkileşerek bir topluluk oluşturabilen mevcut bakteri popülasyonlarının, katmanlı büyümesiyle meydana gelir. Biyofilm'lerde organize olan mikroorganizmalar antimikrobiyallere karşı daha az duyarlı olup, immünolojik savunma sistemlerine karşı daha dirençlidir (50, 51).

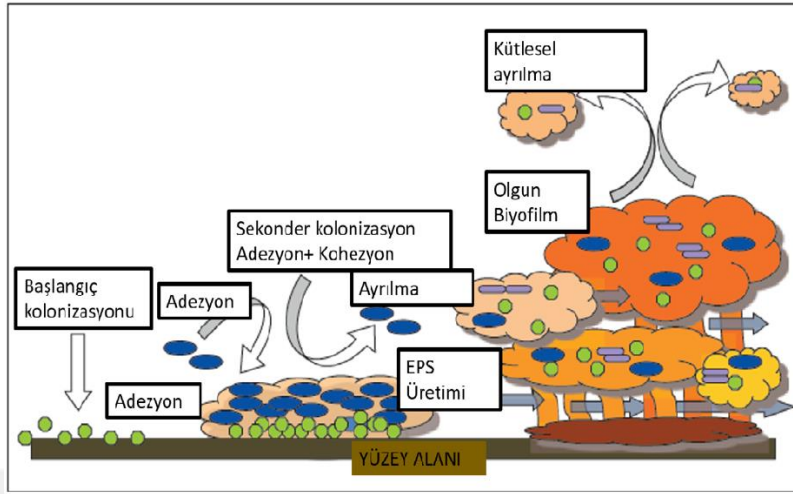
2.4.2. Biyofilm oluşumu

Ağız boşluğundaki mikroorganizmalar, diş yüzeyinde bakteri florasının bileşiminde önemli derecede farklılık göstererek, supra-gingival ve sub-gingival olarak iki tür biyofilm oluştururlar. Supragingival plak'ta, Streptococcus (S) mutans, S. salivarius, S. mitis ve Lactobacillus gibi Gram pozitif bakterilerin varlığı göze çarparken, subgingival plak içerisinde Actinobacillus, Campylobacter spp., Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis gibi Gram-negatif anaerobik bakteriler baskın türlerdir (52, 53). Diş çürüğünden genellikle supragingival mikrobiyata sorumluyken, subgingival mikrobiyata, periodontal hastalıklar ile ilişkilidir (54). Biyofilm oluşumu ve gelişimi üç temel aşamayla gerçekleşir:

1- biyofilm kütlelerinde artışa yol açan öncü türlerin kolonizasyonu

2- diğer mikroorganizma türlerinin adezyonu ve agregasyonu

3- EPS üretimi ve bakterilerin biyofilm yüzeyinden ayrılarak ağız boşluğunda yayılımı (55, 56) (Şekil-3).



Şekil-3; Biyofilm oluşumunun aşamaları

Pelikül oluşumu

Mikroorganizmalar, herhangi bir dış bileşenden yoksun bırakılmış diş yüzeylerini kolonize edemediklerinden, tükürük ile oluşan pelikül'ün varlığı adezyonun gerçekleşmesi için gereklidir.

Pelikül, diş yüzeyinde fırçalama veya profesyonel temizleme işlemlerinin hemen ardından, yüzeye adsorbe edilen dişeti sıvısından ve tükürükten gelen proteinlerden oluşur. Dişeti oluşu sıvısı, birçok bakteri için reseptör kaynağı olarak görev yapan prolin, tirozin, histidin bakımından zengin proteinler ve aglütininler gibi konakçı türevli moleküller dışında, müsin ve diğer glikoproteinlerden oluşur.

Kolonizasyon

Diş yüzeyinde bakteriyel adezyonun ilk aşaması, mikroorganizmanın yüzey komponentleri ile pelikülda bulunan tükürük bileşenlerinin etkileşimiyle başlar. Tutunan bakteri hücreleri büyüdükçe ve bölündükçe, biyofilm fenotipini ifade ederek, polipeptitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi hücre dışı polimerik maddeleri salgılayacak bir EPS oluşturur (52, 57).

Biyofilm oluşumunun spesifik olmayan ilk safhasında, onu oluşturan bakterilerin adezyonu elektrostatik, hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri aracılığıyla zayıf

şekilde meydana gelir (56, 58). Bu ilk adezyon aşaması sonrası, bakteri yüzeyindeki adezinler ve pelikül'de bulunan prolin bakımından zengin glikoproteinler (PRP'ler) arasında spesifik reaksiyonlar sayesinde biyofilm stabil hale gelir.

Biyofilm içerisinde streptococcus ve actinomyces gibi farklı tür bakterilerin hızlı çoğalması, yeni bakteri türlerinin yerleşik organizmalarla etkileşimini sağlayan ve toplanmalarına yol açan bir sonuçtur. Biyofilm oluşumlarının %60-90'ında, erken koloni türleri arasında Streptococcus, Eikenella, Actinomyces, Haemophilus, Prevotella, Capnocytophaga, Priopionibacterium ve Veillonella tanımlanmıştır. Geç kolonize olanlarda ise Fusobacterium nucleatum, Actinobacillus, Prevotella, Eubacterium, Treponema ve Porphyromonas türleri sayılabilir (53, 57).

EPS oluşumu

Biyofilm oluşumundaki temel rol, hücre dışı polisakkaritlere atfedilirken, bakteri kapsülünü oluşturan veya mukus'un bir parçası haline gelerek çevreye salgılanan mannoz ve glikosidin kalıntıları, diğer faktörler arasında sayılabilir. EPS bileşimi, bakteri suşuna ve çevresel koşullara bağlı olarak değişir. EPS'ler, proteinler ve hücre dışı DNA'dan oluşur. Biyofilm matrisi, temel olarak hücre dışı disakkaritlerin yaratılması dışında, daha çok tükürük glikoproteinlerinin çökeltilmesiyle arttırılır. Plak oluşumunda ve bakteri adezyonunda, özellikle glukoz ve fruktan gibi çözünebilir polisakkaritler ve mutan gibi çözünmeyen polimerler önemli rol alır (52, 59).

Karyojenik streptococcus, α -glikozidazları içeren enzimatik reaksiyonlarda hücre dışı polimerler oluşturur. Örneğin, S. mutanslar iki glikozidaz üretir; ilki mutan olarak da bilinen ve α -1,3 glukoz bağ içeren glukoz olup, diğeri ise α -1,6 karakteristik bağ içeren dekstran olarak bilinen çözünen glukozdur. Dekstran, yiyeceklerde sakkarit azlığı durumunda metabolizmayı arttırmak için bir substrat görevi görür. Adeziv mutan, plak kütlelerinin artışında rol oynayarak, karyojenik mikroorganizmaların adezyonunu arttırır. β -fruktozidaz aracılığıyla, fruktozdan, fruktan veya levan denilen polimerler elde edilir. Fruktan, dekstran gibi hücre dışı bir metabolik substrat oluşturur. S. mutans, nadiren çözünen bir fruktan olan inülin'i üretir (60, 61).

Hücre dışı polisakkaritler, aynı zamanda, S. sanguis ve A. viscosus gibi ağız boşluğundaki diğer bakteriler tarafından da üretilir, ancak en büyük pay S. mutans'lara aittir. Bu önemli rolün yanı sıra EPS'nin diğer önemli fonksiyonlarından biri de bu

mikroorganizmaların konakçı savunma sistemine karşı korunmasıdır. Bu özellikle karyojenik mikroorganizmaların patojenik doğası için anlamlıdır. Polisakkaritlerden oluşan dış katmanın hidrofilik özelliği, bakterileri fagositozdan etkili şekilde korur (62).

2.4.3. Biyofilmin olgunlaşması

Adezyon aşamasından sonra, biyofilm yapısının inşa süreci, mikrobiyal çoğalma ve farklılaşma ile başlar (63, 64). Bakterilerin yüzeye veya birbirlerine tutunmalarının hemen ardından biyofilmin olgunlaşmasıyla, çevresel koşullara bağlı olarak belirli genlerin aktivitesindeki değişikliklerle ilişkilendirilen spesifik gen ekspresyonunun aktivasyonu veya inhibisyonu meydana gelir. Gen ekspresyonundaki değişiklikler, ilgili fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar. Örneğin, sınırlı oksijene erişim gibi çevresel değişikliklerden dolayı hücrelerin metabolik aktivitesi değişerek anaerobik metabolik glikoliz yollarının aktivasyonu artar, bunun sonucunda bazı enzimlerin sentezi inhibe olur (65, 66).

2.4.4. Quorum sensing (QS)

Biyofilmdeki mikroorganizmalar, oldukça farklılaşmış karmaşık yapılardan meydana gelen bakteriyel mikro kolonilerden oluşur. EPS tabakası ile kaplı olgun biyofilm, sayısız sıvı dolu kanallardan ibaret birbirinden ayrı, eşsiz bir iletişim sistemine sahip mikro kolonilerden oluşur. Kanallardaki sıvı dolaşımı mikro koloniler arasından geçerek besin, oksijen, enzim, metabolit ve sinyal moleküllerini ileterek, atık ürünleri uzaklaştırmasının yanında (67, 68), mikroorganizmaları antibiyotiklerden, antikorlardan, bakteriyofaj ve lökositler gibi dış etkenlere karşı koruma görevini üstlenir. Bakterilerin birbirine olan yakınlık derecesi, genetik bilgi alışverişini teşvik ederek, antimikrobiyal ajanlara ve antibiyotiklere karşı direnç kazanılmasını kodlayan plazmidlerin transferini kolayca sağlar (50, 66).

Biyolojik etkileşimler toplulukların yapılandırılmasında rol oynamaktadır. Bu etkileşimler, kendi içinde, mikrobiyata ve konakçı arasında ya da mikrobiyata ile dış etkenler arasında meydana gelebilir (60, 69).

Bakteriyel biyofilmin çok önemli bir özelliği olan iletişim ve metabolik süreçleri düzenleme yeteneği, planktonik hücrelerde olduğundan çok daha iyidir. QS sinyali,

hücre yoğunluğuna cevap olarak aktive edilen bir sinyal yolunu temsil eder. QS sistemlerinin uyarıcıları, otoindüktörler adı verilen sinyal molekülleridir. Bu moleküllerin konsantrasyon miktarı, mikrobiyal yoğunluğun bir fonksiyonu olup, belirli bir bölgedeki hücre popülasyonunun yoğunluğuna bağlıdır. Bakteriler, yoğun popülasyonlarda bir arada yaşama alışkanlıklarını düzenleyen karmaşık gen ekspresyon programlarına sahiptir. Örneğin, metabolik atık birikimini veya besinlerin tükenmesini önlemek için bakteriler, aktivitelerini düzenleyerek gerekli olan metabolizmalarını yavaşlatır (56, 70). Bakteriler, popülasyonun fizyolojik ve metabolik süreçlerinin spesifik büyümesine ve kontrolüne olanak tanıyan sinyallerin kimyasal yapısını ve ortamdaki eşik konsantrasyonlarını, doğru şekilde tanımlayabilirler. Örneğin streptokoklar, çevresel stres faktörlerinin zararlı etkileriyle başa çıkmanın ve konakçı bağışıklık sisteminden kaçınmanın çeşitli yollarını geliştirmiştir.

Mikrobiyal biyofilm oluşumu dinamik bir süreçtir. Adezyon, hacimde artış ve azalma, tekrar eden ve yenilenen bir işlem olduğundan, dental plak mikrobiyotası sürekli olarak yeniden düzenlenir. Bu doğal olarak oluşturulmuş biyofilm bakteri konsorsiyomu, dişlerin yüzeyinde 300-500 hücrelik bir kalınlığa ulaşabilir. Olgun biyofilm yüzeyinden zamanla diğer alanlara doğru transfer gerçekeşerek, diş yüzeylerinde, dişeti sulkusunda biyofilm oluşturabilen veya planktonik forma dönüşebilen hücre toplulukları serbest bırakabilir. Bu sayede biyofilm, vücut sıvılarına ve çevreye devamlı bir bakteri kaynağını oluşturur (71).

2.5. Bakteriyel adezyonda etkili non-spesifik biyokimyasal mekanizmalar ve fizikokimyasal etkileşimler

Mikroorganizmalar ve substratum yüzeyleri, içinde organik madde bulunan (örneğin; süt, gözyaşı sıvısı, idrar, kan veya tükürük), sulu bir ortamda bulduklarında kısa zamanda (saniyeler içinde) adsorbe organik bir molekül tabaka ile kaplanırlar. Buna genel olarak “şartlandırma filmi” denir. Bu sayede moleküllerin bir substrata taşınması ve adsorpsiyonu, nispeten hızlı ilerler (72).

Pelikül olarak adlandırılan oral kavite içindeki şartlandırma filmi, glikoproteinler (müsinler), prolin ve histidin bakımından zengin proteinler, fosfoproteinler (örneğin; staterin), enzimler (örneğin; a-amilaz) ve diğer molekülleri içeren sayısız bileşenden

meydana gelerek, adezyonu sağlayan reseptör işlevi görür. Böylece bakteriyel adezyon, pelikül kaplı bir bakteri ve pelikül kaplı bir yüzey arasında meydana gelir (72).

Pelikül oluşumunda elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik kuvvetler rol oynayan mekanizmalar arasında bulunmaktadır. Pelikülün bileşimi, yoğunluğu ve/veya konfigürasyonu, fizikokimyasal yüzey özellikleri dahil, büyük ölçüde altta yatan sert yüzeyin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlıdır. Yapılan çalışmalar mine yüzeyinde erken (2 saat) pelikül formasyonunda görülen amino asit kompozisyonunun, tükürüktekinden farklı olduğunu ortaya koymuş, ilaveten, pelikülün çevresel makro moleküllerin seçici adsorpsiyonu ile oluştuğunu göstermiştir. Katı yüzeylerde bakteri adezyonunda rol oynayan fizikokimyasal mekanizmalar için halen tatmin edici bir açıklama öne sürülmemiştir (73, 74). Bakteriyel adezyonu oluşturan dört aşama (Şekil 4) tarif edilmiştir (72).

Faz 1: Yüzeğe taşınma

Bir bakterinin yüzeğe taşınması, çözelti içindeki bakterinin çökeltmesiyle, sıvı akışıyla, Brownian hareketi (ortalama 40 mm / saat yer değiştirme) veya aktif bakteri hareketi ile (kemotaktik aktivite) gerçekleşebilir. Alternatif olarak, süspansiyon içindeki mikroorganizmalar, mikrobiyal agregalardan birbirlerine doğru taşınabilir.

Faz 2: Primer adezyon

Bu aşama, uzun ve kısa süreli kuvvetler aracılığıyla, yüzeğe etkileşimi sayesinde belirli bir mesafede (50 nm) bakterinin zayıf ve geri dönüşümlü şekilde adezyonunu sağlar. Farklı spesifik olmayan etkileşim kuvvetlerinin sonuçlarına bağlı olarak, organizmalar yüzey tarafından çekilecek veya uzaklaştırılacaktır. Mikrobiyal adeziv etkileşimleri tanımlamak için: Termodinamik ve Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO) olarak bilinen iki fizikokimyasal yaklaşım mevcuttur.

a. Termodinamik yaklaşım, yüzeylerin elektrostatik etkileşimlerinde açık bir rol oynamayıp daha çok bu yüzeylerin serbest yüzey enerjilerine (SYE)'ine dayanmaktadır. Bakteri bir yüzeyle doğrudan temas etmeden önce, yüzeyler arasındaki su filmi uzaklaştırılmalıdır. Bağlanma, Gibbs enerjisindeki değişim formülü ile tarif edilmiştir

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (75).$$

Bakteriler için ara adezyon serbest enerjisi (ΔG_{adh}), yüzey- bakteri ara yüzey serbest enerjisi (γ_{sb}), yüzey-sıvı ara yüz serbest enerjisi (γ_{sl}) ve bakteri-sıvı ara yüzey enerjisi (γ_{bl}) ile ilişkilendirilir. Negatif ΔG_{adh} durumunda, (doğa serbest enerjisi en aza indirmeye meyillidir), adezyon termodinamik olarak gerçekleşir ve kendiliğinden ilerler.

b. Klasik DLVO yaklaşımı; yüzey ve bakteri arasındaki etkileşim enerjilerini açıklar. Bakteri bir yüzeye yaklaştığında, iki kuvvet aracılığıyla etkileşime girer: Lifshitz-van der Waals çekim kuvvetleri (G_A : 50 nm'nin üzerindeki mesafelerde aktif olan ilk kuvvet) ve elektrostatik kuvvetler (G_E : daha yakın mesafeden mevcuttur). Elektriksel kuvvetler sıvı içerisinde meydana gelerek, bakteri ve yüzeyin (elektriksel) negatif yükünü nötralize etmek için partiküllerin içinde dağılmış zıt yüklü katmanda meydana gelirler (elektriksel çift katman veya Stern katman, Şekil- 4).

Bu çift katman yüzeyi kapladığında (ince tabaka kaplama tüm yüzeylere negatif bir yük getirir), elektrostatik bir etkileşim gerçekleşir. Her iki yüzey aynı yüke sahip olduğundan, bu elektrostatik etkileşim doğada iticidir. Bu etkileşimin görüldüğü mesafe, yüzeyin iyonik yüküne ve süspansiyonun iyonik konsantrasyonuna bağlı olan çift katmanların kalınlığıyla ilişkilidir.

DLVO, 1 nm'lik ayırma mesafesinin üzerinde, yukarıda belirtilen iki kuvvetin toplamının bakteri ve yüzey arasındaki toplam etkileşimi açıkladığını ileri sürmüştür. Şekil 6'da total etkileşim enerjisini, yukarıda belirtilen kuvvetlerin $G_{TOT} = G_A + G_E$ toplamı (Gibbs enerjisi olarak da bilinir) ve bakteri ve yüzey arasındaki mesafeyi gösterir. Çoğu bakteri için G_{TOT} , bir sekonder minimum: (geri dönüşümlü bir bağlanma gerçekleşir: yüzeyden 5–20 nm), bir pozitif maksimum (bağlanmaya karşı bir B enerji bariyeri) ve geri dönüşümsüz bir bağlanmanın kurulduğu dik bir primer minimum'dan oluşur (yüzeyden yaklaşık 2 nm uzaklık'ta). Ağızdaki bakteriler için sekonder minimum sıklıkla büyük negatif değerlere ulaşmaz (76), bu durum 'zayıf' ve geri dönüşümlü adezyon anlamına gelir (bakterinin Brownian hareketi göstermeye devam ettiği bir yüzeye çökme olarak tanımlanır ve zayıf kesme kuvvetleri veya bakteri kendi hareketliliğiyle yüzeyden kolayca çıkarılabilir).

Her iki yaklaşım, belirli bakteri suş'u ve türleri göz önüne alındığında, mikrobiyal adezyonun açıklanmasında belirli kanıtlara dayandırılmıştır. Ancak bugüne kadar, her

bir tür için geçerli olan genel bir tanımlama verilememiştir (77). Van Oss ve ark., bu sebeple genişletilmiş DLVO teorisini tanıtmışlardır (78). Bu teori dört temel, kovalent olmayan etkileşimi göz önünde bulundurur, bunlar: Lifshitz-van der Waals, elektrostatik, Lewis asit-baz ve Brownian hareketi kuvvetleridir.

Asit-baz etkileşimleri, sulu çözeltilerde polar kısımlar arasındaki elektron alan ve veren etkileşimlere dayanır. Polar veya asit-baz ara yüzey serbest enerjilerinin dengesi (ΔG_{adh}^{AB}), çürük oluşumundaki dengeyle özdeşleştirilerek genişletilmiş DLVO yaklaşımına dahil edilir. Asit-baz etkileşimlerinin etkisi, elektrostatik ve Lifshitz-van der Waals etkileşimlerine kıyasla çok büyüktür.

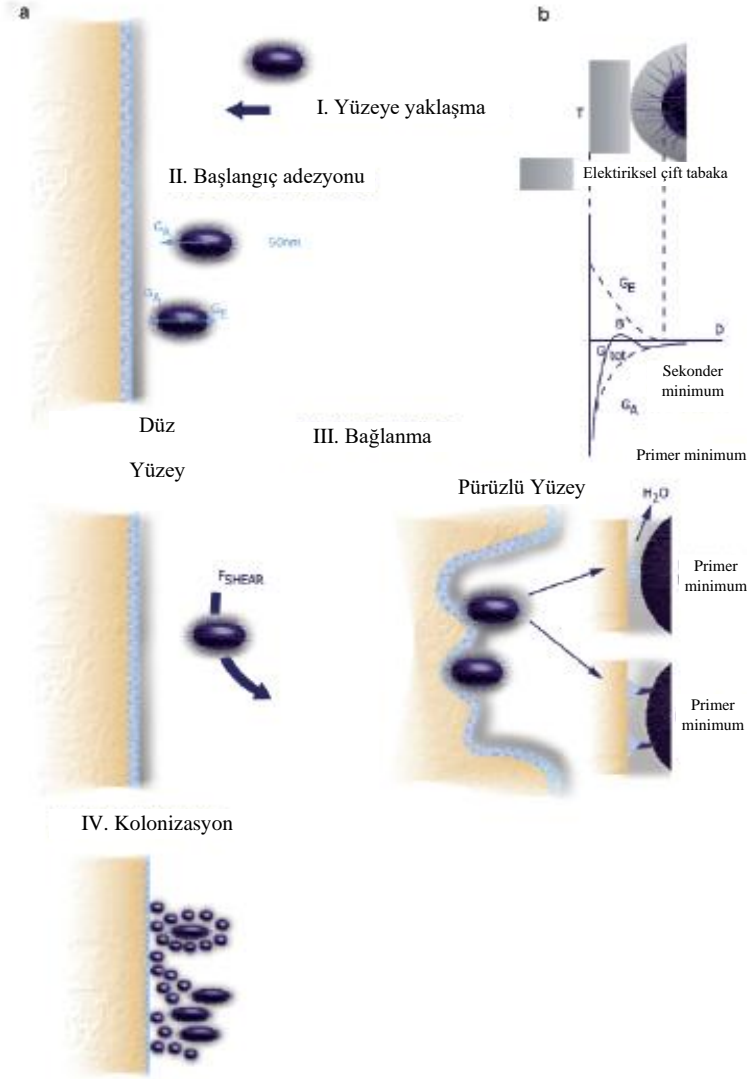
Bununla birlikte, asit-baz etkileşimleri nispeten kısa aralıklıdır ve etkileşimli yüzeyler (5 nm'den az) arasında hareket edebilmek için yüzeyler arasında yakın bir mesafe gereklidir. Bu yeni konsept, çeşitli in vitro deneylerde bakteriyel adezyonun öngörülmesinde çok faydalı olmuştur (79).

Faz 3: Bağlanma

Bakteri ile yüzey arasında doğrudan veya yardımcı unsurlar (fimbria) ile temas kurulduktan sonra, bakteri ve yüzey arasında sıkı bir bağlantı, belirli etkileşimlerle (kovalent, iyonik veya hidrojen bağı) oluşturulabilir. Adezyondan sonra, organizmaların çoğu jel kıvamında (glikokaliks) bir salgı salgılayarak, kendilerini bu tabakaya gömerler. Glikokaliks, immün savunma hücrelerine karşı koruma sağlarken önemli bir virülans faktörü oluşturur.

Faz 4: Kolonizasyon / plak olgunlaşması

Sıkıca tutunmuş mikroorganizmalar büyümeye başladığında ve yeni oluşan hücreler bağlı kaldığında, biyofilmler gelişebilir. Sapsız mikroorganizmaların büyüme hızının kısmen söz konusu biyomateryale bağlı olduğu bulunmuştur (80). Bu aşamada, QS dahil diğer işlemler ek bir rol oynamaya başlar. Pürüzlü bir yüzeyde, bakteriler makaslama kuvvetlerine karşı daha iyi korunurlar, böylece geri dönüşümlüden geri dönüşümsüz adezyona kadar değişiklikler daha kolay ve daha sık meydana gelir. Etkileşen yüzeyler arasındaki su filmi, kısa mesafeli kuvvetler (doğrudan temas veya köprüleme) devreye girmeden önce çıkarılması gerektiğinde, SYE substratı önem kazanır.



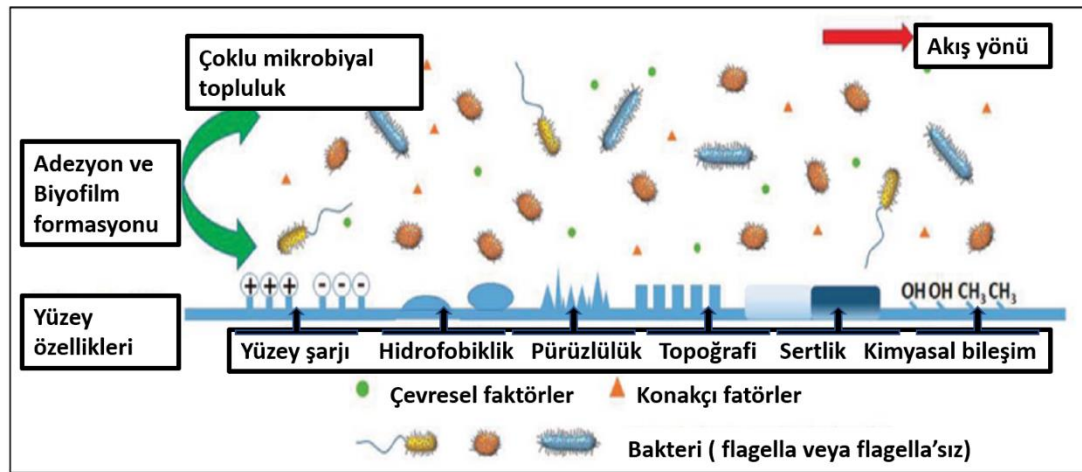
Şekil-4, (a) Dinamik plak oluşum sürecinin dört aşamalı şematik gösterimi: (I) bakterinin yüzeye rastgele taşınması, (II) sekonder minimumdaki başlangıç adezyonu (çoğu zaman büyük negatif değerlere ulaşmaz, geri dönüşümlüdür) veya direkt olarak primer minimumdaki van der Waals çekici kuvveti (G_A) ve elektrostatik itme kuvvetleri (G_E) sonucu irreversible bağlanma, (III) belirli etkileşimler ile bakterinin yüzeye bağlanması (IV) yüzeyin kolonizasyonu ve biyolojik oluşum (öncelikle hücre bölünmesi ve bakteriyel içi ve / veya interjenerik koagregasyon). (b) Negatif yüklü bir bakteri ile negatif yüklü bir yüzey arasında Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO) teorisine göre uzun süreli etkileşim. Etkileşimin Gibbs enerjisi (G_{TOT}), mesafe (D) ile ilişkili olarak, van der Waals kuvveti (G_A) ve elektrostatik etkileşimin (G_E) toplamı olarak hesaplanır. Elektrostatik etkileşimler, elektriksel çift katmanlar

birbiriyle üst üste geldiğinde başlar (şeklin üst kısmına T: katı yüzey (örneğin diş) ve C: bakteri hücresi)

2.6 Bakteriyel adezyonda adherentin yüzey özelliklerinin etkisi

2.6.1. Yüzey şarjı

Bakteri ve yüzey arasında bağlanma gücü belirlenirken yüzey şarjı'nın önemli bir rol oynadığı ve biyofilm oluşumunu etkilediği bilinmektedir (Şekil-5). Çoğu bakteri hücresi negatif yüklü olduğundan, genel olarak pozitif yüklü bir yüzey bakteri adezyonuna daha yatkındır, negatif yüklü yüzey ise bakteri adezyonuna karşı daha dirençlidir.



Şekil-5; Bakteri adezyonunda etkili yüzey parametreleri şematik olarak gösterilmiştir.

Prensip olarak, bakteriyel adezyonun yüzey yüküyle kontrol edilmesi statik sistemlerde çalışmayabilir, çünkü ölü hücreler yüzey yükü üzerinde değişikliğine yol açarak diğer bakteri hücrelerinin adezyonunu kolaylaştıran bir bariyer oluştururlar. Bununla birlikte, ölü hücreleri uzaklaştıran kesme kuvvetleri (çalkalama ve fırçalama) kolayca uygulanabildiğinden, bu strateji oral ortamlarda etkili olmayabilir. Bazı çevresel faktörler başka komplikasyonları ortaya çıkabilir, örneğin; tükürük pelikülü Ca^{+2} iyonlarını yüzeye doğru çekerek yüzeyin negatif yüklenmesine neden olur, bu durum *S. mutans* ve *F. nucleatum* 'un titanyum yüzeylerine adezyonunu kolaylaştırır (81). Buna ilaveten, dental materyallerin fiziksel ve kimyasal doğası, pelikül'ün kompozisyonunu (yoğunluğu ve konfigürasyonu gibi) ve fizyokimyasal özelliklerini etkileyebildiği öngörülmektedir (72).

2.6.2. Yüzey pürüzlülüğü ve yüzey topoğrafyası

Yüzey özellikleri arasında yüzey pürüzlülüğü ve yüzey topoğrafyası, biyofilm araştırmalarının temel konularından olmuştur. Genel olarak, yüzey pürüzlülüğündeki bir artış, materyal ile bakteri hücreleri arasındaki temas alanını arttırarak (82), kesme kuvvetlerinden korunma sağlar ve bakteriyel adezyonu teşvik eder (72).

Bu nedenle, pürüzsüz yüzeyler biyofilm oluşumunu azaltabilir (83) ve 0.2 µm'lik Rautment (Ra) pürüzlülük değeri, yüzeylerindeki bakteriyel adezyonu maksimum azaltan eşik değer olarak rapor edilmiştir (84). Bununla birlikte, yüzey pürüzlülüğünün bakteri adezyonu ve biyofilm oluşumu üzerindeki kesin etkileri, bakteri hücrelerinin boyutuna, şekline ve diğer çevresel faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, tüm bakteri türlerinin adezyonunu baskılayabilecek optimum pürüzlülük değeri yoktur (85). Örneğin, Xing ve ark., TiZr implant abutment üzerinde mikrobiyal adezyonun, nanopürüzlülük (<214 nm) ile pozitif korelasyon sergilediğini bildirmiştir (86). Buna karşılık, seramik yüzeylerin pürüzlülüğünün 0,2'den 2 µm'ye yükselmesi, *S. mutans*'ların biyofilm oluşumunu kolaylaştırmamıştır (87). Bu sonuçlardaki fark, farklı materyal kompozisyonları, pürüzlülük seviyeleri, bakteri suşları ve testlerde kullanılan kültür koşullarından kaynaklanabilir.

Ağızdaki tüm yüzeylerin tükürük pelikülüyle kaplı olduğu, bu durumun nanotopoğrafıyı değiştirebildiği ve dolayısıyla yüzey pürüzlülüğünü de etkilediğini not etmek önemlidir (88). Ayrıca, pelikül'da bulunan bakteriyel enzimler, sükröz varlığında in situ exopolisakaritler üretebilir. Glukanlar'ın varlığı, *S. mutans* gibi virulent türler için spesifik bağlanma alanları oluşturarak, yüzey topoğrafyasında değişiklik yapabilirler (89). Bu nedenle, biyofilm oluşumunu kontrol etmek için pürüzlülüğünün, ya tükürük etkilerini yenmesi ya da adsorbe edilen tükürük/mikrobiyal proteinlerin tipini, miktarını ve/veya konformasyonunu değiştirerek bakteriyel adezyonu dolaylı olarak etkilemesi gerekir.

Artan veriler mikrobiyal biyofilm oluşumunda, belirli alanlardaki ortalama ölçüme dayanan geleneksel pürüzlülük tanımının, o yüzeyin 3 boyutlu özelliklerini tam olarak yansıtamadığı, yükselti ve çöküntülerin dağılımının da önemli olduğunu göstermiştir (90, 91).

2.6.3. Serbest yüzey enerjisi (SYE)

Bakteriyel adezyonda hidrofobikliğin rolü birçok çalışmada gözden geçirilmiştir (92, 93). Genel olarak yüzeyin hidrofobikliğı düzenlenerek, bakteri adezyonu arttırılabilir veya inhibe edilebilir. Ağız ortamında, supragingival ve subgingival yüzeyler arasında bu eğilim farklı seyretmektedir. Supragingival alanlarda, hidrofobik yüzeylerde hidrofilik yüzeylere göre daha az biyofilm oluşurken, subgingival biyofilmler için böyle bir fark gözlenmemiştir. Bu fark, bakteriyel biyofilmleri hidrofobik yüzeylerden uzaklaştıran supragingival ortamdaki dalgalı kuvvetlerin varlığına bağlanmıştır (94). Yüzey hidrofobikliğı tercihi bakteri türleri arasında farklılık gösterir. Bakteriyel hücreler ve diş yüzeyleri üzerindeki tükürüğün varlığı, hidrofobikliğin bakteriler ve dental materyaller arasındaki etkileşimi büyük ölçüde belirleyebilir.

2.6.4. Yüzeyin kimyasal yapısı

Dental materyallerin kimyasal bileşimi bakteri adezyonu ve biyofilm oluşumu üzerinde önemli etkiye sahip olabileceğı düşünölmektedir (95). Örneğın, rezin kompozitlerde Bis-GMA ve UDMA gibi bazı rezin monomerlerin karyojenik bakterilerin glikoziltransferaz aktivitesini arttırdığı, etilen glikol dimetilakrilat (EGDMA) ve trietilen glikol dimetilakrilat (TEGDMA) gibi monomerlerin ise *S. sobrinus* ve *L. acidophilus* gibi karyojenik bakterilerin büyümesini teşvik ettiğı bilinmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal adezyonu belirleyen baskın faktörlerden birinin materyalin yüzeyindeki kimyasal içeriğın olduğu varsayılmaktadır (96).

2.6.5. Yüzey sertliğı

Materyal özellikleri arasında, sertliğın etkisi en az araştırılmış olan özelliklerden olup, literatürde az sayıda rapor bulunmaktadır. İlk olarak, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*'un 2.2 GPa'lık ve 1.2 GPa'lık Young modölüne sahip cam yüzeylerde oluşan adezyon gözlemine dayanarak yüzey sertliğının, bakteriyel adezyonu materyal bileşimindeki farklılığına rağmen etkilediğı sonucuna varılmıştır (97). Bu da biyofilm oluşumu sırasında bakterilerin materyal sertliğini algılayabildiğini ve bunlara yanıt verebildiğini düşündürmektedir.

2.7. Adherentin yüzey özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan test metod'ları

2.7.1. Pürüzlülük ölçümü

Yüzey pürüzlülüğü, biyofilm oluşumunu etkileyen yüzey özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir husustur. Bu parametreyi değerlendirmek için çeşitli teknikler kullanılabilir. Bu alandaki araştırmalar nitel değerlendirmeleri [atomik force mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM)] ve kantitatif yöntemleri (yüzey 2D ve 3D profil analizi) içermektedir. Yüzey pürüzlülüğü değerlendirmesi için çeşitli yöntemler mevcut olmasına rağmen, en yaygın kullanılan ve kabul edilen yöntem mekanik profilometridir. Genel olarak, Ra evrensel olarak kabul görmüş ve en çok kullanılan uluslararası pürüzlülük parametresi olup (98), profilin ortalama çizgiden sapmalarının aritmetik ortalamasını tanımlamaktadır (99).

Profilometre kullanılarak, test edilen örneğin yüzeyini doğrudan izleyen ve yüzey eğimine orantılı hareket ederek değişken voltaj çıkışı üreten bir hareketli uç aracılığıyla, yüzeyin kısmi profilinin anlaşılması hedeflenmektedir. Değerler genellikle, hareketli bir kola entegre elmas prob'un, test edilen numunelerin yüzeyini belirli hat boyunca dik şekilde taranmasıyla elde edilir. Elmas prob tipi profilometre yüzey pürüzlülüğünün ölçülmesinde yaygın yöntem olarak kabul edilmesine rağmen, elmas prob ucu doğrudan test edilen yüzeyi izlediğinden, inceleme altındaki nesneye zarar verebilme olasılığı yanı sıra, 2D profilometrede kullanılan elmas propun boyutu (geleneksel çap 4 - 20 µm), belirli mikro düzensizliklere nüfuz etmeyi zorlaştırarak, tam olarak yüzey özelliklerini temsil edemeyebileceği göz ardı edilmemelidir (98).

2.7.2. SEM-EDS

Enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi (EDS veya EDX) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), bir materyalin yüzey kimyasını değerlendirmek için kullanılan iki yöntemdir. EDS, bir örneğin kimyasal karakterizasyonunu belirlemek için SEM ile birlikte kullanılan kimyasal bir mikroanaliz tekniğidir. EDS tekniği, elektron bombardıman sırasında numuneden yayılan x ışınlarının hacim analizidir. SEM'den yayılan elektron ışınları numuneyi bombaladığında, elektronlar numune yüzeyindeki atomlardan çıkarılır. Böylece x ışını absorpsiyonu, elementin karakteristik x ışınlarına karşılık gelen x ışınlarının enerjisini, elektrik voltajlarına dönüştürür. Yayılan x

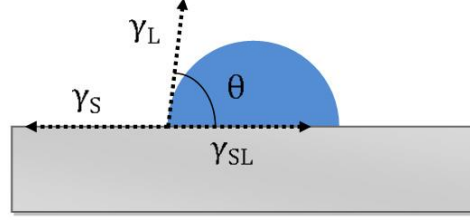
ışınlarının sayısı ve enerjisi, bir enerji dağıtıcı spektrometre ile ölçülerek hangi elemente ait oldukları belirlenir (98).

İkinci metodoloji olan XPS, bir materyalden yayılan karakteristik fotoelektronları ölçerek, yüzey bileşimi dışında kimyasal değerler de belirlenebilir. XPS tipik olarak foto elektronların numune yüzeyinden yayılmasına neden olan düşük enerjili, monokromatik bir röntgen kaynağına sahip numune yüzeyinin uyarılmasıyla gerçekleştirilir. Yayılan foto elektronların enerjisini ölçmek ve yüzey bileşimini temsil eden bir spektrum elde etmek için bir elektron enerji analizörü kullanılır. Her bir zirveye karşılık gelen enerji, numune hacminde bulunan bir elementin karakteristiği olup, pik değerinin altındaki alan, elementin nispi miktarının ölçüsü olarak ifade edilir. XPS, yalnızca yüzeye yakın üretilen elektronları tespit edebildiğinden, yüzeye duyarlı bir tekniktir. Bir XPS ölçümü için ortalama analiz derinliği yaklaşık 5 nm'dir. XPS değerlendirmesinin homojen olmayan yüzeylerin varlığından etkilenmesinin nedeni budur. Bu nedenle, önyargıdan kaçınmak için geniş alan değerlendirmelerinde daha faydalıdır. Yüzey kimyası değerlendirme tekniklerinin değişkenliği, yüzey'in kimyasal analizi için tek bir protokolün belirlenmesini zorlaştırmıştır. Ayrıca, bu metodolojiler, anti bakteriyel ajanların yüzey biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, daha çok anti bakteriyel özelliklere sahip materyallerin yüzey kimyasını analiz etmek için sıklıkla kullanılırlar (98).

2.7.3. Serbest yüzey enerjisi (SYE) ve kontak açısı ölçümü

SYE'nin katı yüzeylerde doğrudan ölçümü mümkün olmadığından, belirlenmesinde farklı teorik yaklaşımlara dayanan indirekt yöntemler kullanılır, ancak literatürde en güvenilir yöntemin hangisi olduğu konusunda tartışmalar mevcuttur. Genel olarak SYE'nin hesaplanması, Şekil 7'de gösterildiği gibi katı yüzey üzerinde biriken sıvıların temas açısının ölçümlerine dayanmaktadır; bu değer iyi bilinen Young denkleminde kullanılır (100):

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LCOS} \theta \quad (1)$$



Şekil-6; Young denklemindeki miktarları gösteren bir sıvı damlasının şeması

γ_L ve γ_S sırasıyla sıvı ve katı yüzeylerin SYE'sini temsil ederken, γ_{SL} katı-sıvı ara yüzey enerjisidir ve θ temas açısıdır. γ_{SL} ve γ_S 'yi hesaplamak için farklı teorik modeller vardır, bunlar (101): Zisman yöntemi, geometrik ortalama yöntemi, harmonik ortalama yöntemi, Lifshitz-van der Waals/Asit-Baz yöntemi ve hal denkleminde dayanan yöntemidir. Son dört yöntemde γ_{SL} 'nin değeri, γ_L , γ_S ve γ_{SL} arasındaki moleküler etkileşimlere bağlı olduğu tahmin edilirken, Zisman yöntemi, Young denklemini yerine kritik yüzey enerjisi kavramını kullanır. Geometrik Ortalama (GM) ve Harmonik Ortalama (HM) modellerinin yöntemleri, iki madde arasındaki moleküller etkileşimlerin iki ana bileşene sahip olduğu varsayımına dayanmaktadır.

Bununla birlikte, SYE'yi değerlendirmenin farklı yöntemler arasında, SYE'nin çeşitli bileşenlerini göz önünde bulunduran yöntemler hariç tek bir bileşeni değerlendiren ve bu parametreyi tek bir sayı ile tanımlayan daha basit yöntemler vardır. SYE'yi değerlendirmek için ilk yaklaşım 1964'te tanıtıldı (98). Bu yöntem tek bir bileşeni değerlendirerek ve yüzeyin temas açısının ölçülmesini sağlayarak, test edilen yüzeyin SYE'sinin, yüzeyi farklı sıvılarla tamamen ıslatabilecek en yüksek sıvı SYE'i ile aynı olduğu sonucuna varmaktadır. Bu kolay bir metodolojidir, ancak SYE'nin farklı bileşenlerinin değerlendirilmesine izin vermemektedir. İki bileşen teorisi arasında en çok kullanılanlardan biri, SYE'yi dağıtıcı ve kutupsal katkılara ayıran Owens & Wendt (102) yaklaşımıdır. Son olarak, van Oss (103) tarafından sunulan yaklaşım katı ve sıvı SYE'yi üç bileşende ayırır: dağıtıcı bileşen, asidik etkileşimlerden kaynaklanan yüzey enerjisi (σ^+) ve bazik (σ^-) etkileşimler. (σ^+) ve (σ^-) birlikte SYE'nin kutupsal bileşenini belirler. Bu teoriyi uygulamak için, ilki sadece dağıtıcı bileşeni olan, ikincisi dağıtıcı ve asidik veya bazik bileşenli ve üçüncüsü dağıtıcı ve bazik veya asidik bileşenli veya üç bileşene sahip en az üç sıvının kullanılması gereklidir. Pratikte, SYE genellikle temas açısının değerlendirilmesiyle aşağıdaki gibi gerçekleştirilir: test edilen yüzeye her bir sıvı için 10 damla damlatılarak sol ve sağ temas açılarının

ortalaması alınır. Bu analiz için farklı sıvılar kullanılabilir; örneğin, Carlén ve ark.(104), su, formamid ve diodometan kullanırken, Sipahi ve ark.(105), etilen glikol, formamid ve diodometan kullanmışlardır.

2.7.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM)

Mikrobiyal biyoagregalar ve biyofilmler, üç boyutlu hücrelerin ve hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) hidratlanmış halleridir. Arabirimlerle ve bunların örnekleriyle ilişkili mikrobiyal topluluklar doğal, teknik ve tıbbi habitatlardan gelebilir. Bu tür karmaşık mikrobiyal toplulukları görüntülemek için konfokal lazer tarama mikroskobu (KLTM) tercih edilen yöntemdir. KLTM, hidratlanmış, canlı ve aynı zamanda fikse numunelerin invaziv olmayan üç boyutlu kesitini sağlar. Bu amaç için, farklı çalışma mesafelerine ve çözünürlüklerine sahip çok çeşitli objektif lensler mevcuttur. KLTM vasıtasıyla tespit edilen sinyaller; oto-flüoresans, raportör genler / flüoresan proteinler, spesifik hedeflere bağlanan fluorokromlar veya fluorokromlarla konjüge edilmiş problardan kaynaklanabilir. Kaydedilen veri setleri sadece görselleştirme için değil, yarı niceliksel analiz için de kullanılabilir. Sonuç olarak KLTM, diğer analitik tekniklerle birlikte mikrobiyolojik örneklerin görüntülenmesi için çok kullanışlı bir aracı temsil eder (106).

KLTM 'de bir nesne optik olarak taranır diğer optik düzlemlerden bulanık bir sinyal alınmadan net görüntüler elde edilir. Tek bölümler veya çoğu durumda bölüm serileri, üç boyutlu yeniden yapılanmaya izin verecek şekilde iki boyutlu görüntüler olarak kaydedilir. Bu amaçla, numunenin belirli bileşikleri için spesifik olan flurokromlarla işaretlenmesi gerekir. Ek olarak, otomatik floresan ve yansıma sinyalleri kaydedilebilir. Modern çok kanallı cihazlarda, farklı emisyon sinyallerinin ayrılmasını sağlayan birkaç foto-çoğaltıcı bulunur. Son zamanlarda, artan hassasiyete sahip geliştirilmiş dedektörler önerilmiştir. Cihaz farklı dillerde, nokta tarayıcı (yüksek çözünürlük için) veya disk tarayıcı (hareketli neseler için) olarak mevcuttur. Ek olarak, hibrit sistemler ile her iki özellikten de ödün vermeden bu özellikler sunulmaktadır (107).

KLTM kurulumunun temel özelliği, fluorokromların uyarılması için mevcut olan lazer çizgileridir. Lazer seçenekleri arasında geleneksel gaz orijinli lazerler (örneğin, Ar, He / Ne), lazer diyotları, iki fotonlu lazerler ve daha yakın zamanda beyaz lazerleri içerir.

Olası dalga boyları ultraviyole (UV) ile kızılötesi (IR) arasındadır, ancak çoğu enstrüman yalnızca görünür lazerlerle donatılmıştır. Genellikle 488, 561 ve 633 nm'de üç lazer dalga boyu vardır. Bu üç çizgi çoğu örnek için uygundur ve popüler fluorokromların çoğunu kapsar. Bu, KLTM tekniği, örnek hazırlama, veri kaydı ve dijital görüntü analizi açısından daha fazla okumaya izin verecektir. KLTM'nin mikrobiyolojik örneklerde birden fazla parametrenin incelenmesi için mevcut olması, birçok laboratuvarında rutin bir araç olarak bu özel mikroskopi tekniğini oluşturmaktadır (107).

Günümüzde CAD/CAM uygulamalarına yönelik materyallerin araştırılması ve geliştirilmesi, en aktif araştırma alanlardan biridir. Ticari CAD/CAM rezin bloklar üzerindeki çalışmaların çoğu, CAD/CAM seramik materyallerle karşılaştırmak amacıyla yapılır. Bununla birlikte, literatürde bu materyallerin yüzey özellikleri ve bakteriyel adezyon ile ilişkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu güncel konular yapılan çalışmada ele alınarak, 4 rezin esaslı CAD/CAM blok ile 1 l0sıt güçlendirilmiş cam seramik CAD/CAM bloğun yüzey özellikleri yanında, biyofilm oluşumunda kritik rol oynadığı bilinen S. Mutans ile S. Mitis ile olan etkileşimlerinin araştırılması ve gelecekte materyal seçiminde ve önleyici prensiplerin geliştirilmesi konusunda referans olması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Akdeniz Ün. Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından, TDH-2017- 3003 no'lu projesi olarak desteklenmiştir.

3.1.Çalışmada kullanılan materyaller

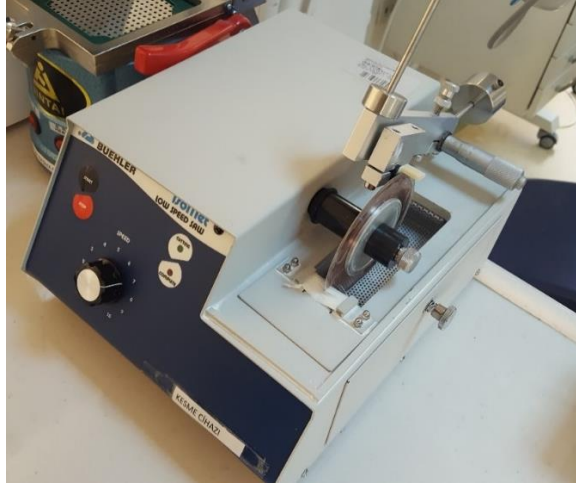
Çalışmada öncesinde birbirinden farklı olan 5 CAD/CAM materyali; IPS Empress CAD (IPS), VITA Enamic (VIT), Lava Ultimate (LAV), Shofu Blok HC (SHF) ve Cerasmart (CER) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan materyallerin bileşimleri ve içeriği Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu materyallerden, IPS lösit güçlendirilmiş cam seramik, VIT, LAV, SHF ve CER farklı dolduruculara sahip rezin esaslı hibrit seramik materyallerdir.

Tablo-1: Kullanılan materyaller ve içerikleri

Materyal adı	Polimerizasyon yöntemi	Matris bileşimi	Doldurucu içeriği
IPS Empress CAD (Ivoclar Vivadent, Lihtenştayn)	Yok	Cam seramik SiO ₂ -Al ₂ O ₃ - K ₂ O sistemi	Lösit takviyeli
Enamic (Vita Zahnfabrik, Almanya)	HT/HP	UDMA, TEGDMA	Cam seramik sinterlenmiş ağ (ağ. %86)
Lava Ultimate (3M ESPE, ABD)	HT	UDMA	Silika (20 nm), zirkonya (4- 11 nm), zirkonya-silika kümeleri (0.6-10 nm) (ağ. %79)
Shofu Blok HC (Shofu, Japonya)	HT	UDMA, TEGDMA	Silika bazlı cam, silika (ağ. %61)
Cerasmart (GC, ABD)	HT	UDMA, diğer DMA	Silika bazlı cam + silika (20nm ve 300 nm) (ağ %71)

3.2. Örneklerin hazırlanması

CAD/CAM bloklardan 10 mm x 10 mm x 1 mm boyutunda plak şeklinde numune elde etmek için, elmas disk (4" x 0.12" x ½" boyutunda Diamond Wafering Blade; Metkon, Türkiye) ve düşük hızlı hassas kesme cihazı (Isomet 2000 Precision Saw; Buehler Co, ABD) kullanılarak, su soğutması altında vertikal ve horizontal kesitler alındı (Resim 1).



Resim-1: Elmas disk ve düşük hızlı hassas kesme cihazın görünümü.

Her materyalden 10 adet bakteriyel adezyon, 2 adet hidrofobiklik, 2 adet serbest yüzey enerjisi ve 2 adet KLTM testi için toplam 80 adet numune hazırlanmıştır. Numunelerin kenar düzensizlikleri, bir elmas frez ve 600 grit zımpara kullanılarak giderildikten sonra, her bir numunenin boyutları dijital kumpas yardımıyla ölçülerek belirlenen standartlara uygun numuneler gruplandırıldı (n=10). Daha sonra numuneler her bir bakteri için iki alt gruba ayrılarak tek tek numaralandırıldı (n=5). Daha sonra tüm numuneler 5 dk ultrasonik temizleme cihazında temizlenerek kurutuldu.

Polisaj işlemi öncesinde her bir numunenin polisaj yapılmayacak yüzeyi işaretlenerek belirlendi (Resim 2).



Resim-2: Dijital kumpas yardımıyla boyutları ölçülerek seçilen standart numuneler

3.3. Örneklerin polisaj işlemleri ve uygulama aşamaları

Her bir numune düz metal bir tablaya çift taraflı yapışkan bant ile sabitlenerek, açıkta kalan yüzeyler, sırasıyla kalın grenliden inceye doğru dairesel tek yönde kuru şekilde, her disk için 60 s'den toplam 240 s olmak üzere Sof-Lex extra ince disklerle (3M ESPE, St. Paul, ABD) polisajlandı (Resim 3).



Resim-3: Sof-Lex ekstra ince polisaj kit'inin görünümü (3M ESPE, St. Paul, ABD)

Çalışma süresince kullanılan döner el aleti sabit tutularak, yapılan testlerden önce devir-permutasyonu bir dönme hızı kontrol sayacı (Handpiece Counter 2, Micron Corp., Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüş ve kalibre edilmiştir (Resim 4).



Resim-4; Handpiece Counter 2 kalibrasyon cihazının görünümü (Micron Corp., Tokyo, Japonya)

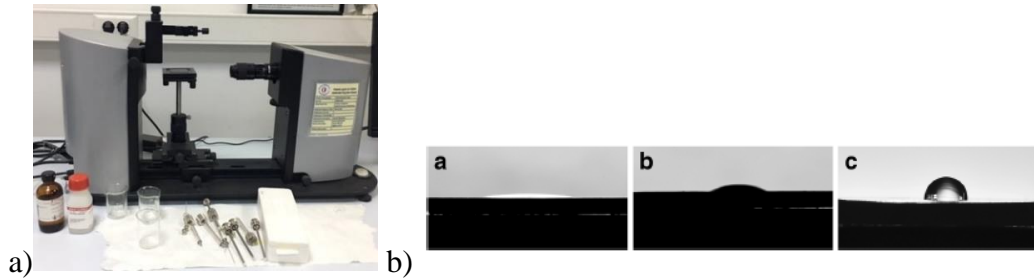
Polisaj setindeki her bir disk, iki numunenin polisaj işlemi tamamlandıktan sonra yenisiyle değiştirilmiştir. Polisaj işlemi sonunda tüm numuneler keçe disk (Super-Sap Buff; Shofu, Japonya) yardımıyla elmas partiküllü cila pastası (Diamond Stick; Shofu, Japonya) kullanılarak 60 s cilalanmıştır. İşlem sonunda tüm numuneler sabunlu su ile yıkanarak 5 dk. ultrasonik temizleme cihazına konulmuştur (Resim 5).



Resim-5: Polisaj işlemi sonunda elde edilen yüzeyin görünümü

3.4. Temas açısı ve serbest yüzey enerjisi ölçümü (SYE)

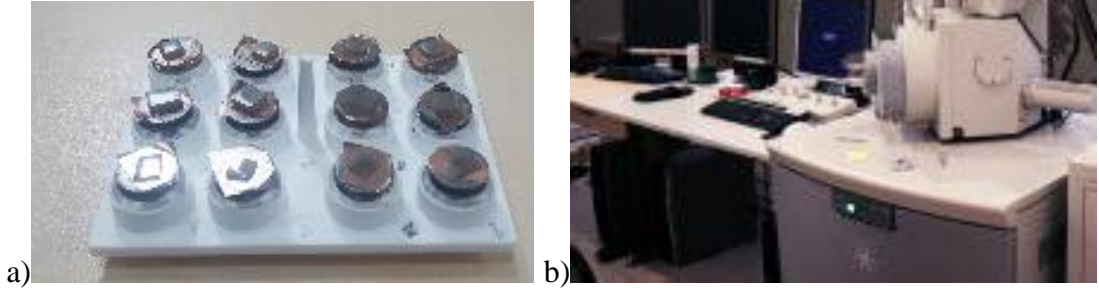
Temas açıları Ortadoğu Teknik Üniv. (ODTÜ; Ankara, Türkiye) Merkez Laboratuvarı'nda, Theta KSV goniometre (KSV Instruments, Helsinki, Finlandiya) kullanılarak sessile drop damla yöntemiyle belirlenmiştir. Kontak açısı ve yüzey enerjisinin belirlenmesinde su, dimetilsulfoksit ve etilen glikol kullanıldı. Temas açısı numunenin her birinde bir kez ölçülmüştür. SYE, apolar Lifshitz-van der Waals ve polar Lewis asit- baz etkileşimlerine göre hesaplanmıştır (Resim 6).



Resim-6: a) Theta KSV goniometre b) su, dimetilsulfoksit ve etilen glikol ile yapılan damla testi

3.5. Taramalı elektron mikroskop (SEM/ EDS) görüntüleme

Test edilen numunelerin yüzey morfolojisi ve kimyasal bileşenlerinin dağılımı, Ortadoğu Teknik Üniv. (ODTÜ; Ankara, Türkiye) Merkez Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi bünyesinde bulunan (1.2 nm) QUANTA 400F Field Emission (FEI Company, ABD) yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu yardımıyla incelendi. Gözlemeden önce numuneler kaplama ünitesinde altın palladium ile kaplandı ve 10 000 KV voltajında iki farklı büyütmede (5000 x ve 20000 x) incelendi. Doldurucu partiküllerinin element analizi, enerji dağılım X-ışını spektroskopisi (EDS) kullanılarak, her örneğin farklı iki yerinden kaydedilerek yapıldı. Materyal bileşimi, oksitler ve element konsantrasyonlarının (%1'in üzerinde) ortalama değerleri hesaplandı (Şekil 7).



Resim-7: a) SEM-EDS testi öncesi numunelerin kaplama ünitesinde altın palladium ile kaplanması b) Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu

3.6. Pürüzlülük ölçümü

Yüzey pürüzlülüğünü ölçmek için bir profilometre (Surftest SJ-210 profilometre, elmas uç, yarıçapı 5 μm , yük 4 mN, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japonya)

kullanıldı. Yüzey pürüzlülüğü (Ra) için her örnekte üç farklı bölge (orta ve yanlarda, değerlendirme uzunluğu 0.8 mm, stylus hızı 0.5 mm s⁻¹) değerlendirildi ve aritmetik ortalamaları alınarak değeri belirlendi (Resim 8).



Resim-8: Pürüzlülük testi için kullanılan profilometre cihazının görünümü (Surftest SJ-210 profilometre, elmas uç, yarıçapı 5 µm, yük 4 mN, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japonya)

3.7. Yapay tükürüğün hazırlanması

Yapay tükürük önceki bir çalışmada (108) tarif edildiği gibi; 8,4 mg NaF, 2560 mg NaCl, 332,97 mg CaCl₂, 250 mg MgCl₂ (6H₂O), 189.48 mg KCl, 3015 mg CH₃COOK, 772 mg K₃PO₄ (3H₂O) ve 0,1 ml H₃PO₄ (%85) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya), bakteriyel adezyon testinden bir gün önce hassas terazi yardımıyla hazırlanmış ve oda ısısında ışık geçirmeyen ortamda muhafaza edilmiştir.

3.8. Seçilen bakterilerin çoğaltılması ve bakteri kültürünün elde edilmesi

3.8.1. Numunelerin hazırlanması

Numuneler, son kez 5 dk ultrasonik temizleyici ile temizlendikten sonra, 121 °C'de 15 dk otoklavda (Tomy SX-700E, Japonya) steril edildi.

3.8.2. Fosfat tamponlu salin (PBS) hazırlanması

Kullanıma hazır, pH:7.4 olan bir paket PBS (Sigma, ABD), 1 litre distile suda çözdürülerek, 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

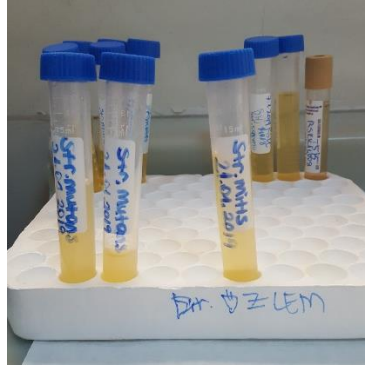
3.8.3. Kullanılan besiyerleri

a) Brain Heart Infüsiyon (BHI) Broth (BBL, BD, ABD) dehidre besiyerinin her 1 litre için içeriği: beyin kalp infüzyonu 6 g, hayvan dokularının peptik dijesti 6 g, jelatinin peptik dijesti 14,5 g, dekstroz 3 g, sodyum klorür 5 g, disodyum fosfat 2,5 g olarak verilmiştir. BHI Broth dehidre besiyeri, 1 litre distile su içine 37 g tartılarak çözdürülerek, pH:7,4 olarak ayarlandı ve %5 oranında glikoz eklenerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

b) %5 Koyun Kanlı Agar: Bakterileri üretmede kullanılan %5 Koyun Kanlı Agar için kullanıma hazır besiyeri kullanıldı. Hazır besiyerinin içeriği: Kazeinin Pankreatik Dijesti 12 g, Hayvan Dokularının Peptik Dijesti 5 g, Maya Ekstraktı 3 g, Sığır Eti Ekstraktı 3 g, Mısır Nişastası 1 g, Sodyum Klorür 5 g, Agar 13,5 g, Defibrinleştirilmiş Koyun Kanı %5 ve pH 7,3 ± 0,2.

3.8.4. Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

S. mutans ATCC 25175 liyofilize suşu açılarak BHI sıvı besiyerine ekildi. 3-5 gün %5 CO₂'li 35 °C etüvde (Thermo / FormaThermo Fisher Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, ABD) bekletilerek üremesi sağlandı. Ardından koyun kanlı agara (BBL, BD Diagnostic, ABD) ekildi. *S. mitis* suşları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri stokundan temin edilerek (-80 °C stoktan açılarak çözdürüldü) koyun kanlı agar'a ekildi. 24 saat aerobik %5 CO₂'li 35 °C etüvde (Thermo / FormaThermo Fisher Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator, ABD) bekletilerek üremeleri sağlandı. Üreyen kolonilerden, 5 ml BHI sıvı besiyeri içeren tüplere transfer edildi. 24 saat %5 CO₂'li 35°C etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda tüpler 5 dk santrifüj (Zentrifuge Rotofix 32 Hettich, Almanya) edildi. Her bir tüpe 5 ml PBS eklendi ve ardından tekrar 15 saniye santifrüj edildi. Tüpün dibindeki çökeltiden 10⁸ CFU/ml bakteri süspansiyonu hazırlandı (Resim 9).



Resim-9: *S. mutans* ve *S. mitis* süspansiyonlarının hazırlanması

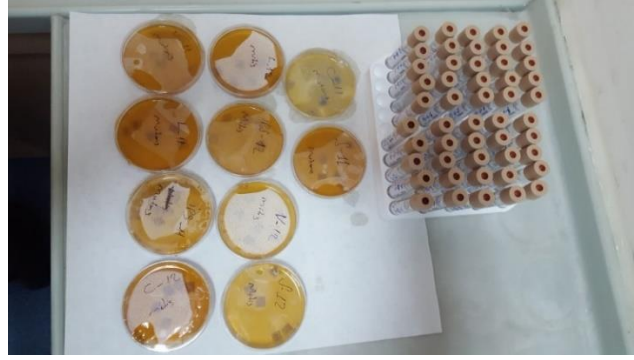
3.8.5. Numunelere bakteri adezyonunun sağlanması

Steril edilen numuneler, steril petri kutularına alınıp üzerlerine 5 ml tükürük ve münin karışımından eklendi, sonrasında pelikül'ün oluşması için, 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi (Resim 10).



Resim-10: Steril edilmiş numunelerin *S. mutans* ve *S. mitis* için belirlenen petri kaplarındaki görünümü

Sonrasında 5 ml serum fizyolojik ile yıkanarak steril petrilere alındı. Her bir numunenin yüzeyine 200 μ L hazırlanmış bakteri süspansiyonu eklendi ve 15 dk bekletildi. Sonra her bir petriye numunenin üzerini kaplayacak şekilde %5 glikoz içeren BHI sıvı besiyeri eklendi. Petriler, %5 CO₂'li 35 °C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 11).



Resim-11: Numunelere, %5 glikoz içeren BHI sıvı besiyeri eklenmesi

3.8.6. Bakteri sayımının yapılması

Besi yerinde adezyonu tamamlanan numuneler 24 saat sonunda etüv 'den alınarak, her birinde 2ml PBS bulunan tüplere alındı ve 60 s vorteksledi. 96 kuyucuklu mikropleytlarin her bir kuyucuğuna 200 µL BHI sıvı besiyeri konuldu. Üzerine 20 µL numunelerin yıkama suyundan eklendi. Mikropleytlar 24 saat %5 CO₂'li 35 °C etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikropleytlar otomatik mikropleyt okuyucuda (Robonik- Readwell Touch Automatic ELISA Plate Analyzer, Hindistan) 630 nm'de optik dansiteleri okutuldu. Tüm işlemler her iki bakteri için ayrı ayrı uygulandı.

3.9. Bakterilerin boyanması

Konfokal lazer taramalı mikroskopta inceleme öncesi bakteri ekilen numuneler LIVE/DEAD® BacLight L13152 bakteri boyama kitiyle boyandı (Canlılık Kitinin İçeriği; katı halde stabilize edilmiş SYTO 9 boya (Bileşen A), Propidium iyodür (Bileşen B) katı halde BacLight fiksasyon yağı (Bileşen C) (Resim 12).



Resim-12: LIVE/DEAD® BacLight L13152 bakteri boyama kit'in görünümü

Bacterial Viability Kit L13152 ile yüzeylere tutunan bakterilerin boyanması şu şekilde yapılmıştır;

1. 5 ml'lik bir filtre hacmi içinde Bileşen A pipetinin (sarı-turuncu katı içeren) ve Bileşen B pipetinin (kırmızı katı içeren) içeriğini sterilize dH₂O yardımıyla çözdürülerek LIVE / DEAD BacLight boyama reaktif karışımının 2X stok çözeltisini hazırlandı.
2. Elde edilen 2X stok çözeltisi tüm numune yüzeyini kaplayacak şekilde pipet yardımıyla damlatıldı.
3. Boya solüsyonu uygulanan numuneler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk bekletildi.
4. Daha sonrası numuneler steril lamel üzerine alınarak mikroskop altında gözlemlendi.

3.10. Konfokal lazer taramalı mikroskopuyla görüntüleme

Hazırlanan örnekler ODTÜ Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi Laboratuvarı büntesinde LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Almanya) argon-helium konfokal lazer tarama mikroskobu altında 40X (Oil)/1.3 büyütme, 488 nm Argon (yeşil) ve 543 nm HeNe (kırmızı) eksitasyonda görüntülendi. Emisyonları 505-530 band pass filtresi ile tarandı (Resim 13).



Resim-13: Kullanılan konfokal lazer tarama mikroskobu LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Almanya) argon-helium'un görünümü

3.11. İstatiksel analiz

Elde edilen verilerin istatiksel analizi Kruskal Wallis H testi kullanılarak değerlendirildi ve gruplar arasında fark arandı. İkili karşılaştırmalarda post hoc Dunn-Bonferroni testi uygulandı (Adjusted Significance = düzeltilmemiş p değeri). Değerlendirmeler arasındaki ilişkiyi irdelemek için non-parametrik bivariate korelasyon analizi yapılarak, Spearman Rho korelasyon katsayısı hesaplandı ($p < 0,05$).



4. BULGULAR

4.1.Yüzey pürüzlülüğü bulguları

Polisaj işlemin sonrasında yapılan pürüzlülük (Ra) ölçümlerinde en düşük değerler LAV ve CER’de elde edilmiş, bunları sırasıyla SHF, VIT ve IPS grubunun izlediği tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonucu LAV ve CER’nın, VIT ve IPS’ye göre istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu bulunmuş ($p<0,05$), SHF grubunda ise istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). (Tablo 2).

Gruplar	n	Ortalama Ra	Standart Sapma	(Farklı olduğu grup)
IPS	10	0,26	0,05	D, E
VIT	10	0,22	0,02	D, E
SHF	10	0,20	0,06	-
LAV	10	0,14	0,03	A, B
CER	10	0,16	0,03	A, B
IPS:A, VIT:B, SHF:C, LAV:D ve CER:E olarak kodlanmış ve karşılaştırılmıştır.				

Tablo-2: Yüzey pürüzlülüğü değerleri ve gruplar arasındaki istatistiksel farklar

4.2. Temas açısı ve serbest yüzey enerjisi bulguları

Su, dimetil sülfoksit, etilen glikol ile yapılan temas açısı (hidrofobiklik) testi sonucunda IPS grubu örneklerinin, SHF ve CER grubundaki örneklerle karşılaştırılmış, IPS grubunun istatistiksel olarak daha düşük derecede hidrofobiklik sergilediği ($p<0,05$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. En düşük hidrofobiklik değerleri IPS ve VIT için elde edilmiş, bunları sırasıyla LAV, SHF ve CER izlemiştir. (Tablo 3).

Tablo-3: Su, dimetil sülfoksit, etilen glikol temas açısı verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	n	Su			Dimetil Sülfoksit			Etilen Glikol		
		Ort.	Std. Spm.	(Farklı olduğu grup)	Ort.	Std. Spm.	(Farklı olduğu grup)	Ort.	Std. Spm.	(Farklı olduğu grup)
IPS	5	28,36	0,96	C,E	31,51	2,34	C	42,71	1,69	
VIT	4	37,34	3,09		30,13	2,83		43,93	1,37	
SHF	5	67,49	2,51	A	19,06	0,92	A	38,01	2,18	D
LAV	5	57,34	4,17		29,90	1,72		47,31	2,62	C,E
CER	5	70,07	2,47	A	27,39	1,74		37,93	2,72	

IPS:A, VIT:B, SHF:C, LAV:D ve CER:E olarak kodlanmış ve karşılaştırılmıştır.

Serbest yüzey enerjisinin (SYE) belirlenmesi için su, dimetil sülfoksit ve etilen glikol kullanıldı. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler geometrik ortalama yöntemi (102) kullanılarak hesaplandı. SYE, total (γ_{tot}), dağıtıcı bileşen (γ_d) ve kutupsal bileşenler (γ_p)'in toplamı olarak ifade edilmektedir. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanılmış ve veriler Tablo 4'de gösterilmiştir.

$$\gamma_{tot} = \gamma_d + \gamma_p$$

Elde edilen verilere göre en düşük SYE (γ_{tot} [mN/m]) değerleri CER grubunda olduğu görülmüş, bunu sırasıyla SHF, LAV, VIT ve IPS izlemiştir. (Tablo 4).

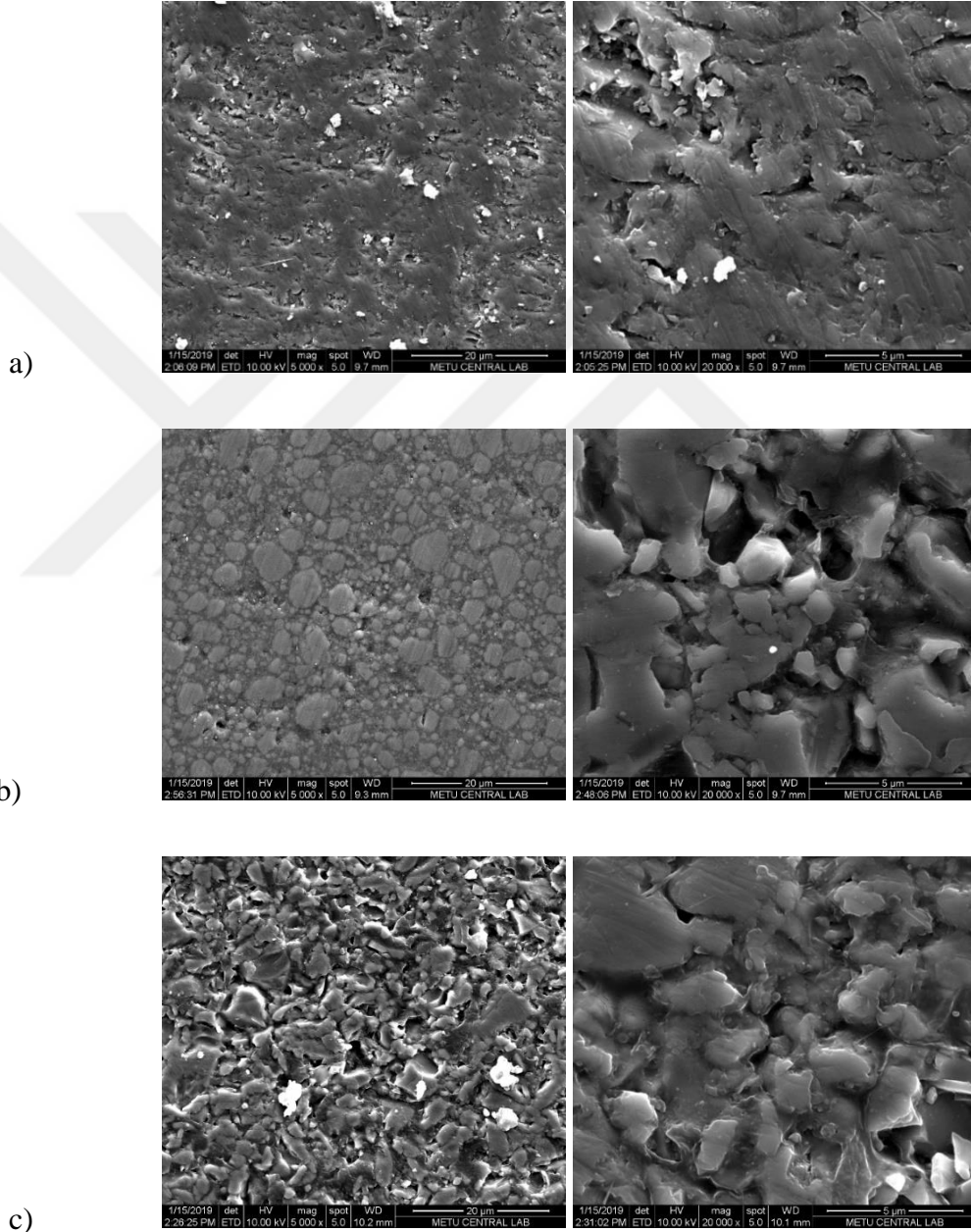
Tablo-4: SYE ölçümü değerleri

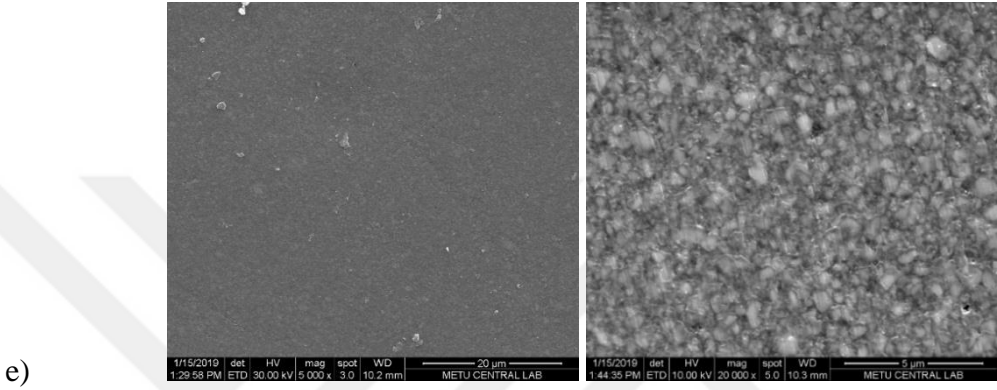
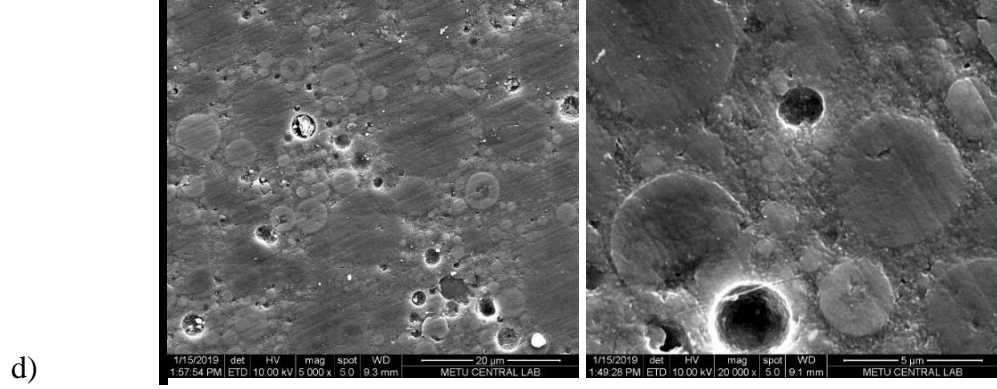
Gruplar	γ_{tot} [mN/m]	γ_d [mN/m]	γ_p [mN/m]
IPS	63,60	7,45	56,15
VIT	55,90	17,48	24,38
SHF	41,86	9,79	46,00
LAV	40,66	28,75	11,91
CER	39	28,48	11,16

4.3. SEM/EDS bulguları

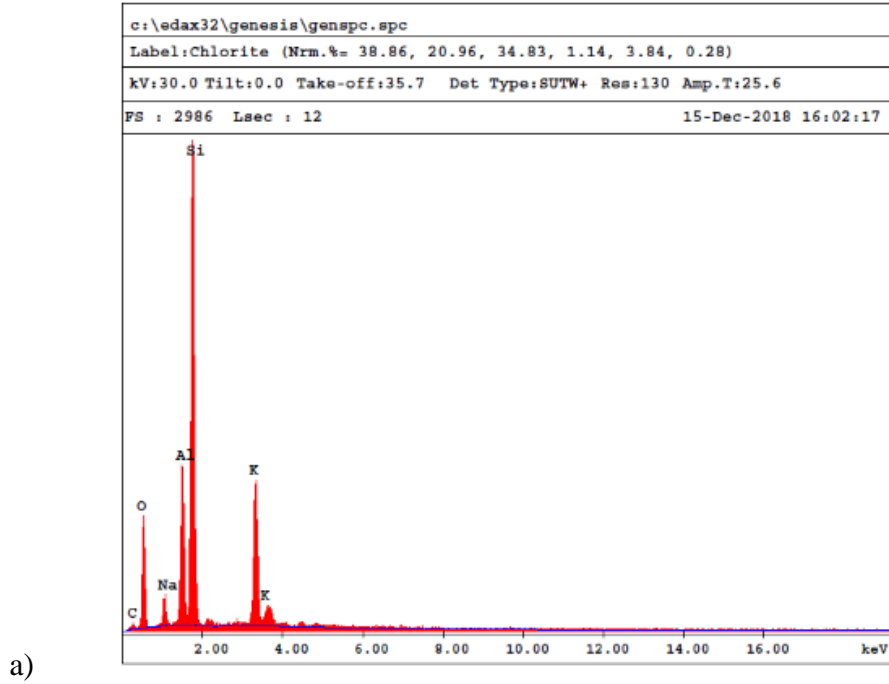
Yapılan SEM incelemesinde CER dışında tüm numune yüzeylerinde belirgin şekilde pörözitelerin ve boşlukların varlığı göze çarpmıştır. SHF materyalinde, diğer gruplarda

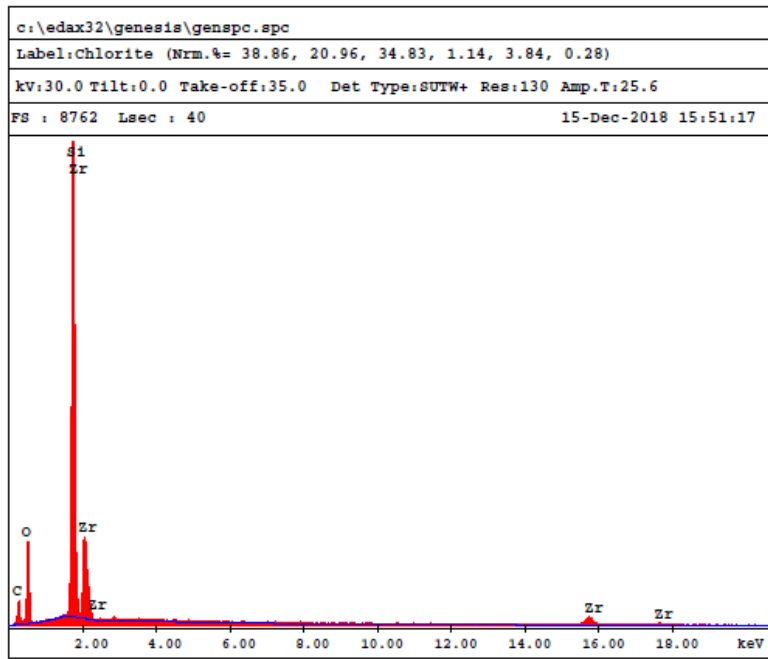
görülen farklı boyutlarda ve şekillerde olan doldurucuların, küresel formda oldukları analiz edilmiştir. Yüzeyin kimyasal bileşiminin belirlenmesinde yapılan EDS testinde genel olarak tüm gruplarda yüksek Silisyum (Si) ve düşük karbon (C) değerleri elde edilmiştir. VIT ve LAV'da zirkonyum (Zr) tespit edilmişken, CER'da baryum (Ba) elementinin farklılığı görülmüştür.



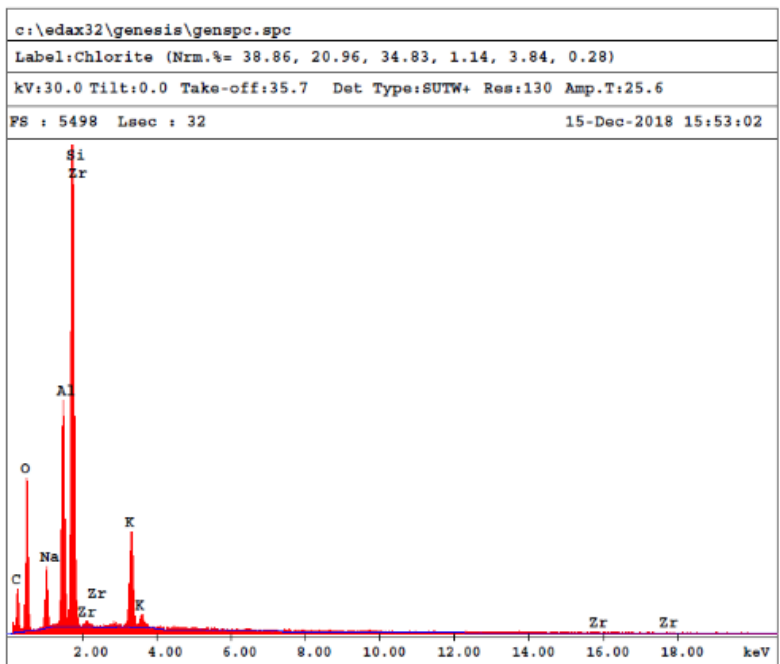


Resim-14: IPS (a), VIT (b), LAV (c), SHF (d), CER (e) gruplarının 5000x ve 20000x büyütmede SEM görüntüleri

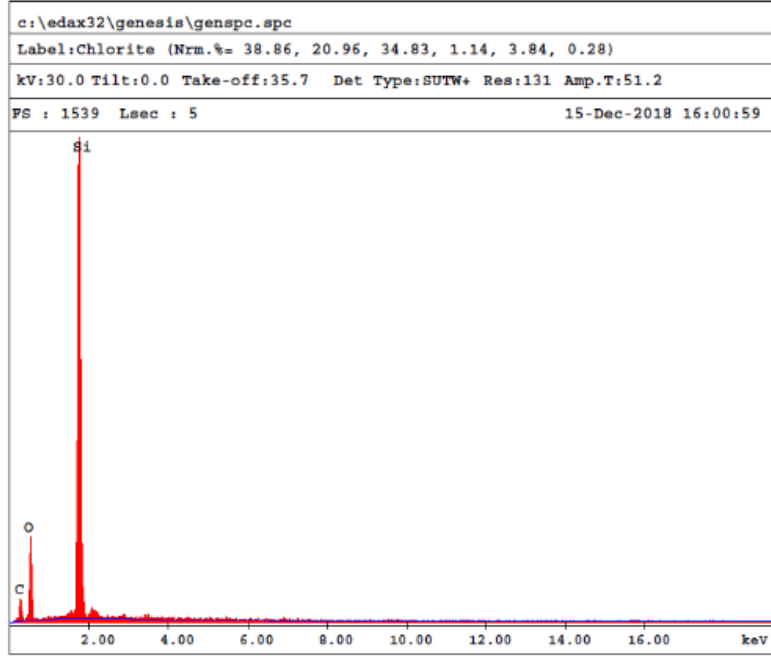




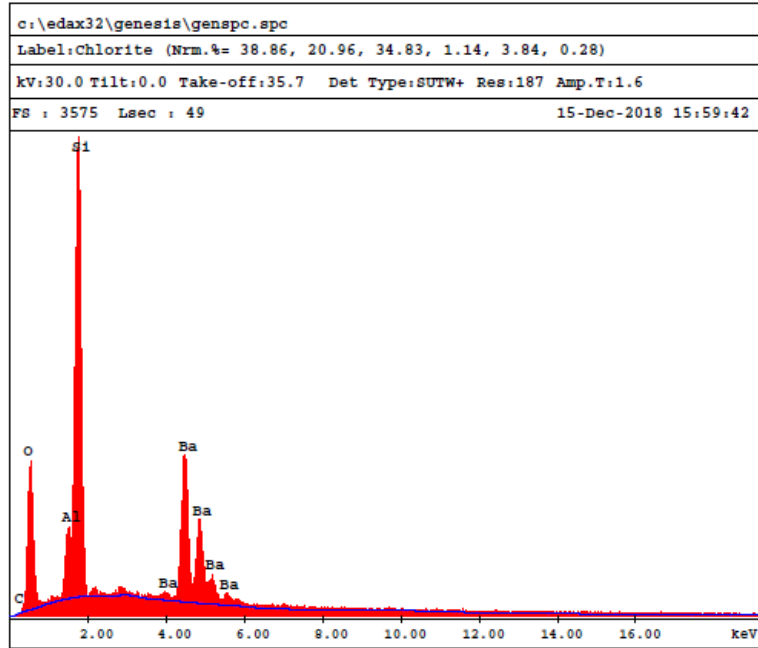
b)



c)



d)



e)

Resim-15: IPS (a), VIT (b), LAV (c), SHF (d), CER (e) gruplarının EDS analiz görselleri

4.4. Bakteri sayımı bulguları

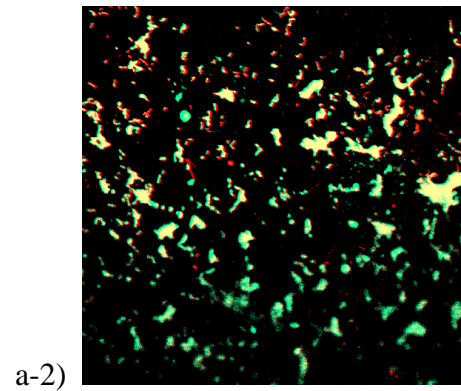
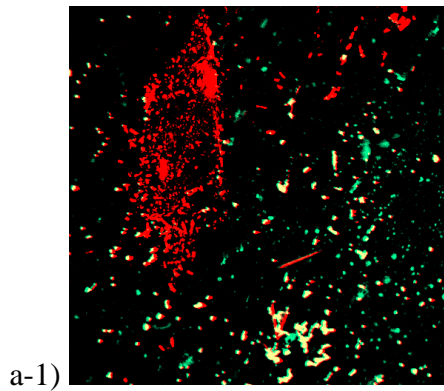
Gruplar arasında yapılan istatistiksel analiz sonucu, *S. mutans* ve *S. mitis* bakteri koloni (10^8 CFU/ml) sayılarının karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). (Tablo 5)

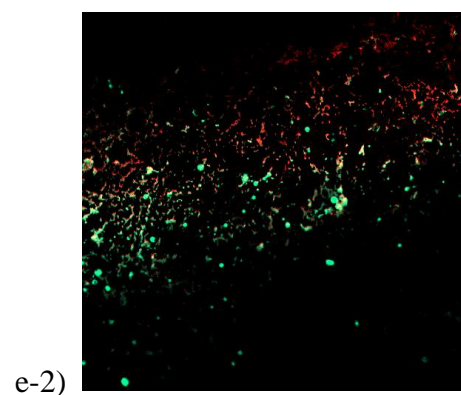
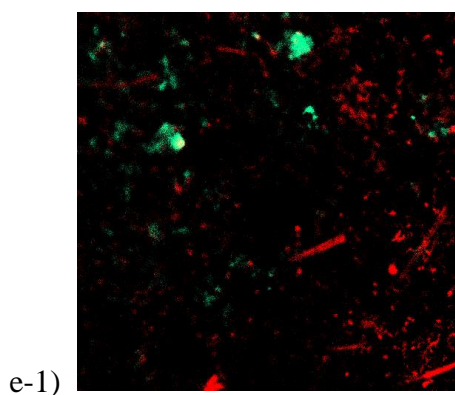
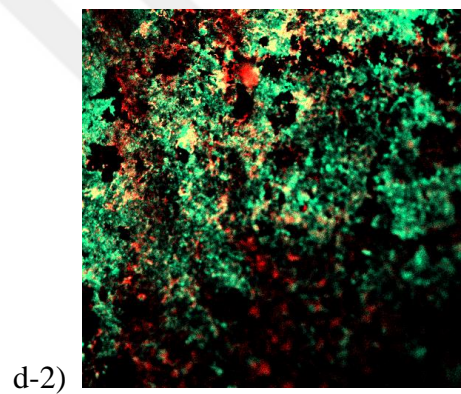
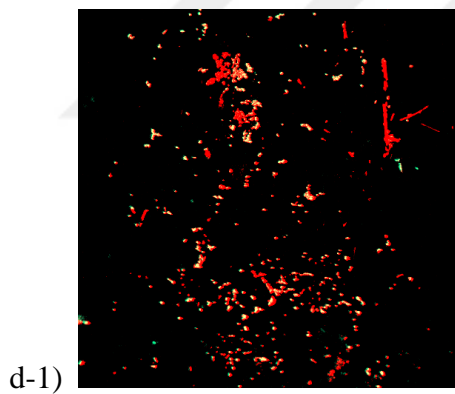
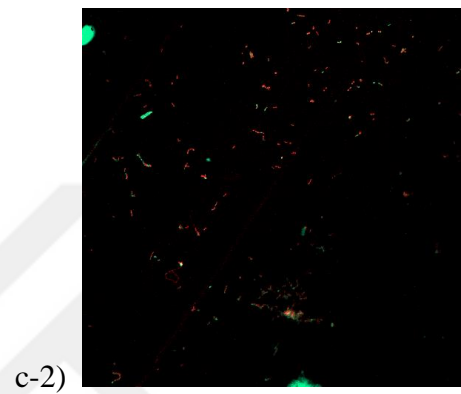
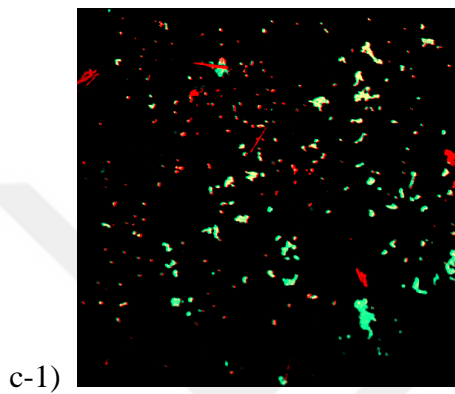
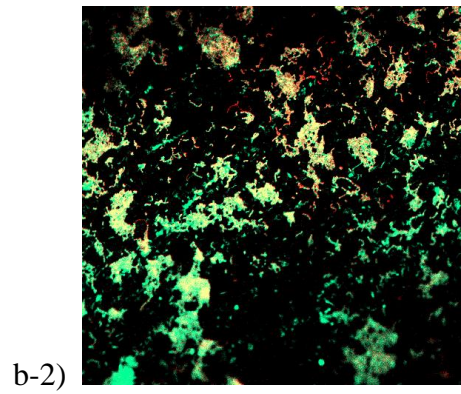
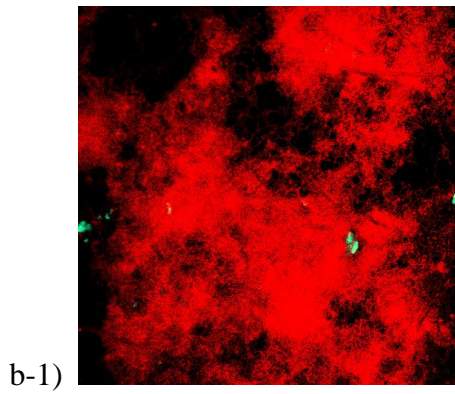
Tablo-5: Yüzeğe tutunan bakteri koloni sayıları

Gruplar	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>
IPS	1,82	13,18
VIT	1,9	11,52
LAV	1,8	12,68
SHF	1,74	12,68
CER	2,02	11,4
Bakteri koloni sayıları (10^8 CFU/ml) olarak hesaplanmıştır.		

4.5. Konfokal lazer taramalı mikroskopu (KLTM) bulguları

Resim 16'da KLTM analizinden elde edilen görüntülerde tüm gruplarda canlı ve ölü bakteri görüntüleri sunulmuştur. Genel olarak tüm gruplarda 24 saat sonunda *S. mitis* gruplarında *S. mutans*'a göre daha yüksek oranda canlılık bulgularına rastlanmıştır.





Resim-16: IPS (a1- *S.mutans*, a2- *S. mitis*), LAV (b1- *S. mutans*, b2- *S. mitis*), CER (c1- *S. mutans*, c2- *S. mitis*), VIT (d1- *S. mutans*, d2- *S. mitis*), SHF (e1- *S. mutans*, e2- *S. mitis*)

5.TARTIŞMA

Günümüzde dijital teknolojinin sağlık ve diş hekimliği alanına entegrasyonu, materyal üretiminde yeni ufuklar açılmış, daha az hatayla restorasyon üretimi dışında uygulanmalarda kolaylık gibi üstün avantajları ön plana çıkarmıştır. Yapılan bu çalışmada farklı bileşim ve üretim sürecine sahip 5 farklı güncel CAD/CAM bloğun yüzey özellikleri araştırılarak, bakteriyel adezyon ile ilişkileri SEM ve KLTM kullanılarak incelenmiştir.

Biyofilm oluşumu az sayıda bakteri hücrelerinin adezyonu ile başlar (109). Adezyon sürecinin gelişiminde, adherent yüzey özellikleri ve bakteriyolojik özellikler iki ana faktör olarak aracılık eder. Adherent yüzey faktörleri arasında yüzeyin serbest enerjisi, yüzeyin yükü, hidrofobiklik, pürüzlülük ve yüzey kimyası yer alırken, bakteriyolojik faktörler arasında bakteri hücrelerinin yüzey enerjisi, yüzey yükü ve hidrofobikliğine ilaveten, bakteri türlerinin karakteristik davranışları ve suş farklılıkları yer alır (110, 111).

Restorasyonları pürüzsüz bir yüzey ile sonlandırmak, hasta konforu yanında, estetik ve biyolojik gereklilikleri karşılayabilmek amacıyla da önem arz eder. Pürüzlü restorasyon yüzeylerinde zaman içerisinde renklenme, diş eti enfeksiyonları veya sekonder çürüklerden sorumlu plak birikimi gibi olumsuz etkiler dışında (112, 113), seramiklerin dayanımında azalma (114) ve antagonist dişlerde abrazyon yan etkiler sıklıkla görülebilir (115, 116).

Glazür ve polisaj uygulamaları, seramik restorasyonların son yüzey işlemlerinde çoğunlukla tercih edilen iki seçenektir. Her iki tekniği de karşılaştıran sayısız çalışmada, yüzeydeki değişimleri görsel, mikroskopik ve profilometrik analiz kullanılarak test edilmiştir. Cilalı seramik bir yüzeyin glazür işlemi sonunda elde edilebileceği konusunda fikir birliği olsa da, doğal dişe yakın karakteristiklerin polisaj işlemlerinin neticesinde görülebileceği düşünülmektedir. Bitim ve polisaj işlemlerinin sağladığı yüksek kontrol sebebiyle yaygın olarak tercih edilse de, ideal bitim ve polisaj protokolü hakkında literatürde halen tam bir fikir birliği yoktur (117).

Martinez-Gomis ve ark. (118) seramik materyallerde elmas frez ile pürüzlendirme işlemi sonrası farklı polisaj tekniklerinin (beyaz parlatma diskleri, Shofu diskleri ve Sof - lex disklerinin) etkisini incelemiştir, Sof-lex disklerin en iyi pürüzsüzlük

değerlerini sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgular, Al - Shammery ve ark.'nın, CAD/CAM seramik materyallerde Sof-Lex polisaj disklerinin etkinliğini araştıran çalışmalarından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir (119).

Diş hekimliğinde seramik materyallerin cilalama aşamasında, diamond pastalarının kullanılması yaygın bir uygulamadır (120, 121). Bu tip ajanların, fırça ve lastik gibi yardımcı araçlarla beraber kullanıldıklarında, oldukça etkili cilalama sağladıkları görülmüştür (122). Ikeda ve ark., iki indirekt kompozit materyalde farklı polisaj prosedürleri (800 grit zımpara veya diamond pastası) uygulayarak, yüzey pürüzlülüğünü, artık monomer ve doldurucu içeriği miktarını bakteriyel adezyon ile ilişkisini değerlendiren çalışmalarında, diamond pastası kullanılan grupta en düşük biyofilm oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca yüzey pürüzlülüğünün ve materyal bileşiminin biyofilm sürecini etkilediği sonucuna varmışlardır (123).

Yapılan bir derlemede, polisaj işleminin sonunda diamond cilalama pastaları kullanmanın, yüzeyin pürüzsüzlüğünde iyileşme sağladığı (122, 124), ancak tek başına kullanılmasının farklı seramik materyallerde yeterli etkinliği sağlayamadığı belirtilmiştir (122). Diamond pastası ile cilalama, plak birikimini önleyecek pürüzsüz bir yüzey elde etmek için yararlı olduğu kabul gördüğünden (125), mevcut çalışmamızda kullanılmasına karar verilmiştir.

Yüzey pürüzlülüğü değerlendirmesi için çeşitli yöntemler mevcut olmasına rağmen, en yaygın kullanılan ve kabul edilen yöntem mekanik profilometridir. Genel olarak, Ra evrensel olarak kabul görmüş ve en çok kullanılan uluslararası pürüzlülük parametresidir (126). Bu parametre, bir profilin yüzeyinde belirli uzunlukta ölçülen mesafelerin mutlak aritmetik ortalama değerini tanımlanır (113, 127). Çalışmada kullanılan Sof-Lex diskleri, dental seramikler için etkili polisaj yöntemi olarak tanımlanmıştır (118, 128). Bu polisaj sistemiyle yapılan çalışmalarda seramiğin yapısal bileşenlerine ve profilometrik ölçüm parametrelerine bağlı olarak, 0,2 µm ile 0,7 µm arasında değişen Ra değerleri elde edilmiştir (120, 124, 129). Literatür, bitim ve polisaj işleminin seramik yüzeylerde boşluk ve mikro çatlakların oluşumu bildirilmişse de (124, 130), bu kusurların ortalama pürüzlülük (Ra) değerlerine veya plak adezyon miktarına katkıda bulunmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda profilometre yardımıyla yüzey pürüzlülükleri değerlendirilen materyallerin Ra değerleri tüm gruplarda eşik değerinin altında ($<0,2\mu\text{m}$) çıkmışsa da, kendi içinde LAV ve CER 'nın, istatistiksel olarak VIT ve IPS'ye göre anlamlı derecede en az pürüzlü oldukları gözlemlenmiştir. Fasbinder ve ark., 3D lazer mikroskop kullanarak 3 farklı yapıdaki CAD/CAM blokların (Lava Ultimate, VITA Enamic ve IPS Empress CAD), farklı bitim ve polisaj sistemlerini glazür işlemi ile karşılaştırarak, yüzey pürüzlülüklerini incelemiştir. Elde edilen bulgularda, Lava Ultimate'in en düşük pürüzlülüğe sahip olduğu, onu Vita Enamic ve IPS Empress CAD takip ettiği görülmüştür. Sonuç olarak, bitim ve polisaj tekniklerinin glazür işlemine göre daha düşük pürüzlülük değerlerine sahip olduğunu bulmuşlardır (131). Bu bulgular çalışmamızda değerlendirilen materyallerin pürüzlülük verileriyle uyumluluk göstermiştir.

Rezin bazlı materyaller yapısal olarak, bir hidrofobik rezin matriks'ten ve daha az hidrofobik olan dolduruculardan oluşan kompleks yapılardır. Bu durum, rezin esaslı kompozit yüzeyinin asla homojen bir arayüz oluşturamayacağını hatırlatmaktadır. Bitim ve polisaj işlemleri sonrasında rezin ve doldurucu içeriğinin kimyası hariç, doldurucu boyutu ve şeklindeki farklılıkların, yüzey pürüzlülüğü ve yüzey kimyasında farklılıklara yol açtığı görülmüştür (104, 131, 132).

Polisaj prosedürü, rezin esaslı materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişime yol açar. Polisaj işlemleriyle yüzeydeki matriks bakımından zengin rezin katmanlar uzaklaştırılarak, başlangıçtaki yüzeyden (133) kimyasal ve fiziksel olarak farklı bir yüzey elde edilir. Bu nedenle, rezin esaslı materyallerin bileşimindeki ve polisaj prosedüründeki farklılıkların, rezin esaslı materyallerin yüzeyinde biyofilm oluşumu üzerinde farklı etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir (95, 134).

İnorganik doldurucuların türü, büyüklüğü ve miktarının polimer bazlı materyallerin mekanik özelliklerini ve cilalanmasını etkilediği gerçeği göz önüne alındığında (135), geliştirilmiş mekanik ve estetik özelliklere sahip materyaller üretmek için, küçültülmüş ve geniş dağılım sergileyen nanometrik boyutlu doldurucular geliştirilmiştir. Etkin polisaj amacıyla organik matriksin aşırı kaybına yol açmamak için, polisaj materyallerinin aşındırıcı partikülleri, inorganik doldurucularından daha üstün sertlik göstermemelidir (135, 136). Aynı zamanda aşındırıcıların yüzey

geometrisi ve uygun polisaj prosedürü, bu tür materyallerin yüzey parlaklığını doğrudan etkiler (137).

Bitim ve polisaj işlemi sırasında yüzeyden çıkarılan seramik kristaller, seçilen sistemin bir parçası olabileceğinden, yüzey topoğrafyasının özelliklerine katkıda bulunabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (115). Goryainova ve ark., 4 farklı CAD/CAM bloğun elastik özellikleri ve internal yapılarını inceleyen çalışmalarında, lösit güçlendirilmiş cam seramik (IPS Empress CAD, Ivoclar Vivadent) ve feldspattık seramik (VITA Blocs Mark II, VITA Zahnfabrik) CAD/CAM materyallerde 10 - 100 mikron arasında değişen büyüklükte porların varlığını tespit etmişler, buna karşın hibrit seramik (VITA Enamic, VITA Zahnfabrik) grupta herhangi bir defekt gözlemlenmemişlerdir(138).

Yapılan birçok çalışmada bakteriyel adezyonun gelişiminde pürüzlülüğün diğer yüzey özelliklerine göre daha etkin rol oynadığı görülmüştür. Mevcut çalışmada test edilen materyallerde bakteriyel adezyon yönünden fark bulunamamıştır. Quirynen ve ark, yüzey pürüzlülüğün 'de 2 µm'lik Ra değerinin üzerindeki artışın, in vivo biyofilm oluşumunda artışa yol açtığını(139), Bollen ve ark. ise 0.2 µm Ra'nın, bakteri adezyonunda azalmanın beklenmeyeceği bir eşik değer olduğunu göstermiştir (140). Bazı yazarlar bu faktörü dental materyallerde biyofilm oluşumuyla ilişkilendirememişlerse de (72), uzun süreli inkübasyon sürelerinin SR'nin rolünü azalttığı, görülen bakteriyel adezyonun, doğrudan test edilen materyal yüzeyi yerine, mevcut biyofilm üzerine adezyonuyla açıklamışlardır (141).

Bitim ve cila gibi klinik prosedürlerin yanı sıra, rezin esaslı materyallerin kimyasal bileşimindeki farklılıklar bakteriyel adezyon ve ardından biyofilm oluşumu üzerinde belirli etkiye sahip olduğu bilinmektedir (95). Bu materyaller genellikle hidrofilik özellikte doldurucuları içeren bir hidrofobik rezin matriks'den ve iki faz arasındaki ara bağlayıcı ajandan oluşurlar. Bu tür bir bileşime sahip materyallerin homojenlik oluşturamayacağı, yüzeyde topoğrafik ve kimyasal farklılıkların görülebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (142). Bu farklılıklar, rezin matriks veya doldurucu kimyası yanı sıra doldurucu şekli veya boyutunun modifikasyonlarından kaynaklanabilir. Resin bazlı kompozitlerin kimyası, test edilen mikroorganizmaya bağlı olarak biyofilm oluşumu üzerinde farklı bir etkiye sahip olabilir. Resin matriks kimyası ve doldurucu fraksiyonunun, tek tür (S. mutans) ve çoklu türlerden oluşturulan biyofilm

üzerindeki etkisini değerlendiren bir çalışmada (143), doldurucu fraksiyonunun etkisinin tek tür biyofilm modeli üzerinde rezin matrisinin etkisine göre daha baskın olduğu, tersi durumun ise çoklu tür biyofilm modelinde geçerli olduğu görülmüştür (98).

Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalar, adherentin yüzey özelliklerinin pelikıldan geçip aktarılamadığı, bakteri adezyonunun tükürük pelikılından kaynaklanan uzun mesafeli kuvvetlerden önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir (144). Buna karşın, Carlén ve ark., tükürük pelikılının varlığında bile yüzey pürüzlülüğündeki artışın, bakteriyel adezyonda artışa neden olduğunu göstermiştir (104). Bu göstergeler ışığında, yüzeylerin fiziko-kimyasal özelliklerinin kısmen tükürük varlığıyla dengelenmiş olduğu sonucuna varmak mümkündür.

Son yıllarda, yüzey topoğrafyasının bakteriyel adezyon ve biyofilm oluşumunda çok önemli bir faktör olduğu bulunmuştur. Ionescu ve ark., farklı materyallerin yüzey pürüzlülüğü ve SYE değerleri'nin benzerlik sergilediği durumlarda (143), biyofilm oluşumunda yüzey topoğrafyasının önemli bir rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Yüzey pürüzlülüğünün bazı araştırmalarda (90, 91, 145), tek başına bir yüzeyin 3 boyutlu özelliklerini doğru şekilde tanımlamadığı, yüzeydeki yükselti ve çöküntü dağılımının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisine dikkat çekilmiştir. Yapılan mevcut çalışmada gözlenen bakteriyel adezyon, test edilen materyallerde kullanılan doldurucuların boyutuna ve matriks monomerinden kaynaklı neden-sonuç ilişkisine bağlanabilir (146, 147).

Jeong-Won Park ve ark., yaptıkları in vitro çalışmada, nanofil dolduruculu kompozit üzerinde, standart polisaj prosedürü uygulayarak yüzey pürüzlülüğünü ve *S. mutans*'ın tükürük varlığında ve yokluğunda adezyonunu inceleyerek, bakteriyel adezyon oluşumunda yüzey pürüzlülüğüne göre, yüzey topoğrafyasının daha etkili faktör olduğu sonucuna varmışlardır (148). Pereira ve ark., nanofil, nanohibrit ve mikrohibrit dolduruculu rezin kompozitlerde farklı bitim ve polisaj işlemleri sonrası tükürük varlığında *S. mutans*'ın adezyonun inceledikleri in vitro çalışmalarında, pelikıl varlığının bitim ve polisaj tekniğinden bağımsız olarak bakteriyel adezyonu arttırdığı, ancak nanofil dolduruculu grupta diğerlerine göre daha az adezyon oluştuğunu gözlemlemişlerdir (149).

Kullanılan dört rezin seramik bloğun ortak benzerlikleri (VIT, LAV, SHF, CER), Bis-GMA ve TEGDMA'nın yerine aromatik-alifatik üretilen dimetakrilat (UDMA) monomer içermesidir. Bis-GMA ve TEGDMA'nın aksine, bu monomer bir hidroksil grubundan oluşmadığından, su emilimine ve çözünürlüğe karşı daha az duyarlılık sergilemektedir (108). Ancak bu materyallerin ağırlıklı olarak seramik, silikon dioksit veya camdan oluşan yüksek miktarda inorganik doldurucu içermeleri sebebiyle, polisaj işlemi sonrası yüzeydeki inorganik bileşenlerde daha yüksek oranda kırılma yada kopmalar görülmüştür (150).

Ağızdaki tüm yüzeylerin, nanotopoğrafıyı değiştirebilen tükürük pelikılı tarafından kaplandığı, bunun yüzey pürüzlülüğünü büyük ölçüde etkilediğini not etmek önemlidir (88). Jendresen ve Glantz , dental materyallerin tükürük ortamında 1-2 saat sonunda orijinal yüzey özelliklerinden bağımsız olarak (yüksek veya düşük enerjili yüzeyler), pelikıl ile kaplı doğal diş ile aynı yüzey özelliklerini sergilediklerini bildirmişlerdir (151). Meier ve ark.'nın yaptıkları in vitro bir çalışmada dört farklı seramik materyalin tükürük varlığında biyofilm formasyonunu, S. sanguinis, S. oralis, S. mutans, S. sobrinus ile ilişkisini araştırmışlar, sonuç olarak tükürük kaplı yüzeylerde materyal özelliklerinin başlangıç adezyonunu baskın şekilde etkilediğini gözlemlemişlerdir (152).

Rezin esaslı materyallerde yüzey pürüzlülüğü ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişki, tükürük (153, 154) veya S. mutans tarafından üretilen hücre dışı glukanların yüzey özelliklerinde orijinal farklılıkları maskeleyebileceğinden değişebilir. Sükroz varlığında S. mutans'lar, esas olarak hücre yüzeylerinden türetilmiş GTF'ler tarafından sentezlenen glukanları kullanarak yüzeylere bağlanırlar. Bu nedenle, yüzeydeki düzensizlikler, özellikle daha büyük ve daha derin çöküntüler, glukan birikimi için daha büyük bir alan sağlayabilir. Bu, bakteriyel kolonizasyonu daha da geliştirmesi dışında, geri dönüşümsüz ve daha güçlü adezyonu gerçekleştirir (148). Bu sonuçlar mevcut çalışmada yüzey topoğrafyasının, S. mutans'ların yüzeylere sükroz bağımlı adezyonunda önemli bir faktör olabileceğini düşündürebilir.

Bununla birlikte, bu çalışmada kullanılan S. mitis'in materyaller üzerindeki adezyonunda farklılık gözlenmemiştir. S. mitis, oral mikrofloranın temel bakteriyel unsurlarından olup, yapısal GFT genlerini taşımadığı için glukan üretme yeteneğine sahip olmadığı bilinmektedir (155). S. mitis 'in materyal yüzeylerine primer

bağlanmasında hücre duvarı proteinlerinin veya adezin'lerinin, önemli roller oynayabileceği düşünülebilir (156). Ayrıca, güçlü hücreler arası adezyon özellikleri, *S. mitis* biyofilmlerinin oluşumunda öne çıkmaktadır.

Yüzey pürüzlülüğünün bakteri adezyonu ve biyofilm oluşumu üzerindeki kesin etkileri, bakteri hücrelerinin boyutuna, şekline ve diğer çevresel faktörlere göre değişmektedir. Bu nedenle, tüm bakteri türlerinin adezyonunu baskılayabilecek evrensel optimum bir pürüzlülük yoktur (85). Seramik yüzeylerin pürüzlülüğünün 0.2-2 µm arasında artması, *S. mutans*'ların biyofilm oluşumunu kolaylaştırmamıştır (87).

Yüzey pürüzlülüğünün yanı sıra, yüzey hidrofobikliğin mikrobiyal adezyonu etkileyen diğer önemli bir faktör olduğu bulunmuştur (97, 157). Genellikle 90°den daha yüksek su temas açılara sahip yüzeylerin hidrofobik, kabul edilirken, 90°den daha düşük temas açılara sahip yüzeylerin hidrofilik olarak tanımlandığı kabul edilir (101). Literatürde daha hidrofobik yüzeylerde adezyon kuvvetlerinin güçlü şekilde ortaya çıkabileceği varsayılmaktadır. Bunun nedeni olarak suyun, hücre yüzeyi ile hidrofobik bir materyal arasındaki alandan, hidrofilik bir materyale göre daha kolay uzaklaştırılabilir olmasıyla açıklanabilir (153). Yapılan mevcut çalışmada, hem *S. mutans* hem de *S. mitis*'in tüm materyallerde benzer oranda biyofilmler oluşturması, hidrofobikliğin biyofilm oluşumu üzerine etkisiyle yorumlanamamıştır. Ancak, Marmur tarafından ileri sürülen yüzey kriterlerinin su altı süper hidrofobikliğine uygulanamayacağı, bunun sıvıya batırılmış bir plaka için anlamsız olacağı yönündeki görüşüyle ilişkilendirilebilir (158). Resim 10-11, deney materyallerinin yüzeylerinin, deneyler boyunca tamamen su altında kaldığını göstermektedir. Bu, sonuçlarımızın materyalin yüzey özellikleri ile bakteri birikimi arasında anlamlı bir ilişki göstermemesinin nedeni olabilir.

Yu ve ark. yaptıkları in vitro bir çalışmada *S. mutans*'ın zirkonia üzerinde adezyonun incelemişler. Elde edilen bulgularda yüzey nanopürüzlülüğünün ve hidrofobikliğin sadece adezyon kuvvetini değil aynı zamanda başlangıç adezyonunu de etkilediği sonucuna varmışlardır(159). Yapılan çalışmada temas açısı ölçümlerinde istatistiksel olarak IPS ile SHF ve CER arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüş, SHF ve CER gruplarının diğerlerine göre yüksek hidrofobik özellikler sergilerken, IPS'de en düşük değerler görülmüştür.

Adherent'in yüzeyinin yüzey özelliklerinin etkisi dışında, bakteri yüzey özelliklerinin de adezyonda belirleyici rol oynadığı bildirilmiştir. Bu yönüyle, düşük yüzey serbest enerjisine sahip bakterilerin, hidrofobik yüzey özelliklerine benzer katı yüzeyleri tercih ettikleri bulunmuştur (160, 161). Bu çalışmada kullanılan *S. mutans* suşu için, düşük hücreli yüzey serbest enerjisine karşılık gelen hidrofobik yüzey özellikleri bildirilmiştir (162), bu nedenle hidrofobik yüzeylerde daha yoğun biyofilm oluşumu beklenirken, fark bulunamamıştır. Ancak, iyonik kuvvetlerin bakterileri adezyonunu kararlı şekilde etkileyebileceği akılda tutulmalıdır.

Yapılan çalışmada polar ve dağıtıcı bileşenlerin tespit edilmesinde üç farklı sıvının değerleri kullanıldı. Bunlar, dağıtıcı bileşen üzerinde baskın bir polar bileşene sahip olan deiyonize su, polar bileşenden biraz daha büyük bir dispersiyon bileşenine sahip etilen glikol ve son olarak polar bileşen üzerinde baskın bir dispersiyon bileşenine sahip olan dimetil sülfoksit'tir. Yüksek bir γ^P değerinin, güçlü bakteriyel bağlantı sağladığı (163, 164), tersinin ise bağlanma kuvvetlerini azaltabileceği anlamına gelir. Yapılan çalışmada en yüksek polar etkileşimler IPS grubunda olduğu görülürken onu sırasıyla VIT, LAV, SHF ve CER izlemiştir.

Yüzey pürüzlülüğü ve SYE özelliklerini inceleyen in vitro bir çalışmada (145), benzer SYE değerlerine sahip materyallerin, farklı biyofilm oluşumu seviyeleri gösterdiği mikrobiyal adezyon ile SYE arasında güçlü bir korelasyon olmadığı, ancak yüzey pürüzlülüğünün daha güçlü bir etkisi oluşturduğu belirtilmiştir. Benzer gözlemler, Tanner ve ark.'nın in vivo çalışma sonuçlarında, oral ortamda yüzey pürüzlülüğünün dental materyallerin biyofilm oluşumunu etkilemede SYE'den daha önemli görüldüğünü doğrulamışlardır (165). Öte yandan, farklı yüzey özelliklerine sahip materyallerin mikrobiyal biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendiren araştırmalar (166), dağıtıcı, polar ve asit katkısı ile SYE'nin, bu materyallerde bakteriyel adezyonunu yüzey pürüzlülüğünden daha fazla etkilediğini göstermiştir.

Bir yüzeyin tükürük pelikül tabakasıyla kaplanması, oral bakteriyel kolonizasyon için ilk adımdır. Oral bakteriler peliküldaki konakçı kaynaklı reseptörlere bağlanırlar (123). Bu çalışmada, kullanılan numuneler oral ortamı (120, 129) taklit etmesi için yapay tükürük ve müsin ile kaplanmıştır. Tükürüğün SYE üzerinde etkisinin olduğu, bu etkinliği düşük SYE sahip yüzeylerde artış yönündeyken, yüksek SYE sahip yüzeylerde ise tersi olarak bildirilmiştir (94).

Çeşitli oral streptokokların yüzey enerjilerinin (Yb) tespiti, türler düzeyinde önemli farklılıklar ortaya çıkararak, yüksek ve düşük yüzey serbest enerjili suşlar arasında genel bir ayırım yapılmasını gerektirmiştir (167). *S. mitis* türleri ve *S. milleri* olarak sınıflandırılan bazı suşlar, son derece düşük yüzey enerjileri sergilerken, *S. sanguis* (hem biyotip 1 ve 2), *S. mutans*, *S. salivarius* *S. milleri* izolatlarının geri kalanı yüksek yüzey serbest enerji grubunu oluşturmaktadır. Bakterilerin tükürük ile ön inkübasyonu sonrası, bağlanmamış ve gevşek bağlanan bileşenleri uzaklaştırmak için yıkama yapıldığında, düşük SFE sahip bakterilerin, özellikle *S. mitis*'in yüzey enerjisi önemli ölçüde artış göstermiştir (168). Bu durum yıkama prosedürü sırasında bazı tükürük bileşenlerinin bakteri yüzeyinden kaybedilmiş olabileceği şeklinde yorumlanmasına rağmen, yine de yüzey özelliklerini etkileyen tükürük etkisini göstermektedir. Yüksek SYE sahip bakteriler bundan önemli derecede etkilenmemektedir. Bu bulgular mevcut yapılan çalışmada elde edilen *S. mitis* (10^8 CFU/ml) değerlerinin yüksek olmasını açıklayabilir.

Mei ve ark. yaptıkları in vitro çalışmada iki farklı ortodontik kompozit materyale yapılan standart polisaj prosedürü sonrası, 3 farklı yüzey pürüzlüğüne sahip (düşük, orta, yüksek) gruplar oluşturarak, tükürük varlığında ve yokluğunda *S. mutans* ve *S. sanguinis*'un adezyon kuvvetlerini atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yardımıyla incelemiştir. İstatiksel olarak gruplar arasında önemli fark bulunamamasına rağmen, tükürüğün pürüzlü yüzeylerin pürüzlülüğünü azalttığı görülmüştür. Ayrıca kullanılan materyallerin hidrofobik özellikler sergiledikleri, *S. mutans*'ın *S. sanguinis* göre daha zayıf adezyon oluşturduğu ve yüzeyden daha kolay uzaklaştırılabildiğini gözlemlemiştir (169). Bu göstergeler, mevcut çalışmamızda *S. mutans* ile *S. mitis* 'in bakteri koloni (10^8 CFU/ml) değerleri arasındaki farklılık ile uyum sergilemiştir.

Çeşitli tükürük bileşenlerinin streptokok'lara, immünoglobülinler'e (170), kan grubu-reaktif müsin'lerine (171, 172), yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein adezin'lere (173), 2-mikroglobulin'lere (174), lizozim (175) ve a-amilaz'lara (176) bağlandığı gösterilmiştir. Bu maddelerin birçoğunun, ağız boşluğu içindeki yüzeylere adezyon sürecinde destekleyici veya inhibitör olarak rol aldıkları öne sürülmüştür. Düşük yüzey enerjisine sahip olan bakterilerin, yüksek enerjili gruba göre farklı tükürük bileşenleri adsorbe edip etmediği henüz bilinmemekteyse de, araştırmalar devam etmektedir. Sonuçlar, başlangıçta farklı bakterilerin serbest yüzey enerjisi gibi fizikokimyasal

yüzey özelliklerinin tükürük ile kaplandığında eşitlenme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu gözlem, başlangıçta düşük yüzey hidrofobikliği olan oral streptokokların, tükürük ile kaplandıktan sonra daha hidrofobik hale geldiğini ve farklı suşlar arasında daha fazla homojenliğe neden olduğunu gösteren Beighton 'un bulgularıyla uyumludur (177).

Asit-baz etkileşimlerinin rol aldığı yüksek polar bileşenin, bakteriyel adezyonu güçlü şekilde etkilediği, bazik komponentin bakterilerin katı yüzeye adezyon oluşumunda önemli rol oynadığı gözlemlenmiştir (178). Bu durum katı yüzeylerin düşük asidik ve daha yüksek bazik değerlerine sahip olma eğiliminde olmalarıyla açıklanabilir (179). Bazı karyojenik türlerin hidrofobik yapıya yatkın oldukları (180, 181), özellikle primer kolonizörlerin daha güçlü adezyon kuvvetleri sergiledikleri bildirilmiştir (153).

Yapılan EDS analizinde her bir materyal de yüksek oranda Si ve düşük oranda C seviyeleri tespit edilmiştir. Bunun yansısı VITA Enamic ve LAVA Ultimate yüzeyinde Zr, Cerasmart'ın yüzeyinde ise Ba inorganik içeriği tespit edilmiştir. Farklı yüzey işlemlerine tabi tutulan materyaller benzer pürüzlülük ve SYE değerleri gösterebilir, ancak farklı kimyasal yüzey bileşimleri biyolojik performanslarını etkileyebilir. Ionescu ve ark. yaptığı bir diğer in vitro çalışmada dört farklı rezin esaslı kompozit'in yüzey özelliklerinin, S. mutans adezyonu üzerindeki etkilerini yapay ağız sistemi (AMS) ortamında 48 ve 96 saat süreçlerinde AFM ve XPS kullanarak incelemişlerdir. Elde edilen bulgularda polisajdan sonra SYE'de artış, XPS analizi sonucunda yüzeyde düşük C ve yüksek oranda Si olduğu görülmüştür. Polisaj yapılan numunelerde S. mutans adezyonunda önemli derecede düşüş olduğu, yüzeydeki matriks ve doldurucu bileşimiyle ilişkili olarak rezin matriks'in yüzeydeki ekpozu biyofilm oluşumunu azalttığı sonucuna varmışlardır (83).

Tükürük protein adsorpsiyonunun (182, 183) substrat yüzey özellikleriyle ilişkisi bilinmesine rağmen, Hannig ve ark. substrat serbest yüzey enerjisinin, yüzeye adsorbe edilen toplam tükürük proteini miktarından ziyade, pelikül'ın oluşum hızıyla ilişkisi olduğunu gözlemlemişlerdir (184). Dahası, Carle'n ve ark., dental biyomateryaller üzerindeki yaptıkları çalışmalarında protein adsorpsiyonunun, özellikle substrat yüzey pürüzlülüğüne bağlı olduğu sonucuna varmışlardır (104). Bu farklı bulgulardan yola çıkarak, adsorbe edilen toplam protein miktarının, yüzey enerjisindeki farklılıklar için bir açıklama olabileceği açık değildir. Rosengren ve ark.'nın plazma protein

adsorbsiyonunun araştırdıkları çalışmalarında, yüzeyin yaklaşık %70'inin proteinlerle kaplı olmadığını tespit etmişlerdir (185). Bununla birlikte bu fenomen, bu çalışmada hesaplanan temas açıları ve yüzey serbest enerjilerindeki farklılıklar için geçerli bir açıklama olarak görebilir.

Kültür ortamı seçimi inokulum türüne bağlı gibi görünmekle birlikte, inokulum kaynağının seçimi çalışmanın gereksinimlerine veya ele alınacak araştırma sorusuna bağlıdır. Monokltrler, biyofilmin spesifik fizyolojik yönlerini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmalar için daha doğru bir tercih olduğu belirtilmiştir. S. mutans monokültür biyofilmleri için tercih edilen mikroorganizma olmuştur (186-188). Bununla birlikte, tanımlanmış mikrobiyal konsorsiyum bazlı modeller, ekolojik değişiklikleri incelemek için seçilebilir (189). Ağız boşluğu içindeki sert yüzeylerin primer kolonizrlerini olmaları ve bir substrat yüzeyine bağlanan ve büyüyen diğer bakteriler arasında bir bağlantı oluşturmaları sebebiyle, S. mutans ve S. mitis mevcut çalışmada deney suşları olarak seçilmiştir. Ek olarak, S. mutans'lar oral biyofilmlerde ortaya çıkan daha karyojenik suşlardan biri olarak da tanınmaktadır (190). S. mitis biovar 1, solunum sisteminin kommensal mikrobiyotasının tipik bir temsilcisidir. Doğumdan sonra ağız boşluğu ve farinks içindeki birkaç yüzeyi kolonize eder ve yaşam boyunca bu ekosistemlerin sayısal olarak önemli bir yesi olduğuna inanılır (191). Diğer birkaç Streptokok türü gibi, diş minesinin de ilk kolonizasyonuna (192) katılır ve kök yüzey çürüklerinin gelişiminde (193, 194) rol alabilir.

Klinik oral koşulların yeniden retilibilme kapasitesi göz önüne alındığında, çoklu kültür bazlı modeller olarak plakalar, laboratuvar ortamında klinik koşulları taklit etmede dinamik modeller olarak daha az etkili görünmektedir (195). Bu modellerde, bakteriyel üreme, besinlerin sınırlı mevcudiyetinde meydana gelir. Bu durumda bakteri üremesi ağız boşluğundan daha hızlı olup, doğal olmayan bir davranış sergiler (189). Bu fenomen, çoklu kültür çalışmalarına dayanan deneylerin neden karmaşık modellere göre daha kısa sürdüğünü açıklayabilir.

Yapay tükürük besiyeri, mikroorganizmaların özel beslenme ihtiyaçları ve büyümesini destekleyen proteinler, elektrolitler, amino asitler ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler dışındaki takviyeleri içeren, düşük karbonhidrat çözeltisine dayanmaktadır. Wong ve Sissons, tanımlanmamış bir kimyasal kültür ortamını, kimyasal olarak tanımlanmış bir tükürük analoguyla karşılaştırmışlar, doğal tükürüğe daha fazla benzeyen besiyerinin

daha gerçekçi biyofilm büyüme oranlarının elde edilmesine ve beslenme değişkenlerinin plaklar üzerinde daha kolay incelenmesine izin verdiğini bulmuşlardır (196). Dahası, yapay tükürük ortamında azalan karbonhidrat mevcudiyeti, ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmalarda olduğu gibi, sinerjik ve antagonistik metabolik etkileşimleri uyardığı görülmüştür (197). Yapay tükürük ve basitleştirilmiş kültür ortamına ek olarak, bazı çalışmalar, taze işlenmiş tükürüğün dış biyofilminin geliştirilmesinde bir yöntem olarak kullanılmasını da tarif etmiştir (198, 199). Bu yöntemde biyofilm gelişim periyotlarını üretmek için tükürük, santrifüjleme ve pastörizasyon yöntemleri ile işlenerek kullanılır (200). Daha kısa deney süreleri (~ 64 saat) bildirilmiş olmasına rağmen, bir deneyi gerçekleştirmek için büyük miktarda tükürüğün gerekliliği, protokolün zorluk derecesini artırır.

Yapılan bir derlemede yer alan çalışmaların çoğu besin kaynağı olarak sükröz'u kullanmış, ancak monosakarit pulsasyonunu kullanan çalışmaların varlığına dikkat çekilmiştir (201). Monosakaritler potansiyel olarak karyojenik olmasına rağmen (202), özellikle sükröz karyojenik plak oluşumunu destekleyen hücre dışı polisakarit üretimi için enerji sağlayabilir (203). Bu nedenle, sükröz pulsasyonu, in vivo biyofilmler ve dental çürüğü araştıran çalışmalar için tercih edilebilir. Yapılan çalışmada benzer etkiler yaratmak için glikoz kullanılmıştır. KLTM'de yapılan inceleme sonucu 24 saatlik inkübasyon sürecinde *S. mutans*'i, *S. mitis*'e göre daha yaygın ölü hücre alanlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu geçen süre içinde besin kaynaklarının azalmasına bağlanabilir.

KLTM ile bir nesne optik olarak taranır, diğer optik düzlemlerden bulanık bir sinyal alınmadan net görüntüler elde edilir. Tek'li bölümler veya çoklu bölüm serileri, üç boyutlu yeniden yapılanmaya izin verecek şekilde iki boyutlu görüntüler olarak kaydedilir. Bu amaçla, numunenin spesifik olan fluorokromlarla işaretlenmesi gerekir. Ek olarak, otomatik floresan ve yansıma sinyalleri kaydedilebilir. Modern çok kanallı cihazlarda, farklı emisyon sinyallerinin ayrılmasını sağlayan birkaç foto-çoğaltıcı bulunur. Son zamanlarda, artan hassasiyete sahip geliştirilmiş dedektörler önerilmiştir. Cihaz farklı yazılım dili, nokta tarayıcı (yüksek çözünürlük için) veya disk tarayıcı (hareketli nesneler için) olarak mevcuttur. Ek olarak, hibrit sistemler ile her iki özellikten de ödün vermeden bu özellikler sunulmaktadır.

Tek tür bakteri veya bakteri agregalarının tespiti için yaygın bakteri kültürü tekniklerinin yanı sıra, yüzeyle bağlanan mikroorganizmaların fluorojenik boyalarla görselleştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Canlı plaka sayısının ve kültür bazlı tekniklerin dezavantajları, bazı bakterilerin seçimidir. Ayrıca, biyofilmdeki bakterileri tespit etmek için kültürleme tekniklerinin hazırlanması, desorpsiyon prosedürleri ve sonuçları önemli ölçüde etkileyebilecek agar plakaları üzerine dağılmasını gerektirir(204). Oral bakteriyel floranın % 50'sinden fazlası ekilebilir değildir(205). Bu nedenle, fizyolojik adezyon durumlarında bakterilerin doğrudan görselleştirilmesi ve nitelendirilmesi için basit yöntemler daha uygundur. Bu, floresan boyama teknikleriyle ve ardından floresan mikroskopik analizle mümkündür (206, 207). Syto 17 veya Syto 9 green gibi diğer canlı / ölü boyalardan olup, DNA veya RNA'yla etkileşime dayanır (208). Bu boyalar, sağlam membranlara nüfuz edebilme yeteneğine sahip olup, canlı hücre floresans mikroskopisi için hücre çekirdeği ve kromatinini yansıtır (208). Propidium iyodür (PI) yalnızca ölü hücrelerin hasar görmüş zarlarına nüfuz eder. Boyanan hücrelerin geçirgenlik bariyerinin kaybı, onarılamaz hasarı ve dolayısıyla hücre ölümünü temsil eder. Hedef alanlarına ve hücreye nüfuz etme biçimine göre çeşitlenen geniş floresan bazlı boyalar, genel bir bakış elde etmeyi ve her alanda uygulamayı zorlaştırır. Eksitasyon ve emisyon spektrumundaki farklılıklar yanı sıra, boyaların farklı yüzdelerde kolay geçişi nedeniyle canlı ve ölü bakteri dağılımına yol açtığı görülmektedir(209, 210).

Bakteriler büyük öneme sahip tek hücreli mikroorganizma grubudur. Antibiyotik duyarlılığında, toksikoloji testlerinde, gıda güvenliğinin değerlendirilmesinde ve fermantasyon üretimi dahil birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (211). Bu işlem sırasında bakteri sayımı her zaman üretim kalitesini ve verimliliğini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle, bakteri sayımı yaygın olarak önemli bir gösterge olarak kabul edilmiştir. Plaka sayımına dayanan geleneksel bakteri sayma yöntemleri, zaman alıcı ve yorucu prosedürler nedeniyle, mikrobiyal tespitinin gerekliliklerini ideal olarak karşılayamamaktadır.

Bu ihtiyaç sebebiyle, enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) (212), Taqman gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (213), floresans analizi (214) ve flow sitometrisi gibi sayım yöntemleri geliştirilmiştir (215). Birçok yeni sayım metodu, toplam tahlil süresini ve sinyallerin daha da büyütülmesini sağlamak için

kullanılmaktaysa da, bu yöntemler pahalı sarf malzemeleri, aparatlar ve test başına yüksek maliyetler gerektirmektedir (216). Zaman kazandıran ve düşük maliyetli bakteri sayma yönteminin araştırılması hala büyük önem taşımaktadır.



6.SONUÇ

Yapılan bu in vitro çalışmanın sınırlamaları dahilinde, yüzey özelliklerindeki farklılıklara rağmen, biyofilm oluşumunda istatistiksel olarak bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Elde edilen verilere göre şu sonuçlara varılmıştır;

1. Yüzey pürüzlüğünün bulguları sonucu tüm materyaller eşik değer olarak kabul edilen $R_a < 0.2 \mu\text{m}$ 'nin altında bulunmuştur. Buna rağmen istatistiksel analiz sonucu, kompozit esaslı CAD/CAM bloklarda (LAV, SHF, CER), cam seramik blok (IPS) ve hibrit seramik bloğa (VIT) göre, polisaj prosedürü sonrasında daha pürüzsüz yüzeyler elde edilmiştir. Ancak yüzey topoğrafyasının, test edilen bakterilerin adezyonunda etkin faktör olarak rol oynadığı görülmüştür.

2. Temas açısı ve yüzey serbest enerjisinin ölçümünde cam seramik ve hibrit seramik bloklar düşük, kompozit esaslı bloklar ise orta ve yüksek hidrofobik özellik sergilemişlerdir.

3. Tüm adherent ve bakteri yüzey farklılıklarına rağmen pelikül'ün, adezyon ve biyofilm oluşumunda etkin rol oynadığı, kısmen de olsa adherent yüzey farklılıklarını eşitlediği, ancak bakteri yüzey özelliklerinde değişken davranışlar sergilemiştir.

Mikrobiyal adezyon ve kolonizasyonu engelleyen veya azaltan özelliklere sahip restoratif materyallerin tasarımı, çağdaş dental materyal biliminde umut verici bir yaklaşım olması yanı sıra, restoratif materyallerde biyofilm oluşumunun, diğer faktörler dışında farklı maddelerin bileşiminden etkilenen yüzey özelliklerine bağlı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu doğrultuda bakteriyel adezyon ve biyofilm oluşumun karmaşık bir prosesi kapsadığı düşünüldüğünde, yüzey özelliklerinin çevresel faktörlerin ve genetik etkileşimlerinin de araştırıldığı klinik verileri de içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Hickel R, Roulet JF, Bayne S, Heintze SD, Mjor IA, Peters M, et al. Recommendations for conducting controlled clinical studies of dental restorative materials. Science Committee Project 2/98--FDI World Dental Federation study design (Part I) and criteria for evaluation (Part II) of direct and indirect restorations including onlays and partial crowns. *J Adhes Dent*. 2007;9 Suppl 1:121-47.
2. Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(4):302-18.
3. Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience. *Dent Mater J*. 2009;28(1):44-56.
4. Ruse ND, Sadoun MJ. Resin-composite blocks for dental CAD/CAM applications. *J Dent Res*. 2014;93(12):1232-4.
5. Coldea A, Swain MV, Thiel N. Mechanical properties of polymer-infiltrated-ceramic-network materials. *Dent Mater*. 2013;29(4):419-26.
6. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*. 2003;7(4):181-8.
7. Schlichting LH, Maia HP, Baratieri LN, Magne P. Novel-design ultra-thin CAD/CAM composite resin and ceramic occlusal veneers for the treatment of severe dental erosion. *J Prosthet Dent*. 2011;105(4):217-26.
8. Kramer N, Kunzelmann KH, Garcia-Godoy F, Haberlein I, Meier B, Frankenberger R. Determination of caries risk at resin composite margins. *Am J Dent*. 2007;20(1):59-64.
9. Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, et al. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*. 2004;25(18):4457-63.
10. de Fucio SB, Puppim-Rontani RM, de Carvalho FG, Mattos-Graner Rde O, Correr-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent*. 2009;22(3):131-6.
11. Manhart J, Chen H, Hamm G, Hickel R. Buonocore Memorial Lecture. Review of the clinical survival of direct and indirect restorations in posterior teeth of the permanent dentition. *Oper Dent*. 2004;29(5):481-508.
12. Demarco FF, Correa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater*. 2012;28(1):87-101.
13. Mormann WH, Brandestini M, Lutz F, Barbakow F. Chairside computer-aided direct ceramic inlays. *Quintessence Int*. 1989;20(5):329-39.
14. Andersson M, Carlsson L, Persson M, Bergman B. Accuracy of machine milling and spark erosion with a CAD/CAM system. *J Prosthet Dent*. 1996;76(2):187-93.
15. Blatz MB, Conejo J. The Current State of Chairside Digital Dentistry and Materials. *Dent Clin North Am*. 2019;63(2):175-97.
16. Braden M, Brown D, Miller M, Causton BE, Tranter TC, Combe EC, et al. Dental materials: 1977 literature review. Part II. *J Dent*. 1980;8(1):43-67.
17. Ferracane JL, Hilton TJ. Polymerization stress--is it clinically meaningful? *Dent Mater*. 2016;32(1):1-10.

18. Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater.* 2013;29(2):139-56.
19. Ferracane JL, Condon JR. Post-cure heat treatments for composites: properties and fractography. *Dent Mater.* 1992;8(5):290-5.
20. Calheiros FC, Daronch M, Rueggeberg FA, Braga RR. Effect of temperature on composite polymerization stress and degree of conversion. *Dent Mater.* 2014;30(6):613-8.
21. Nguyen JF, Migonney V, Ruse ND, Sadoun M. Resin composite blocks via high-pressure high-temperature polymerization. *Dent Mater.* 2012;28(5):529-34.
22. Ferracane JL, Mitchem JC, Condon JR, Todd R. Wear and marginal breakdown of composites with various degrees of cure. *J Dent Res.* 1997;76(8):1508-16.
23. Lin-Gibson S, Sung L, Forster AM, Hu H, Cheng Y, Lin NJ. Effects of filler type and content on mechanical properties of photopolymerizable composites measured across two-dimensional combinatorial arrays. *Acta Biomater.* 2009;5(6):2084-94.
24. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater.* 2011;27(8):723-47.
25. Sedda M, Papacchini F, Salonna P, Borracchini A, Ferrari M. Effect of post-cure heating on the flexural strength of two indirect resin composites. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2010;18(3):102-6.
26. Bagis YH, Rueggeberg FA. The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dent Mater.* 2000;16(4):244-7.
27. Li Y, Swartz ML, Phillips RW, Moore BK, Roberts TA. Effect of filler content and size on properties of composites. *J Dent Res.* 1985;64(12):1396-401.
28. Turssi CP, Ferracane JL, Vogel K. Filler features and their effects on wear and degree of conversion of particulate dental resin composites. *Biomaterials.* 2005;26(24):4932-7.
29. Cetin AR, Unlu N. Clinical wear rate of direct and indirect posterior composite resin restorations. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32(3):e87-94.
30. Nguyen JF, Migonney V, Ruse ND, Sadoun M. Properties of experimental urethane dimethacrylate-based dental resin composite blocks obtained via thermopolymerization under high pressure. *Dent Mater.* 2013;29(5):535-41.
31. Zaruba M, Mehl A. Chairside systems: a current review. *Int J Comput Dent.* 2017;20(2):123-49.
32. Chochlidakis KM, Papaspyridakos P, Geminiani A, Chen CJ, Feng IJ, Ercoli C. Digital versus conventional impressions for fixed prosthodontics: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent.* 2016;116(2):184-90 e12.
33. Gallardo YR, Bohner L, Tortamano P, Pigozzo MN, Lagana DC, Sesma N. Patient outcomes and procedure working time for digital versus conventional impressions: A systematic review. *J Prosthet Dent.* 2018;119(2):214-9.
34. Belli R, Wendler M, de Ligny D, Cicconi MR, Petschelt A, Peterlik H, et al. Chairside CAD/CAM materials. Part 1: Measurement of elastic constants and microstructural characterization. *Dent Mater.* 2017;33(1):84-98.
35. WF S. Principles of materials science and engineering. 1996;3rd ed.
36. W H. Biocompatible and bioactive glass-ceramics—state of the art and new directions. *J Non-Cryst Sol.* 1997; 219:192-7.
37. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater.* 2011;27(1):29-38.

38. Mainjot AK, Dupont NM, Oudkerk JC, Dewael TY, Sadoun MJ. From Artisanal to CAD-CAM Blocks: State of the Art of Indirect Composites. *J Dent Res*. 2016;95(5):487-95.
39. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2002;23(8):1819-29.
40. Awada A, Nathanson D. Mechanical properties of resin-ceramic CAD/CAM restorative materials. *J Prosthet Dent*. 2015;114(4):587-93.
41. Swain MV, Coldea A, Bilkhair A, Guess PC. Interpenetrating network ceramic-resin composite dental restorative materials. *Dent Mater*. 2016;32(1):34-42.
42. Ramos Nde C, Campos TM, Paz IS, Machado JP, Bottino MA, Cesar PF, et al. Microstructure characterization and SCG of newly engineered dental ceramics. *Dent Mater*. 2016;32(7):870-8.
43. Holand W, Rheinberger V, Apel E, van 't Hoen C, Holand M, Dommann A, et al. Clinical applications of glass-ceramics in dentistry. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):1037-42.
44. Wendler M, Belli R, Petschelt A, Mevec D, Harrer W, Lube T, et al. Chairside CAD/CAM materials. Part 2: Flexural strength testing. *Dent Mater*. 2017;33(1):99-109.
45. Holand W, Schweiger M, Watzke R, Peschke A, Kappert H. Ceramics as biomaterials for dental restoration. *Expert Rev Med Devices*. 2008;5(6):729-45.
46. Maunula H, Hjerppe J, Lassila LLV, Narhi TO. Optical Properties and Failure Load of Thin CAD/CAM Ceramic Veneers. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2017;25(2):86-92.
47. Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008;24(3):299-307.
48. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:7-15.
49. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011;3(2):55-65.
50. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-22.
51. Dufour D, Levesque CM. Bacterial behaviors associated with the quorum-sensing peptide pheromone ('alarmone') in streptococci. *Future Microbiol*. 2013;8(5):593-605.
52. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*. 2009;88(11):982-90.
53. Marsh PD. Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J*. 2012;212(12):601-6.
54. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burlinson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*. 2013;7(5):1016-25.
55. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006;94(1):1-9.
56. Scheie AA, Petersen FC. The Biofilm Concept: Consequences for Future Prophylaxis of Oral Diseases? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):4-12.
57. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-80.

58. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent.* 2003;28(1):47-52.
59. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):16-35.
60. Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2005;73(10):6923-34.
61. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18.
62. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling.* 2003;19(2):139-50.
63. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012;6(1):46-56.
64. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89(1):8-18.
65. Ling Z, Kong J, Jia P, Wei C, Wang Y, Pan Z, et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microb Ecol.* 2010;60(3):677-90.
66. Roberts AP, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(12):1441-50.
67. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
68. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000;79(1):21-7.
69. Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(3):311-23.
70. Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:67-84.
71. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.
72. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17 Suppl 2:68-81.
73. Morra M, Cassinelli C. Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1997;9(1):55-74.
74. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23(2):179-230.
75. Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1983;46(1):90-7.
76. van Loosdrecht MC, Norde W, Zehnder AJ. Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomater Appl.* 1990;5(2):91-106.
77. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev.* 1990;54(1):75-87.

78. van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. *J Chromatogr.* 1986;376:111-9.
79. Liu Y, Zhao Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophys Chem.* 2005;117(1):39-45.
80. Barton AJ, Sagers RD, Pitt WG. Measurement of bacterial growth rates on polymers. *J Biomed Mater Res.* 1996;32(2):271-8.
81. Badihi Hauslich L, Sela MN, Steinberg D, Rosen G, Kohavi D. The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24 Suppl A100:49-56.
82. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazzon M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta Biomater.* 2010;6(10):3824-46.
83. Ionescu A, Wutscher E, Brambilla E, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Hahnel S. Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm development. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(5):458-65.
84. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(2):169-78.
85. Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 2011;36(5):347-55.
86. Xing R, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Taxt-Lamolle S, Haugen HJ. The influence of surface nanoroughness, texture and chemistry of TiZr implant abutment on oral biofilm accumulation. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(6):649-56.
87. Lin HY, Liu Y, Wismeijer D, Crielaard W, Deng DM. Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(5):1226-31.
88. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012;91(12):1110-8.
89. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.
90. Poncin-Epaillard F, Herry JM, Marmey P, Legeay G, Debarnot D, Bellon-Fontaine MN. Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface--a potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1152-61.
91. Siegismund D, Undisz A, Germerodt S, Schuster S, Rettenmayr M. Quantification of the interaction between biomaterial surfaces and bacteria by 3-D modeling. *Acta Biomater.* 2014;10(1):267-75.
92. Busscher HJ, Norde W, van der Mei HC. Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(9):2559-64.
93. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res.* 2010;89(7):657-65.
94. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995;22(1):1-14.

95. Ono M, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J, et al. Surface properties of resin composite materials relative to biofilm formation. *Dent Mater J*. 2007;26(5):613-22.
96. Ruttermann S, Bergmann N, Beikler T, Raab WH, Janda R. Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials. *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1512-21.
97. Song F, Koo H, Ren D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J Dent Res*. 2015;94(8):1027-34.
98. Cazzaniga G, Ottobelli M, Ionescu A, Garcia-Godoy F, Brambilla E. Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. *Am J Dent*. 2015;28(6):311-20.
99. Abu-Bakr N, Han L, Okamoto A, Iwaku M. Evaluation of the surface roughness of compomer by laser scanning microscopy. *Dent Mater J*. 2001;20(2):172-80.
100. Zhao Q, Liu Y, Abel EW. Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films. *J Colloid Interface Sci*. 2004;280(1):174-83.
101. Jonathan M. Schuster CES, Mario R. Rosenberger. Analysis of the results of surface free energy measurement of Ti6Al4V by different methods. *Procedia Materials Science*. 2015;8:732 – 41.
102. Owens DK WR. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci*. 1969;13:1741-7.
103. van Oss CJ CM, Good RJ. Monopolar surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*. 1987.
104. Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*. 2001;22(5):481-7.
105. Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent*. 2001;29(3):197-204.
106. Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods*. 2017;138:50-9.
107. Neu TR, Lawrence JR. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;146:1-51.
108. Aykent F, Yondem I, Ozyesil AG, Gunal SK, Avunduk MC, Ozkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J Prosthet Dent*. 2010;103(4):221-7.
109. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
110. Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8795-801.
111. Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K. Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Res*. 1992;26(6):428-33.
112. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent*. 2000;83(6):664-7.
113. Yilmaz C, Korkmaz T, Demirkoprulu H, Ergun G, Ozkan Y. Color stability of glazed and polished dental porcelains. *J Prosthodont*. 2008;17(1):20-4.

114. de Jager N, Feilzer AJ, Davidson CL. The influence of surface roughness on porcelain strength. *Dent Mater.* 2000;16(6):381-8.
115. Al-Wahadni AM, Martin DM. An in vitro investigation into the wear effects of glazed, unglazed and refinished dental porcelain on an opposing material. *J Oral Rehabil.* 1999;26(6):538-46.
116. Heintze SD, Cavalleri A, Forjanic M, Zellweger G, Rousson V. Wear of ceramic and antagonist--a systematic evaluation of influencing factors in vitro. *Dent Mater.* 2008;24(4):433-49.
117. Kim IJ, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Effect of surface topography on the color of dental porcelain. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14(5):405-9.
118. Martinez-Gomis J, Bizar J, Anglada JM, Samsó J, Peraire M. Comparative evaluation of four finishing systems on one ceramic surface. *Int J Prosthodont.* 2003;16(1):74-7.
119. Al-Shammery HA, Bubb NL, Youngson CC, Fasbinder DJ, Wood DJ. The use of confocal microscopy to assess surface roughness of two milled CAD-CAM ceramics following two polishing techniques. *Dent Mater.* 2007;23(6):736-41.
120. Kou W, Molin M, Sjogren G. Surface roughness of five different dental ceramic core materials after grinding and polishing. *J Oral Rehabil.* 2006;33(2):117-24.
121. Bourke BM, Rock WP. Factors affecting the shear bond strength of orthodontic brackets to porcelain. *Br J Orthod.* 1999;26(4):285-90.
122. Sarac D, Sarac YS, Yuzbasioglu E, Bal S. The effects of porcelain polishing systems on the color and surface texture of feldspathic porcelain. *J Prosthet Dent.* 2006;96(2):122-8.
123. Ikeda M, Matin K, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. Effect of surface characteristics on adherence of *S. mutans* biofilms to indirect resin composites. *Dent Mater J.* 2007;26(6):915-23.
124. Sasahara RM, Ribeiro Fda C, Cesar PF, Yoshimura HN. Influence of the finishing technique on surface roughness of dental porcelains with different microstructures. *Oper Dent.* 2006;31(5):577-83.
125. Rashid H. The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: A review of literature. *Eur J Dent.* 2014;8(4):571-9.
126. Gadelmawla ES KM, Maksoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness parameters. *J Mater Res Tech.* 2002;123:133-45.
127. Flury S, Lussi A, Zimmerli B. Performance of different polishing techniques for direct CAD/CAM ceramic restorations. *Oper Dent.* 2010;35(4):470-81.
128. Glavina D, Skrinjaric I, Mahovic S, Majstorovic M. Surface quality of Cerec CAD/CAM ceramic veneers treated with four different polishing systems. *Eur J Paediatr Dent.* 2004;5(1):30-4.
129. Hulterstrom AK, Bergman M. Polishing systems for dental ceramics. *Acta Odontol Scand.* 1993;51(4):229-34.
130. Anusavice KJ, Lee RB. Effect of firing temperature and water exposure on crack propagation in unglazed porcelain. *J Dent Res.* 1989;68(6):1075-81.
131. Fasbinder DJ, Neiva GF. Surface Evaluation of Polishing Techniques for New Resilient CAD/CAM Restorative Materials. *J Esthet Restor Dent.* 2016;28(1):56-66.
132. Marghalani HY. Effect of finishing/polishing systems on the surface roughness of novel posterior composites. *J Esthet Restor Dent.* 2010;22(2):127-38.
133. de Oliveira AL, Domingos PA, Palma-Dibb RG, Garcia PP. Chemical and morphological features of nanofilled composite resin: influence of finishing and polishing procedures and fluoride solutions. *Microsc Res Tech.* 2012;75(2):212-9.

134. HASHIMOTO K YH. Influence of composite resin components on adherence of oral streptococci. *Jpn J Conservative Dent Clin North Am.* 1998;1-15.
135. Yap AU, Yap SH, Teo CK, Ng JJ. Finishing/polishing of composite and compomer restoratives: effectiveness of one-step systems. *Oper Dent.* 2004;29(3):275-9.
136. Sarac D, Sarac YS, Kulunk S, Ural C, Kulunk T. The effect of polishing techniques on the surface roughness and color change of composite resins. *J Prosthet Dent.* 2006;96(1):33-40.
137. Choi MS, Lee YK, Lim BS, Rhee SH, Yang HC. Changes in surface characteristics of dental resin composites after polishing. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(4):347-53.
138. Goryainova KE, Morokov ES, Retinskaja MV, Rusanov FS, Apresyan SV, Lebedenko IY. The Micromorphological Research of the Internal Structure of Chairside CAD/CAM Materials by the Method of Scanning Impulse Acoustic Microscopy (SIAM). *Open Dent J.* 2018;12:125-32.
139. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol.* 1990;17(3):138-44.
140. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997;13(4):258-69.
141. Dezelic T, Guggenheim B, Schmidlin PR. Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health Prev Dent.* 2009;7(1):47-53.
142. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dental materials with antibiofilm properties. *Dent Mater.* 2014;30(2):e1-16.
143. Ionescu A, Brambilla E, Wastl DS, Giessibl FJ, Cazzaniga G, Schneider-Feyrer S, et al. Influence of matrix and filler fraction on biofilm formation on the surface of experimental resin-based composites. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):5372.
144. Hannig C, Hannig M. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):123-39.
145. Flausino JS SP, Carvalho VF, Magalhães D, Da Silva WM, Costa, HL SC. Biofilm formation on different materials for tooth restoration: Analysis of surface characteristics. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;49:6820-9.
146. Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials.* 2003;24(20):3605-9.
147. Takahashi Y, Imazato S, Russell RR, Noiri Y, Ebisu S. Influence of resin monomers on growth of oral streptococci. *J Dent Res.* 2004;83(4):302-6.
148. Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The effects of surface roughness of composite resin on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Oper Dent.* 2012;37(5):532-9.
149. Pereira CA, Eskelson E, Cavalli V, Liporoni PC, Jorge AO, do Rego MA. *Streptococcus mutans* biofilm adhesion on composite resin surfaces after different finishing and polishing techniques. *Oper Dent.* 2011;36(3):311-7.
150. Hahnel S, Rosentritt M, Burgers R, Handel G. Adhesion of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 to artificial teeth: an in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2008;100(4):309-15.

151. Jendresen MD, Glantz PO. Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in-vivo study. *Acta Odontol Scand.* 1981;39(1):39-45.
152. Meier R, Hauser-Gerspach I, Luthy H, Meyer J. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(10):3249-53.
153. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Chen Y, de Vries J, Ren Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(4):419-26.
154. Hannig M. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(1):55-64.
155. Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(5):1428-35.
156. Wyatt JE, Hesketh LM, Handley PS. Lack of correlation between fibrils, hydrophobicity and adhesion for strains of *Streptococcus sanguis* biotypes I and II. *Microbios.* 1987;50(202):7-15.
157. Pereni CI, Zhao Q, Liu Y, Abel E. Surface free energy effect on bacterial retention. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006;48(2):143-7.
158. Marmur A. Underwater superhydrophobicity: theoretical feasibility. *Langmuir.* 2006;22(4):1400-2.
159. Yu P, Wang C, Zhou J, Jiang L, Xue J, Li W. Influence of Surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of *Streptococcus mutans* to Zirconia In Vitro. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8901253.
160. Gusnaniar N, van der Mei HC, Qu W, Nuryastuti T, Hooymans JMM, Sjollemma J, et al. Physico-chemistry of bacterial transmission versus adhesion. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;250:15-24.
161. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier JJ, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials--an in vitro study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2004;39(4):199-205.
162. Grivet M, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11(10):637-42.
163. Knorr SD, Combe EC, Wolff LF, Hodges JS. The surface free energy of dental gold-based materials. *Dent Mater.* 2005;21(3):272-7.
164. Lee SP, Lee SJ, Lim BS, Ahn SJ. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *Angle Orthod.* 2009;79(2):353-60.
165. Tanner J, Robinson C, Soderling E, Vallittu P. Early plaque formation on fibre-reinforced composites in vivo. *Clin Oral Investig.* 2005;9(3):154-60.
166. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137(4):489-95; discussion 13A.
167. van Pelt AW, Weerkamp AH, Uyen MH, Busscher HJ, de Jong HP, Arends J. Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49(5):1270-5.
168. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 1984;48(5):980-3.
169. Mei L, Busscher HJ, van der Mei HC, Ren Y. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. *Dent Mater.* 2011;27(8):770-8.

170. Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen ST. Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria in vivo. *J Bacteriol.* 1968;96(1):242-9.
171. Gibbons RJ, Qureshi JV. Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms. *Infect Immun.* 1978;22(3):665-71.
172. Levine MJ, Herzberg MC, Levine MS, Ellison SA, Stinson MW, Li HC, et al. Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1978;19(1):107-15.
173. Ericson T, Rundegren J. Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem.* 1983;133(2):255-61.
174. Ericson D, Bratthall D, Bjorck L, Myhre E, Kronvall G. Interactions between human serum proteins and oral streptococci reveal occurrence of receptors for aggregated beta 2-microglobulin. *Infect Immun.* 1979;25(1):279-83.
175. Douglas CW, Russell RR. The adsorption of human salivary components to strains of the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1984;29(10):751-7.
176. Douglas CW. The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol.* 1983;28(7):567-73.
177. BEIGHTON D. The Influence of Saliva on the Hydrophobic Surface Properties of Bacteria Isolated from Oral Sites of Macaque Monkeys. *FEMS Microbiol Lett* 1984:239-42
178. Ruttermann S, Trellenkamp T, Bergmann N, Raab WH, Ritter H, Janda R. A new approach to influence contact angle and surface free energy of resin-based dental restorative materials. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1160-5.
179. Della Volpe C SS. Acid-base surface free energies of solids and the definition of scales in the Good-van Oss-Chanudhury theory *J Adhes Sci Technol* 2000;14:235-72.
180. Rosenberg M, Judes H, Weiss E. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect Immun.* 1983;42(2):831-4.
181. Yamanaka-Okada A, Sato E, Kouchi T, Kimizuka R, Kato T, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2008;49(3):107-12.
182. Absolom DR, Zingg W, Neumann AW. Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *J Biomed Mater Res.* 1987;21(2):161-71.
183. Lindh L. On the adsorption behaviour of saliva and purified salivary proteins at solid/liquid interfaces. *Swed Dent J Suppl.* 2002(152):1-57.
184. M. HANNIG ADB, R. STIGLER, U. MULLER and S., PROKHOROVA A. *J Nanosci Nanotechnol.* 2004;4:532.
185. Rosengren A, Pavlovic E, Oscarsson S, Krajewski A, Ravaglioli A, Piancastelli A. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials.* 2002;23(4):1237-47.
186. Totiam P, Gonzalez-Cabezas C, Fontana MR, Zero DT. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. *Caries Res.* 2007;41(6):467-73.
187. Diercke K, Lussi A, Kersten T, Seemann R. Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):439-44.

188. Fernandez CE, Tenuta LM, Cury JA. Validation of a Cariogenic Biofilm Model to Evaluate the Effect of Fluoride on Enamel and Root Dentine Demineralization. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146478.
189. McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009;69:99-132.
190. Yoo SY, Park SJ, Jeong DK, Kim KW, Lim SH, Lee SH, et al. Isolation and characterization of the mutans streptococci from the dental plaques in Koreans. *J Microbiol*. 2007;45(3):246-55.
191. Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun*. 2001;69(10):6055-63.
192. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res*. 1990;24(4):267-72.
193. van Houte J, Lopman J, Kent R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. *J Dent Res*. 1994;73(11):1727-34.
194. Bowden GH, Ekstrand J, McNaughton B, Challacombe SJ. Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5(6):346-51.
195. Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol*. 2015;7:26149.
196. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol*. 2001;46(6):477-86.
197. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(5):990-1004.
198. Thurnheer T, van der Ploeg JR, Giertsen E, Guggenheim B. Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. *Caries Res*. 2006;40(2):163-71.
199. Giertsen E, Arthur RA, Guggenheim B. Effects of xylitol on survival of mutans streptococci in mixed-six-species in vitro biofilms modelling supragingival plaque. *Caries Res*. 2011;45(1):31-9.
200. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*. 2001;80(1):363-70.
201. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans M, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017;33(8):661-75.
202. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*. 2000;34(6):491-7.
203. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006;85(10):878-87.
204. Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol*. 2007;52(11):1048-56.
205. 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.
206. Thurnheer T, Gmur R, Giertsen E, Guggenheim B. Automated fluorescent in situ hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque. *J Microbiol Methods*. 2001;44(1):39-47.

207. Al-Ahmad A, Follo M, Selzer AC, Hellwig E, Hannig M, Hannig C. Bacterial colonization of enamel in situ investigated using fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 10):1359-66.
208. Wojcik K, Dobrucki JW. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells--influence on chromatin organization and histone-DNA interactions. *Cytometry A.* 2008;73(6):555-62.
209. Decker EM. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33(3):188-92.
210. Kaprelyants AS, Gottschal JC, Kell DB. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;10(3-4):271-85.
211. Zhihua L, Xuetao H, Jiyong S, Xiaobo Z, Xiaowei H, Xucheng Z, et al. Bacteria counting method based on polyaniline/bacteria thin film. *Biosens Bioelectron.* 2016;81:75-9.
212. Pal T, Pacsa AS, Emody L, Voros S, Selley E. Modified enzyme-linked immunosorbent assay for detecting enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent *Shigella* strains. *J Clin Microbiol.* 1985;21(3):415-8.
213. Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(3):281-9.
214. Maruyama F, Yamaguchi N, Kenzaka T, Tani K, Nasu M. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy. *J Microbiol Methods.* 2004;59(3):427-31.
215. Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(3):1228-32.
216. Luo J, Liu X, Tian Q, Yue W, Zeng J, Chen G, et al. Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food. *Anal Biochem.* 2009;394(1):1-6.