



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**6-12 YAŞ GRUBU ÇOCUKLARDA KROMOJEN  
BAKTERİLERE BAĞLI SİYAH DIŞSAL RENKLENMELERİN  
BİYOKİMYASAL VE MİKROBİYOLOJİK OLARAK  
İNCELENMESİ**

AYSUN GARAN  
DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Serap AKYÜZ

İSTANBUL-2009

## **BEYAN**

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

12.12.2009

Aysun GARAN

## TEŞEKKÜR

Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince varlığı ve bilgisi ile bize güven veren, Pedodonti eğitimimizi en iyi şekilde almamız için gerekli ortam ve şartları hazırlayan, sabrını, iyi niyetini ve desteğini bizden hiç esirgemeyen, değerli hocam Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı ve M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya, Doktora eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında büyük bir titizlikle bana yardımcı olan ve yol gösteren; her konuda anlayış, hoşgörü içinde desteğini hissettiğim danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ**'e,

Doktora öğrenciliğim boyunca Pedodonti'nin esaslarını öğreten ve beni yetiştiren değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Lale DÜZDAR**, **Prof. Dr. Ali MENTEŞ** ve **Prof. Dr. Betül KARGÜL**'e, **Yrd.Doç.Dr. Sertaç PEKER**'e, **Yrd.Doç.Dr. Nida HÜROĞLU**'na, **Yrd.Doç.Dr. Işıl KALYONCU**'ya, **Yrd.Doç.Dr. Eda HAZNEDAROĞLU**'na, **Dr. Figen EREN**'e,

Tez izleme komitemde bulunmasından onur duyduğum, daima motive edici tavrı ile çalışmama olumlu katkıları bulunan değerli hocam Y.Ü Diş Hek. Fak. Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Nüket SANDALLI**'ya

Tez çalışmamın mikrobiyolojik kısmındaki uygulamalar ve değerlendirmeler konusundaki yardım ve desteğinden dolayı değerli hocam, İ.Ü. Diş Hek. Fak. Mikrobiyoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın **Prof.Dr. Güven KÜLEKÇİ**'ye,

Dental plak örneklerimin RT-PCR ile inceleme öncesi ve sırasında sağladığı kolaylıklar ve desteklerinden ötürü başta değerli hocam İ.Ü Tıp Fak. İmmünoloji-Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın **Prof. Dr. Selim BADUR**'a , **DETAM** ve **PCR** laboratuvarı çalışanlarına,

Sosyal ve akademisyen kimliği ile daima örnek aldığım ve alacağım, mikrobiyoloji ile ilgili değerli bilgi ve çevresini benimle paylaşan ve bu çalışmanın ortaya çıkmasına katkıda bulunan sevgili babam, değerli hocam, D.Ü.Tıp Fak.Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Eralp ARIKAN**'a

Çalışmamda tükürük biyokimyası ile ilgili her türlü bilgi ve deneyimini ihtiyaç duyduğum her an benimle paylaşan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Ayşen YARAT**'a ve bazı tükürük analizlerinin yapılmasında yardımını esirgemeyen Sayın **Dr. Leyla KOÇ ÖZTÜRK**'e

Bakteri suşlarının siparişinden, dental plak örneklerinin RT-PCR ile kantitasyonuna kadar geçen uzun çalışma sürecinde, büyük bir titizlikle çalıştığı ve her basamağı sabırla öğrettiği

için Elips Sağlık Ürünleri Ltd. Sti. uygulama uzmanı Sayın **Mükerrem AKAYDIN'a, Roche Diagnostik'ten Alper İŞERİ'ne ve Diyarmed'e**

Tez çalışmamın biyokimyasal araştırma kısmındaki ICP-AES analizlerini tüm içtenliğiyle gerçekleştiren Dicle Üni. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü Araş. Gör. Sayın **Dr.Ersin KILIÇ'a**

Tez çalışmamın istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın **Ebru OSMANOĞLU'NA** Akademik hayatın kapılarını aralamama vesile olan, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili yengem, değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Ayla ARIKAN'a**

Pedodonti konusunda kendisinden çok şey öğrendiğim **Yrd.Doç.Dr. Özgür Önder KUŞÇU** başta olmak üzere, doktora eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım **tüm asistan arkadaşlarıma ve Bahtışen ÜRER'e**

Yaşamım boyunca elde ettiğim tüm değer ve başarıların mimarı, varlığımı borçlu olduğum, teşekkürlerin yetmeyeceği canım anneciğim ve babacığım **Canan ve Eralp ARIKAN'a** ve kardeşim **Aycan TUNCER'e**

Soyadlarını taşımaktan onur duyduğum, tez çalışmam boyunca sağladıkları çalışma ortamı ve motivasyonu için **Mevlüde ve Mahmut GARAN'a** , **Sibel ÖLMEZ'e** ve **Salih ŞEKER'e**

Tez çalışmamın ne anlama geldiğini bilmeseler de bitmesini en çok isteyen, varlıklarından daima güç aldığım prenseslerim, **İdil'im ve Beren'ime**

Ve...Her anımda yanımda olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da sabırla yanımda olan, desteği ve sevgisini her zaman hissettiğim, sevgili eşim **Serdar GARAN'a**

En içten teşekkürlerimi sunuyorum...

# İÇİNDEKİLER

BEYAN

|  |          |
|--|----------|
| TEŞEKKÜR.....  | iii      |
| İÇİNDEKİLER .....  | v        |
| KISALTMALAR ve SİMGELER .....  | viii     |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....   | ix       |
| RESİMLER LİSTESİ .....   | xi       |
| TABLolar LİSTESİ.....  | xii      |
| <b>1. ÖZET</b> .....   | <b>1</b> |
| <b>2. SUMMARY</b> .....  | <b>2</b> |
| <b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....  | <b>3</b> |
| <b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....   | <b>5</b> |
| 4.1. Renklenme .....   | 5        |
| 4.1.1. İçsel renklenmeler .....  | 6        |
| 4.1.1.1. Sistemik faktörlere bağlı içsel renklenmeler.....             | 6        |
| 4.1.1.2. Lokal faktörlere bağlı içsel renklenmeler .....               | 8        |
| 4.1.2. Dışsal renklenmeler.....  | 8        |
| 4.1.2.1. Direkt dışsal renklenme (metalik kaynaklı olmayan) .....      | 9        |
| 4.1.2.2. İndirekt renklenme (metalik kaynaklı).....                    | 12       |
| 4.1.3. İnternalized renklenme.....                                     | 12       |
| 4.1.4. Renklenme Tedavisi.....   | 13       |
| 4.1.5. Dışsal renklenmelerin tanısında kullanılan skala-indeksler..... | 14       |
| 4.2. Tükürük.....  | 15       |
| 4.2.1. Tükürük eser elementleri .....                                  | 16       |
| 4.2.1.1. Eser elementlerin analizinde kullanılan yöntemler .....       | 17       |
| 4.2.1.2. İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP).....            | 17       |
| 4.2.1.3. ICP-AES.....  | 18       |
| 4.2.2. Tükürüğün görevleri .....                                       | 20       |
| 4.2.3. Tükürük toplama yöntemleri.....                                 | 20       |
| 4.2.3.1. Uyarımsız tükürük toplama.....                                | 20       |
| 4.2.3.2. Uyarımlı tükürük toplama .....                                | 20       |
| 4.2.3.3. Çalkalama ile tükürük toplama .....                           | 20       |
| 4.2.4. Tükürük akış hızı (TAH).....                                    | 20       |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.5. Tükürük pH'sı.....   | 20        |
| 4.2.5.1. İndikatör ile pH tayini .....                                    | 22        |
| 4.2.5.2. Elektriksel yol ile tayini .....                                 | 22        |
| 4.2.6. Tükürük tamponlama kapasitesi (TTK).....                           | 22        |
| 4.2.6.1. Ericsson Yöntemi .....   | 23        |
| 4.2.6.2. Dentobuff Strip Yöntemi .....                                    | 23        |
| 4.3. Ağız mikroflorası ve mikrobiyal dental plak .....                    | 24        |
| 4.3.1. Pelikül (Kazanılmış pelikül) .....                                 | 25        |
| 4.3.2. Mikrobiyal dental plak (MDP).....                                  | 26        |
| 4.3.2.1. Mikrobiyal dental plak oluşum mekanizması .....                  | 26        |
| 4.3.3. Primer bakteri kolonileri .....                                    | 27        |
| 4.3.3.1. Streptococcus spp.....   | 29        |
| 4.3.3.2. Actinomyces spp. ....  | 31        |
| 4.3.3.3. Veillonella spp .....  | 34        |
| 4.3.4. Mikrobiyal dental plak ve bakteri tutunması (Aderans) .....        | 34        |
| 4.3.5. Mikrobiyal dental plak ve diş çürüğü .....                         | 35        |
| 4.4. Oral patojenlerin saptanmasında kullanılan yöntemler.....            | 36        |
| 4.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) (PCR)..... | 37        |
| 4.4.2. PCR'nin temel bileşenleri .....                                    | 38        |
| 4.4.3. Real Time PCR (RT-PCR).....  | 40        |
| 4.4.4. RT-PCR'nin Kültür Yöntemine Göre Sağladığı Avantajlar .....        | 40        |
| <b>5. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>  | <b>42</b> |
| 5.1. Ağız içi muayene .....   | 43        |
| 5.2. Tükürük örneklerinin toplanması.....                                 | 43        |
| 5.2.1. Tükürük akış hızı ölçümü .....                                     | 44        |
| 5.2.2. Tükürük pH' sının tayini.....                                      | 45        |
| 5.2.3. Tükürük tamponlama kapasitesinin tayini .....                      | 45        |
| 5.3. Tükürük örneklerinin ICP-AES ile analizi.....                        | 45        |
| 5.4. Dental plak örneklerinin toplanması .....                            | 49        |
| 5.5. Dental plak örneklerinin mikrobiyolojik analizi.....                 | 49        |
| 5.5.1. Dental plak örneklerinin homojenizasyonu .....                     | 50        |
| 5.5.2. ATCC suşlarının çoğaltımı ve PCR için hazırlanması.....            | 50        |
| 5.5.2.1. ATCC suşlarının uygun koşullarda çoğaltımı.....                  | 51        |
| 5.5.2.2. ATCC suşlarının DNA izolasyonu .....                             | 51        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.5.3. Standartların hazırlanması.....  | 52         |
| 5.5.4. Real Time PCR analizi.....   | 52         |
| 5.5.4.1. RT-PCR çalışma protokolü.....  | 52         |
| 5.5.4.2. Master mix'in hazırlanması .....   | 53         |
| 5.5.4.3. PCR karışımının hazırlanması .....   | 53         |
| 5.5.4.4. Kullanılan Primer dizileri.....  | 54         |
| 5.5.4.5. Kullanılan TaqMan (Hidroliz) Probe dizileri.....   | 54         |
| 5.5.4.6. Örneklerin Real-Time PCR ile kantitasyonu .....  | 55         |
| 5.6. İstatistiksel analiz .....   | 59         |
| <b>6. BULGULAR .....</b>  | <b>60</b>  |
| 6.1. Tükürük bulguları .....  | 63         |
| 6.2.Çürük indeksi ve dental plak bulguları .....  | 76         |
| <b>7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....</b>   | <b>88</b>  |
| 7.1. Gereç ve yöntemin tartışması.....  | 89         |
| 7.2. Bulguların tartışması .....  | 95         |
| 7.2.1. Tükürük parametrelerinin yaş, cinsiyet, renklenme ve çürük<br>durumuna göre değerlendirilmesi.....     | 95         |
| 7.2.2. Dental plak parametrelerinin yaş, cinsiyet, renklenme ve çürük<br>durumuna göre değerlendirilmesi..... | 105        |
| 7.2.3.Tükürük ve dental plak bulgularının renklenme derecesine göre<br>değerlendirilmesi .....                | 109        |
| <b>8. KAYNAKLAR .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>9. EKLER.....</b>  | <b>129</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>134</b> |

## KISALTMALAR ve SİMGELER

A. naeslundii: *Actinomyces naeslundii*

A. viscosus: *Actinomyces viscosus*

A.İ: Amelogenesis İmperfekta

AAS: Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

*Actinomyces* spp: *Actinomyces* türleri

AES: Atomik Emisyon Spektrometresi

Ag: Gümüş

ALP: Alkalin fosfataz

ATCC: American Type Culture Collection

Ca: Kalsiyum

Cl: Klor

Cu: Bakır

D.İ: Dentinogenesis imperfekta

dak: Dakika

dNTP: Deoksiribonükleozid trifosfat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

F: Fluor

Fe: Demir

FeS: Ferrik sülfid

Gr(-): Gram negatif

Gr(+): Gram pozitif

H<sub>2</sub>S: Hidrojen sülfür

HCl: Hidroklorik asit

HNO<sub>3</sub>: Nitrik asit

ICP: İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi

ICP-AES: İndüktif Eşleşmiş Plazma ile birleştirilmiş Atomik Emisyon Spektrometre

ICP-MS: İndüktif Eşleşmiş Plazma ile birleştirilmiş Kütle Spektrometresi

K: Potasyum

MDP: Mikrobiyal Dental Plak

Mg: Magnezyum

mg: Miligram



$\mu$ l: Mikrolitre  
ml: Mililitre  
mm<sup>2</sup>: Milimetrekare  
Mn: Manganez  
Na: Sodyum  
NCT: Negatif control  
ng: Nanogram  
P.gingivalis: *Porhyromonas gingivalis*  
P.melaninogenicus: *P.melaninogenicus*  
Pb: Kurşun  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
P: İnorganik fosfor  
PO<sub>4</sub>: Fosfat  
PRP: Prolinden zengin proteinler  
R(-): Siyah dışsal renklenmesi olmayan çocuklar  
R(+): Siyah dışsal renklenmesi olan çocuklar  
RT-PCR: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
S. sanguis: *Streptococcus sanguis*  
S.mutans: *Streptococcus mutans*  
SDR: Siyah Dışsal Renklenme  
TAH: Tükürük Akış Hızı  
Taq: *Thermus aquaticus*  
TTK: Tükürük Tamponlama Kapasitesi  
V.parvula: *Veillonella parvula*  
Zn: Çinko

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Diş renklenmelerinin sınıflaması

Şekil 2: ICP-AES düzeneği

Şekil 3: ICP-AES dedeksiyon limitleri ( $\mu\text{g/L}$ )

Şekil 4: PCR çalışma protokolü

Şekil 5: Çalışma grubu genel dağılımı

Şekil 6: ICP-AES çalışma basamakları

Şekil 7: LightCycler 2.0 iç kısım şematik görüntüsü

Şekil 8: Gruplara göre çürük durumu dağılımı

Şekil 9: Gruplara göre df-t dağılımı

Şekil 10: Gruplara göre tükürük Fe dağılımı

Şekil 11: Gruplara göre tükürük Mn dağılımı

Şekil 12: Gruplara göre tükürük tamponlama kapasitesi dağılımı

Şekil 13: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tükürük Fe dağılımı

Şekil 14: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tükürük Mn dağılımı

Şekil 15: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tükürük tamponlama kapasitesi dağılımı

Şekil 16: Cinsiyete göre tükürük Zn dağılımı

Şekil 17: Cinsiyete göre tükürük tamponlama kapasitesi dağılımı

Şekil 18: Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarının gruplara göre dağılımı

Şekil 19: Dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarının gruplara göre dağılımı

Şekil 20: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarının gruplara göre dağılımı

Şekil 21: R(-) grubundaki çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarının çürük sayısına göre dağılımı

Şekil 22: Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarının yaşa göre dağılımı

Şekil 23: Yaş gruplarına göre DMF-T ve df-t dağılımı

Şekil 24: R (+) grubunda *S.mutans* ile Mn düzeyi ilişki grafiği

Şekil 25: R (-) grubunda *S.mutans* ile Fe ve Mn düzeyi ilişki grafiği

## RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1: Koch indeksine göre 1.derece renklenme
- Resim 2: Koch indeksine göre 2.derece renklenme
- Resim 3: Koch indeksine göre 3.derece renklenme
- Resim 4: Çalışmada kullanılan tükürük toplama aparatı.
- Resim 5: Tükürük toplama
- Resim 6: Tükürük pH indikatörü
- Resim 7: ICP-AES Cihazı (Perkin Elmer Optima 2100 DV)
- Resim 8: MagNA Lyser Green Beads (Roche)
- Resim 9: MagNA Lyser Cihazı (Roche)
- Resim10: Primer-Probe (ATCC)
- Resim11: Örneklerin çalışıldığı biyolojik kabin
- Resim12: Kapiller (LightCycler®Capillaries, Roche)
- Resim13: Kapiller adaptor (LightCycler ® Centrifuge Adapters, Roche)
- Resim14: Santrifüj cihazı (Centrifuge 5804 R, Eppendorf )
- Resim15: Kapillerlerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi
- Resim16: Kapillerlerin RT-PCR cihazına yerleştirilmesi
- Resim17: Standardizasyon eğrisi
- Resim18: Bilgisayarda izlenen analiz sonuçları
- Resim19: Bilgisayarda okunan kantitatif değerler

## TABLolar LİSTESİ

- Tablo 1: Değişik ülkelerin siyah dışsal renklenme ile ilgili prevalans sonuçları
- Tablo 2: Ağız ortamında bulunan mikroorganizmalar
- Tablo 3: Oral streptokok türlerinin sınıflandırması
- Tablo 4: Tanımlanmış *Actinomyces* türlerinin günümüzdeki isimleri
- Tablo 5: ICP-AES ile analizi yapılan elementlere ilişkin kalibrasyon verileri
- Tablo 6: ICP-AES cihazının çalışma şartları
- Tablo 7: Gruplara göre yaş, cinsiyet ve çürük durumunun değerlendirilmesi
- Tablo 8: Renklenme derecesine göre yaş ve cinsiyet değerlendirmesi
- Tablo 9: Tükürük parametrelerinin gruplara göre değerlendirilmesi
- Tablo10: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların, tükürük parametrelerinin gruplara göre değerlendirilmesi
- Tablo11: R(-) gruptaki çocukların tükürük parametrelerinin çürük sayısına göre değerlendirilmesi
- Tablo12 : Tükürük parametrelerinin cinsiyete göre değerlendirilmesi
- Tablo13 : Tükürük parametrelerinin yaş gruplarına göre değerlendirilmesi
- Tablo14 : Tükürük parametrelerinin renklenme derecesine göre değerlendirilmesi
- Tablo15: Dental plakta saptanan bakteri miktarının gruplara göre değerlendirilmesi
- Tablo16: Çürük sayısı 1-5 olan çocukların, dental plak parametrelerinin gruplara göre değerlendirilmesi
- Tablo17: R(-) gruptaki çocukların dental plak parametrelerinin çürük sayısına göre değerlendirilmesi
- Tablo18:Dental plakta saptanan bakteri miktarının yaş gruplarına göre değerlendirilmesi
- Tablo19: Çürük indekslerinin yaş gruplarına göre değerlendirmesi
- Tablo20: Dental plakta saptanan bakteri miktarının cinsiyete göre değerlendirilmesi
- Tablo21: Çürük indekslerinin cinsiyete göre değerlendirmesi
- Tablo22:R(+) grubunda dental plakta saptanan bakteri miktarı ile tükürük parametrelerinin korelasyonu
- Tablo23:R(-) grubunda dental plakta saptanan bakteri miktarı ile tükürük parametrelerinin korelasyonu

## 1. ÖZET

Bu çalışmada, 6-12 yaşları arasındaki çocuklarda görülen kromojen bakterilere bağlı siyah dışsal renklenmenin biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamıza siyah dışsal renklenmesi olan 27, renklenmesi olmayan 18 çocuk dahil edildi. Çürük durumu df-t ve DMF-T indeksine; renklenme derecesi ise Koch indeksine göre yapıldı. Çalışmamız iki kısımda gerçekleştirildi. Birinci kısımda, çocuklardan toplanan uyarımsız tükürük örneklerinde tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi ve pH'nın yanısıra ICP-AES ile tükürükte Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Ca, P analizi yapıldı. İkinci kısımda ise alınan dental plak örnekleri RT-PCR ile mikrobiyolojik olarak incelendi. İstatistiksel analiz için Student-t, Mann Whitney U, Kruskal Wallisve Ki-kare testleri kullanıldı ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ). Siyah dışsal renklenmesi olan çocukların tükürük Fe ve Mn düzeyi, df-t indeksi siyah dışsal renklenmesi olmayan çocuklardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,001$ ;  $p<0,05$ ). Diğer tükürük parametrelerinde, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. Dental plak örneklerinde *S.mutans*, *A.viscosus* ve *A.naeshlundii*'nin RT-PCR ile kantitasyonu yapıldı. *A.naeshlundii* çok az örnekte saptandığından istatistiksel değerlendirmeye katılmadı. Siyah dışsal renklenmesi olan çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* ve *A.viscosus* miktarı renklenmesi olmayan çocuklardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. *S.mutans* ile tükürük Fe ve Mn düzeyi arasında negatif korelasyon saptandı. Tükürük ve dental plak parametrelerinin hiçbirinde renklenme yoğunluğuna göre anlamlı değişiklik bulgulanmadı. Sonuç olarak siyah dışsal renklenmesi olan çocukların daha düşük çürük insidansına sahip olduğu ve adı geçen *Actinomyces* türlerinin siyah dışsal renklenme oluşumunda etkili olmadığı sonucuna varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Dental plak, ICP-AES, RT-PCR, siyah dışsal renklenme, tükürük

## SUMMARY

### **Biochemical and Microbiological Investigation of Black Stain of Children Aged Between 6-12 Years.**

The aim of this study is to investigate the black tooth stain of children aged between 6-12 years biochemically and microbiologically. The study group consisted of 27 children with black stain and 18 children with no stain. A clinical intra-oral examination was done to investigate df-t, DMF-T indices and the severity of black stain according to Koch index. The research was carried out as 2 parts. Flow rate, buffered capacity and pH of unstimulated saliva of children were determined. Also the analysis of elements (Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Ca, P) were done by ICP-AES in the first part of the study. The second part consisted quantitative analysis of *S.mutans*, *A.viscosus* ve *A.naeslundii* in dental plaque specimens with RT-PCR. The results were statistically evaluated using with Student-t, Mann Whitney U, Kruskal Wallis, Chi-square test ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ). Salivary Fe and Mn levels and df-t indices of children with black stain were significantly lower than children with no stain ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ). The children with black stain showed significantly lower plaque levels of *S.mutans* ve *A.viscosus* ( $p < 0,05$ ). A negative correlation was found between *S.mutans* and salivary Fe, Mn levels. There was no statistically significant differences between severity of staining and saliva, plaque parameters. The results of this investigation revealed that children with black stain have low caries experience and might not be associated with *Actinomyces spp.*

**Key Words:** Black stain, dental plaque, ICP-AES, RT-PCR, saliva

## GİRİŞ VE AMAÇ

Diş renklenmeleri, diş hekimliğinde sıkça karşılaşılan klinik ve estetik problemlerden biridir. Etiyoloji, görünüm, kompozisyon , lokalizasyon olarak farklılıklar gösterse de temel olarak iki tip diş renklenmesinden bahsedilmektedir (65,116). Bunlar; dışsal renklenmeler ve içsel renklenmelerdir. Ancak son yıllarda literatüre geçen ‘internalized renklenmeler’ ile bu temel sınıflama biraz daha genişletilmiştir (159,182).

İçsel renklenmeler, mine ve dentinin diş oluşumu veya diş sürmesi sırasında kromojen materyaller tarafından etkilenmesi sonucu oluşur. Bu tür renklenmeler, sistemik ve lokal faktörlere bağlı olarak gelişir. Fenilketonüri, porfiri, eritroblastozis fötalis, talasemi, amelogenesis imperfekta, dentinogenesis imperfekta, fluorozis ve yaşlanmaya bağlı renklenmeler ile tetrasiklin renklenmeleri sistemik faktörler arasında yer alırken ; travma ve pulpa nekrozuna bağlı renklenmeler lokal faktörleri oluşturmaktadır (65,182).

Internalized renklenmeler, diş gelişimini takiben dışsal renklenmenin diş yapısına dahil olduğu renklenme tipi olarak tanımlanmaktadır. Diş aşınması, çürükler ve restoratif materyallerin neden olduğu renklenmelerdir (159,182).

Dışsal renklenmeler, mine yüzeyini tutan metalik veya metalik kaynaklı olmayan renklenmelerdir. Metalik olmayan dışsal renklenmelerin etiyojisinde diyet içeriği, çay-kahve tüketimi, tütün-sigara kullanımı, ağız gargaraları (klorheksidin) ve kromojen bakteriler rol oynamaktadır. Metalik kaynaklı dışsal renklenmelerde ise; demir, bakır, potasyum permanganat, gümüş nitrat gibi metal bileşikleri etkili olmaktadır(65,116,182).

Dışsal renklenmelerin fiziksel özellikleri incelendiğinde fırçalamanın yetersiz olduğu bölgelerde (diş-dişeti sınırı ve ara yüzeyler ) yaygın ya da bölgesel dağılım gösterdiği ve etiyojisine bağlı olarak siyah, kahverengi,yeşil, turuncu ve sarı renklenmelere neden olduğu belirtilmiştir. Dışsal renklenmeleri içsel renklenmelerden ayırt etmede kullanılan en etkin yöntem ‘kazıma testi’ dir (*scratch test*). İçsel renklenmede, renkli alanın kazıma yapılarak uzaklaştırılması söz konusu değildir (116).

Siyah dışsal renklenme (SDR), süt ve sürekli dişlerde görülen, diş eti kenarına paralel seyreden noktasal, ince çizgi ya da geniş bant şeklinde görünümle karakterize dışsal renklenme tipidir(65,182). SDR’nin bakterilerin ürettiği hidrojen sülfür ile

tükürük ve diş eti oluk sıvısındaki demirin reaksiyonu sonucu oluşan ferrik sülfid'den kaynaklandığı düşünülmektedir (130). SDR görülme sıklığı değişik ülkelerde incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmaması nedeniyle yaptığımız ön çalışmamızda SDR görülme sıklığını 18 % olarak saptadık (52).

SDR ile ilgili prevalans çalışmaları mevcut olmakla birlikte; SDR'nin biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelendiği çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bunlar ya tükürük veya dental plak örneklerinin biyokimyasal olarak incelendiği çalışmalardır; ya da dental plak örneklerinde bakteri türünün saptanmasına yönelik mikrobiyolojik çalışmalardır. Ancak ikisinin birlikte değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın amacı, ebeveynlerin artan klinik kaygıları ve konuyla ilgili çalışma sayısının oldukça az olması nedeniyle günümüzde tekrar popüler hale gelen SDR'yi biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelemektir.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Renklenme

Renk, gözle görülebilir dalga boyundaki ışığın, gözümüzde oluşturduğu algılamadır. On milyondan fazla farklı rengi algılama özelliğine sahip olan insanoğlu, kendi dışında de bu renklere 100,000 tanesini ayırdedebilmektedir. Bu ayırım bireyler hatta aynı bireydeki farklı dişler arasında bile değişiklik gösterir (19). Diş rengi, dişlerin optik özelliklerinin bir kombinasyonudur. Işık ile diş arasındaki etkileşim sonucu, ışığın diş geçmesi, yüzeyde yansması, dokularda absorpsiyon ve ışığın dağılması gibi dört farklı olgu gözlenir (122).

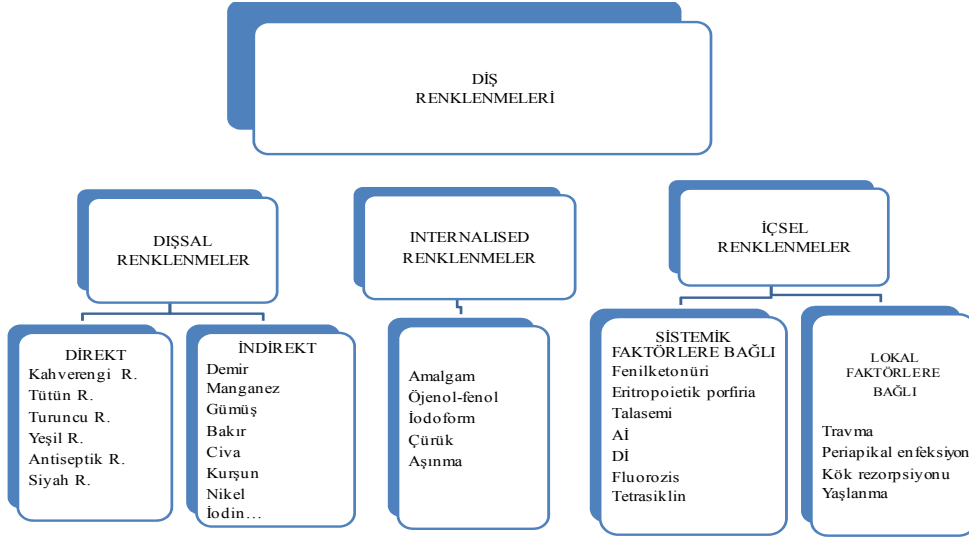
Sağlıklı dişin rengini etkileyen 3 faktör vardır:

- a) Kuru kaplayan mine ve dentinin rengi
- b) Kalsifikasyon derecesine göre değişen mine saydamlığı
- c) Okluzal-insizal kenarda en kalın, servikal 1/3'e doğru incelen mine kalınlığı (36).

Doğal diş rengi dişin kuronunu oluşturan mine, dentin ve pulpasının ışığı emme ve yansıtmasına bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu yapılarda, oluşum sırası veya sonrasında meydana gelebilecek değişiklik ışığın geçirgenlik (**transmission**) özelliklerini etkileyerek renklenmeye yol açar.

Diş renklenmeleri, gerek hasta gerekse hekimlerin üzerinde oldukça fazla zaman ve para harcadıkları kozmetik problemlerin başında gelmektedir. Çünkü hasta ve tüketiciler sağlıklı bir ağız-diş sağlığının yanısıra mükemmel bir gülüşe de sahip olmak isterler. Günümüzde diş beyazlatma ajanlarının tüketiminin hızla artması da bunu doğrular niteliktedir (75,159).

Diş renklenmeleri etiyojisi, görünüm, kompozisyon, lokalizasyon olarak farklılıklar gösterse de temel olarak içsel ve dışsal renklenmeler olmak üzere iki grupta toplanır. Ancak son yıllarda literatüre geçen 'internalized renklenmeler' ile bu temel sınıflama biraz daha genişletilmiştir (116,159,182).



**Şekil 1:** Diş renklenmelerinin sınıflaması

#### 4.1.1. İçsel renklenmeler

Mine ve dentinin diş oluşumu ve sürme sırasında kromojen materyaller tarafından etkilenmesi ile oluşan bu tür renklenmeler, sistemik ve lokal faktörlere bağlı olarak gelişir.

##### 4.1.1.1 Sistemik faktörlere bağlı içsel renklenmeler

**1.Fenilketonüri (Alkaptanuri):** Tirozin ve Fenilalanin gibi bazı aminoasitlerin oksidasyonundaki eksiklik nedeniyle oluşan asit dişlerde renklenme meydana getirir.

**2.Eritroblastozis fötalis:**Yeni doğanda görülen bir kan hastalığı olup doğum sırasında kalsifiye olan dişleri yeşilimsi-mavi, mavimsi-siyah veya kahverengiye boyar. Çocuk büyüdükçe renklenme kendiğiliğinden kaybolur.

**3.Konjenital eritropoietik porfiriya:** Porfirin metabolizmasındaki bozukluk sonucu kemik ve dişlerde hemato porfiri depolanarak dişlerde kırmızı-kahverengi renklenme oluşturur (eritrodonti).

**4.Talasemi:** Akdeniz anemisi olarak da bilinen bu genetik hastalıkta kan pigmentleri dentin tubullerinde birikerek dişlerde renklenmeye neden olur.

**5. Amelogenesis imperfekta (AI):** Süt ve sürekli dişlerde mineyi etkilemesiyle karakterize genetik bir hastalıktır. Bu hastalık hipoplastik, hipokalsifiye, hipomature ve taurodontizm ile beraber gözlenen hipomature-hipoplastik olmak üzere dört tipe ayrılır. Beyazlatma tedavilerine yanıt vermeyen bu tip dişlerde sarıdan kahverengiye değişen renklenmeler gözlenir.

**6. Dentinogenesis imperfekta (DI):** Süt dişlerinin sürekli dişlerden daha çok etkilendiği bu kalıtsal gelişim bozukluğunda mine dentinden kolayca ayrılabilir. Açığa çıkan dentin kanalları yoluyla gıda artıkları ve kromojen bakteriler dişin sarı-kahverengi renklenmesine neden olur.

**7.Mine displazileri:** Displaziler matriks oluşumunu ve kalsifikasyonu etkilerler. Dişlerin gelişim döneminde herhangi bir nedenle oluşan kalsifikasyon defektlerinde dişler sürdükten sonra ağıza giren yiyecek, içecek ve debris birikimi sonucunda oluşan pigmentasyonlara 'Dismineralizasyon' denir. Bunlar opak beyaz lezyonlar (White Spot) veya renklenmeler olabilir.

**8.Fluorozis:** Bir mine displazisidir.Simetrik olarak gözlenen renklenmeler opak noktalar veya olgunun şiddetine göre sarıdan kahverengi şeritlere kadar değişebilir. Mine yüzeyinde kahverengi pigmentasyonlarla kendini belli eden basit fluorozis beyazlatma tedavisine çok iyi yanıt verir.

**9.Tetrasiklin:** 1948 yılında kullanılmaya başlanan 1958 yılında ise dişlerde renklenmelere neden olduğu saptanan Tetrasiklin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Tetrasiklin plasental bariyeri aşabilir. Bu nedenle gebe, emzirenlerde ve en az 7-8 yaşına kadar olan çocuklarda kullanılmamalıdır.

Tetrasiklin renklenmesi gösteren diş güneş ışığı görürse rengi daha da koyulaşır. Bu nedenle kesici dişlerin dudak yüzeyleri kısa sürede gri ve kahverengine dönerken azı dişleri uzun süre sarı olarak kalır. Tetrasiklin renklenmesinin tipik görünümü bantlaşma özelliğine dayanır. Bant yapısının nedeni aralıklı ilaç kullanımına bağlıdır. Tetrasiklin renklenmelerinin şiddeti kullanılan ilacın dozuna, kullanım süresine ve ilacın tipine göre değişebilir (19,36,65,182 ).

#### 4.1.1.2. Lokal faktörlere bağlı içsel renklenmeler

**1. Travma:** Burada başlıca neden pulpa içi kanamalardır. Pulpadaki kanama ile kan pigmentleri dentin kanallarının içerisine girerler. Böylece oluşan renklenme başlangıçta pembe, daha sonra kırmızı- kahverengidir. Eğer pulpa nekroze olmamışsa diş birkaç hafta içinde ana rengine döner.

Pulpanın nekroz olduğu durumlarda ise eritrositler'in hemoliziyle hemoglobinin parçalanarak demir (Fe) açığa çıkar. Nekroza neden olan bakterilerin ürettiği hidrojen sülfür açığa çıkan demir ile birleşerek siyah renkte demir sülfür oluşturur ki bunun sonucunda diş klinikte gri-kahverengi-siyah görünür.

**2. Süt dişi periapikal iltihapları:** Süt dişinin periapikal iltihabı yakınındaki sürekli diş germini etkileyerek displazilere neden olur. 'Turner dişi' olarak adlandırılan bu dişler genelde tek taraflı olup küçük azılarda daha yoğun gözlenir.

**3. Kök rezorpsiyonu:** Pulpal ya da periodontal kaynaklı (içsel ya da dışsal) olabilir. Klinik olarak sıklıkla asemptomatik olup mine sement birleşiminde pembe renkte noktasal lezyon (pink spot) ile karakterizedir.

**4. Yaşlanma:** Yaşla birlikte mine ve dentinin ışığı yansıtma özelliklerindeki değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkar. Dişler daha koyu sarı- kahverengimsi görünüm alır. Nedeni, sekonder ve tersiyer dentin yapımının yaşla orantılı olarak artmasıdır (19,36,65,159,182 ).

#### 4.1.2. Dışsal renklenmeler

Dişin diş yüzeyinin kromojenler tarafından etkilenmesiyle meydana gelir. Mine defektleri, pelikül, tükürük yapısı, tükürük akış hızı ve ağız hijyen eksikliği dışsal renklenmelerde hazırlayıcı faktörlerdir (65).

Dışsal renklenmelerin fiziksel özellikleri incelendiğinde fırçalamanın yetersiz olduğu bölgelerde (diş-dişeti sınırı ve ara yüzeyler ) yaygın ya da bölgesel dağılım gösterdiği ve etiyolojisine bağlı olarak siyah, kahverengi,yeşil, turuncu ve sarı renklenmelere neden olduğu belirtilmiştir. Dışsal renklenmeleri içsel renklenmelerden ayırt etmede kullanılan en etkin yöntem 'kazıma testidir (*scratch test*). İçsel renklenmede, renkli alanın kazıma yapılarak uzaklaştırılması söz konusu değildir (116).

Dışsal renklenmeler her iki dişlenme dönemini (süt-sürekli) etkileyebilir. Çocuklarda görülen dışsal renklenmelerin etiolojisinde kötü ağız hijyeni, demir preparatlarının kullanımı ve kromojen bakteriler (*Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas* türleri) ön plandadır (139,155).

Dışsal renklenme:

- 1-Plaktaki kromojen bakteriler tarafından,
- 2-Renklenmeye neden olabilecek materyalin ağız boşluğu ile teması ve dokuya tutunması ,
- 3-Pelikül içeriğinin kimyasal değişimi sonucu oluşabilir (94).

Dışsal renklenmeler 2 grupta incelenir:

Direkt dışsal renklenme ( Metalik kaynaklı olmayan)

İndirekt dışsal renklenme ( Metalik kaynaklı)

#### **4.1.2.1 Direkt dışsal renklenme (metalik kaynaklı olmayan)**

Kromojenlerin direkt plak ya da kazanılmış pelikula etki ederek oluşturduğu dışsal renklenme tipidir. Etiolojisinde diyet içeriği, tütün, çay, kahve, ağız gargaraları, kromojen bakteriler ve diğer medikamentler yer alır (159,182).

Renklenmeye eğilimi arttıran en önemli unsur protein denaturasyonudur. Denaturasyon işlemi ile yapıdaki sülfat-hidrojen (S-H) bağları koparak sülfat serbestlenir. Gerek klorheksidin ve diğer kimyasal plak önleyici ajanlar gerekse çay, kırmızı şarap gibi tannin içerikli içecekler güçlü denatüranlardır (46).

Direkt dışsal renklenmelerin oluşumundan sorumlu tutulan ferrik sülfid'i inhibe etmek amacıyla klorheksidin ve diğer denatüranlar ile birlikte çinkoasetat, bakır klorid ve krom florid gibi bileşikler kullanılmıştır. Sonuçta çinkoasetatın renklenme üzerinde etkisi olmadığı bildirilmiştir. Ancak diğer 2 bileşiğin redoks tepkimesi sonucu sülfür ile birleşip, ferrik sülfid oluşumunu önlediği, bunun sonucunda renklenmenin azaldığı vurgulanmıştır (41).

#### **Kahverengi dışsal renklenme**

Üst çene büyük azıların yanak yüzeyi ile alt çene kesici dişlerin dil yüzeyinde bakteri içermeyen, ince renkli alanlardır. Çay, kahve gibi içeceklerdeki tannin maddesinin dişlerde birikmesi ile meydana geldiği düşünülmektedir.

### **Tütün renklenmesi**

Tütün, dişlerde servikal 1/3 ile 1/2 oranında koyu kahverengi, siyah renklenmeye yol açar. Renklenmenin yoğunluğu tütün ürünlerinin kullanım sıklığının yanı sıra mine yüzeyinin pürüzlülüğüne bağlı olarak değişebilir.

### **Yeşil dışsal renklenme**

Üst çene kesici dişlerin dudak yüzeyinde kolenin 1/3'ünü kaplayan bant şeklindeki oluşumlardır. Çocuklarda daha sık görülür. Yeşil renklenmeye primer mine kütikül artıklarının neden olduğu düşünülmeyle birlikte henüz kesinlik kazanmamıştır. Yeşil dışsal renklenmeden *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi floresan bakteri ve mantar sorumlu tutulur.

### **Turuncu dışsal renklenme**

Yeşil ve kahverengi renklenmelere oranla daha az sıklıkta görülen turuncu renklenmeye, kesici dişlerin dudak yüzeyinin diş etine yakın bölgesinde rastlanılır. Etiyolojisinde kromojen bakterilerden *Serratia marcescens* ve *Flavobacterium lutescens*'in rol oynadığı turuncu renklenme, ağız hijyeni kötü olan bireylerde daha sık görülür.

### **Antiseptiklere bağlı dışsal renklenme**

Klorheksidin, aleksidin, cetylpyridinium chloride gibi antiplak ajanların uzun süreli kullanımı sonucu dil, diş ve kompozit restorasyonlarda kahverengi renklenmelerin oluştuğu gözlenmiştir (19,36,65).

Araştırmacılar, klorheksidin içeriğine beyazlatma ajanı olarak kullanılan % 1-2'lik peroksi-monosülfat (Caroat) eklenmesi durumunda renklenmenin azaldığını belirtmişlerdir. Caroat'ın bu sonucu, klorheksidinin antiplak özelliğini değiştirmeksizin sadece renklenmeden sorumlu olduğu düşünülen sülfid gruplarına etki ederek oluşturduğu düşünülmemektedir (45,46,156).

### **Siyah dışsal renklenme (SDR)**

Süt ve sürekli dişlerde dişeti kenarına paralel seyreden noktasal, ince çizgi ya da geniş bant şeklinde görülen renklenmedir. Konu ile ilgili yaptığımız kaynak taramasında çeşitli ülkelerde siyah dışsal renklenme görülme sıklığı ile ilgili çalışmaların mevcut olduğunu saptadık (Tablo 1) (53,68,82,83,160).

Ancak ülkemizde bu konuyla ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla yaptığımız ön çalışmada, SDR görülme sıklığını %18 olarak belirledik (52).

**Tablo 1:** Değişik ülkelerde siyah dışsal renklenme ile ilgili prevalans çalışmaları

| <b>Araştırmacı</b> | <b>Yıl</b> | <b>Ülke</b> | <b>Yaş</b> | <b>Görülme sıklığı (%)</b> | <b>Çocuk sayısı (n)</b> |
|--------------------|------------|-------------|------------|----------------------------|-------------------------|
| Gülzow             | 1963       | İsviçre     | 7-15       | 19,90                      | -----                   |
| Sutcliffe          | 1967       | -----       | 11-13      | 21,00                      | 1000                    |
| Surdacka           | 1987       | Polonya     | 4-16       | 4,50                       | 3125                    |
| Koch               | 1996       | Almanya     | 6-11       | 4,00                       | 801                     |
| Koch               | 2001       | İtalya      | 6-12       | 6,30                       | 1086                    |
| Gasperetto         | 2003       | Brezilya    | 6-12       | 14,80                      | 263                     |
| Paredes            | 2005       | İspanya     | 4-11       | 7,54                       | 1,100                   |
| Heinrich-Weltzien  | 2008       | Finlandiya  | 11-12      | 16                         | 1748                    |

Diğer taraftan SDR'yi mikrobiyolojik açıdan irdeleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (11,96,130,139,151,155,171). Bu çalışmaların sonucuna göre SDR'nin bakterilerin ürettiği hidrojen sülfür ile tükürük ve diş eti oluk sıvısındaki demirin reaksiyonu sonucu oluşan ferrik sülfid'den kaynaklandığı günümüzde de kabul edilen en önemli görüştür. Etken bakterilerin araştırıldığı çalışmalarda kesin olmamakla birlikte *Actinomyces spp*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* sorumlu tutulmaktadır (130,139,145,155).

#### **4.1.2.2 İndirekt renklenme (metalik kaynaklı)**

Endüstriyel alanda çalışanların metal tozlarına (demir, manganez, gümüş, bakır, nikel civa, kurşun) maruz kalmaları sonucu veya ağız yoluyla alınan terapötik ajanlara bağlı olarak ortaya çıkabilen dışsal renklenmedir.

Demir, manganez ve gümüş dişlerde siyah; civa ve kurşun tozları gri renklenmeye yol açarken; bakır ve nikel dişleri mavi-yeşil, kromik asit ise turuncuya boyar. Anemi tedavisinde kullanılan demir içerikli preparatlar ve gümüş nitrat dişlerde siyah, iyodin solüsyonları kahverengi, potasyum permanganat içerikli ağız gargaraları ise mor renklenmeye yol açar (19,36,65,182).

#### **4.1.3. İnternalized renklenme**

Diş hekimliği literatürüne yeni girmiş bir terminoloji olan internalised renklenme , diş gelişimini takiben dışsal renklenmenin dişteki defekt yoluyla diş yapısına dahil olduğu renklenme tipi olarak tanımlanır. Diş aşınması, çürükler ve restoratif materyallerin neden olduğu renklenmeler bu grupta yer alır (159,182).

#### **Restoratif materyaller**

Poliantibiyotik patlar, iyotlu solüsyonlar, civa içerikli antiseptikler, amalgam iyodofom patı dişlerde renklenmeye neden olurlar. Metalik bileşenlere bağlı renklenmeler beyazlatma tedavilerine yanıt vermezler.

Öjenol ve fenol içeren patlar dişlerde sarı- turuncu ; amalgam restorasyonlar gri-siyah renklenmeye neden olurlar. Kompozit restorasyonlar da mikrosızıntı varlığında dişlerde renklenme görülür (19,36,68,126,186).



## **Çürük**

Diş çürükleri, lezyonun derinliğine (içinde bulunduğu gelişim basamağına ) göre farklı renklerde olabilmektedir. Derin dentin çürüklerindeki kahverengi-siyah renklenmenin **Maillard reaksiyonu** sonucu oluşan Maillard pigmentlerine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (19,36,68,186).

## **Aşınma**

Diş aşınması, erozyon, abrazyon ve atrizyona bağlı olarak mine ve dentindeki madde kaybı olarak tanımlanır. Minenin aşınmasıyla alttaki dentin dokusu daha belirgin hale gelmesi sonucu kromojenlerin dişe nüfuz etmesini kolaylaştır (19,36,65,182).

### **4.1.4. Renklenme Tedavisi**

Renklenmenin etiyojisine bağlı olarak aşağıda belirtilen tedavi seçenekleri uygulanır:

#### **Diyet ve alışkanlıklar**

Dişlerde renklenmeye yol açan gıdalardan (çay, kahve..) uzak diyet ve tütün ürünlerinin kullanımının kısıtlanması önerilmektedir. Mesleki olarak metal tozlarına maruz kalan bireylerin mutlaka maske takarak önlem almaları gerekmektedir.

#### **Diş fırçalama**

Doğru fırçalama teknikleri ile birlikte gerektiğinde aşındırıcı veya beyazlatma özelliği fazla olan diş macunlarının kullanımı önerilmektedir.

#### **Profesyonel diş temizliği**

Bazı dışsal renklenmeler ancak döner aletler ve aşındırıcı özelliği olan profilaktik pat ile giderilebilmektedir. Bu uygulama mine kalınlığında azalmaya neden olduğundan sık tekrarlanan uygulamalar tercih edilmemektedir.

#### **Mine mikroabrazyonu**

Zayıf hidroklorik asit ve silikon karbid partiküllerinden oluşan suda çözünen patın döner alet yardımıyla uygulandığı tekniktir. İçsel diş renklenmelerinde (özellikle fluorozis) kullanımı uygundur. Tek başına yada beyazlatma tedavisiyle birlikte kullanılabilir.

## **Beyazlatma**

Beyazlatma tedavisinde hidrojen peroksit, karbamid peroksit ve sodyum perborat gibi oksitleyici ajanlar kullanılır. Süt dişlerinde beyazlatma tedavisi önerilmez.

2 tip beyazlatma vardır:

a)Vital beyazlatma

b)Vital olmayan beyazlatma

Beyazlatma tedavilerine sarı-kahverengi renklenme (protein renklenmeleri) olumlu, gri-siyah (demir renklenmesi) ve mavimsi-gri (tetrasiklin renklenmesi) renklenmeler ise daha zor yanıt verir.

## **Dental restorasyonlar**

Beyazlatmanın uygulanamadığı yada yeterli olmadığı generalize içsel renklenmelerde parsiyel laminate veneer, tam estetik restorasyonlar, parsiyel- tam hareketli protezler uygulanır.

Diş çekimi ve implant destekli protezler A.İ veya D.İ olgularında tedavi seçenekleri arasında yer alır (19,36,65, 182).

### **4.1.5. Dışsal renklenmelerin tanısında kullanılan skala-indeksler**

Dışsal renklenmelerin tanısında kullanılan skala ve indeksler

- Kısa sürede uygulanabilecek kadar basit, düşük maliyetli ve hassas olmalı,
- İstatistiksel olarak analiz edilebilmelidir (148).

Yapılan literatür taramasında çalışmalarda,

- Synder(1964) ‘Diversified Dental Index (Pigmentation)’
- Davies (1968)
- Lobene (1968)
- Horowitz& Chamberlin (1971)
- Davis & Rees (1975)
- Nathoo (1997)
- Koch (2001) indekslerinin kullanıldığı görüldü (49,51,83,116,148).

Sık kullanılan bazı indekslerin açıklımları aşağıdadır:

**Lobene İndeksi (49,51)**

0: renklenme yok

1: Hafif renklenme

2: Orta renklenme

3: Ağır renklenme

**Nathoo İndeksi (116)**

N1: Kromojenlerin (çay, kahve, şarap, kromojenik bakteri) diş yüzeyine yapıştığı hafif renklenme

N2: Kromojenlerin (çay, kahve, şarap, kromojenik bakteri) diş yüzeyine yapışıp zamanla koyulaştığı renklenme

N3: Renksiz materyal veya prekromojenlerin (kalay florid, klorheksidin) dişe yapışıp kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşturduğu renklenme

**Koch İndeksi (83)**

0: renklenme yok

1: noktasal ya da dişetine paralel **kesintili** ince çizgi şeklinde renklenme

2: servikal 1/3 ü aşmayacak şekilde dişetine paralel **kesintisiz** çizgi halinde renklenme.

3: servikal 1/3 ü aşan, dişetine paralel kalın renklenme.

#### **4.2. Tükürük**

Büyük ve küçük tükürük bezleri tarafından salgılanan tükürük, dişeti oluk sıvısının yanısıra ağız florası, epitel hücreleri ve gıda artıklarını da içeren önemli bir dış salgıdır. Ağızda ortalama 1,1 ml bulunur ve tüm ağız içi yapıları 0,1 ml (100 mikron) kalınlığında ince bir film tabakası (biyofilm) oluşturarak kaplar. Yarı sıvı karakterli ve seyreltik bu salgının %99,5'ni su %0,3'ünü organik elementler ve % 0,2'lik kısmını ise inorganik ve eser elementler oluşturmaktadır (40,144).

Inorganik içeriğin ana elemanları arasında sodyum, potasyum, klor, kalsiyum magnezyum, fosfat, iyot ve fluor yer alırken; organik içerikte salgısal proteinler ön plandadır. Bunlar amilaz, immunglobulinler (IgA, IgG, IgM), antibakteriyel

proteinler (lizozim, laktoferrin, sialoperoksidaz), glikoprotein (statherin, sialin, prolinden zengin proteinler) serbest aminoasitler, karbonhidrat ve besin artıklarıdır.

Bikarbonatlar, fosfat ve üre tükürüğün pH'sının ve tamponlama kapasitesinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Makromoleküllü proteinler ve musinler temizlenmeyi, çökmeyi ve/veya oral mikroorganizmaların yapışmasını yani dental plak metabolizmasını düzenlemektedir. Kalsiyum, fosfat ve proteinler mineralizasyonda görevlidir. İmmunglobulinler, proteinler ve enzimler ise antibakteriyel etki göstermektedir (40,42,70).

#### 4.2.1. Tükürük Eser Elementleri

Biyolojik yapı ve sıvılardaki oranı oldukça düşük ( $\mu\text{g/g}$ ) olan, demir (Fe), magnezyum (Mg), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), çinko (Zn), selenyum (Se), stronsiyum (Sr), gümüş (Ag) gibi eser elementlerin tükürükteki dağılımı ağız içi dokuların fonksiyonel devamlılığının korunmasında, amilaz aktivitesinde, diş-kemik gelişimi ve mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır (28,192)

Eser elementler ağız içi etkilerini 2 şekilde gösterir. Minenin kimyasal yapısına dahil olabilirler, bakteri plağı ile tükürük yapısına girip mikroorganizmaların ekolojisini etkiler ve ağız florasını değiştirebilirler. Minenin inorganik bölümü, apatit kristallerinden oluşmuştur. Böyle bir yapı iyon alışverişi için çok uygun olduğundan, eser elementlerin üçte birinden fazlası bu yapıya girerek minenin asitler karşısında çözünürlüğünü, dolayısıyla dişin çürük oluşumuna direncini değiştirir (176). Bu nedenle bazı tükürük ve plak minerallerinin çürük aktivitesini belirlemede önemli rol oynadığı belirtilmektedir (125).

Ayrıca bakır, demir, fluor, mangan, gümüş, kurşun gibi eser elementlerin gıda, tükürük ve dişeti oluk sıvısı yardımıyla oluşturdukları sülfid formlarının dişlerde renklenmelere neden olduğu bilinmektedir (73).

Eser elementlerinin çürük, yaş ve cinsiyet ile ilişkisinin araştırıldığı birçok çalışmada farklı ve birbirleriyle çelişen sonuçlar rapor edilmiştir (10,14,20,21,28,31, 39,133).

İngiltere'de 272 çocukta yapılan çalışmada tükürük Zn, Cu, Fe, Mn ve F düzeyi ile çürük arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çürük ile Cu ve F arasında negatif

korelasyon saptanırken; Zn, Fe ve Mn ilişkili bulunmamıştır. İtalya’da yapılan benzer çalışmada ise kızların erkeklerden daha düşük tükürük elektrolit seviyesine sahip olduğu bununla beraber çürüklü bireylerin tükürük Zn/Cu oranının çürüksüzlere kıyasla azaldığı vurgulanmıştır (14).

Zahir ve ark.nın (192) kariyojenik ve kariyostatik etkili eser elementleri inceledikleri çalışmanın sonucunda, Cu’nun hafif kariyostatik, Pb ve K’nin kariyojenik olduğu; Na’nın ise çürükle ilişkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Eser elementlerden Cu, Fe ve F’nin asit oluşumu ve çürük üzerine etkisi araştırıldığında, şeker ile kristallendirilmiş Cu, Fe ve F’nin laktik asit oluşumu ve bakteri kolonizasyonunu azaltarak, şekerin kariyojenik potansiyelini zayıflattığı sonucuna varılmıştır (134).

#### **4.2.1.1. Eser elementlerin analizinde kullanılan yöntemler**

- Nötron Aktivasyon Analizi (NAA)
- X-Işınları Floresansı (XRF)
- Total Refleksiyon Floresansı (TXRF)
- Atomik Emisyon Spektrometresi (AES)
- Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS)
- Atomik Floresans Spektrometresi (AFS)
- İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP-AES, ICP-MS) (107,183) .

#### **4.2.1.2. İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP)**

Katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir. Teknik elektromanyetik indüksiyonla bir radyofrekans güç kaynağı vasıtasıyla kuartz tüp içinde yaratılan 10.000 Kelvin sıcaklığındaki argon plazmaya beslenen analiz edilecek çözeltide bulunan elementlerin iyonize edilmesi; iyonize elementlerin atomlarının yaydıkları emisyonun belirlenmesi ve element derişimlerinin elektron çoklayıcı bir dedektör

tarafından ölçülmesi aşamalarını içerir. Örnekteki tüm elementlerin derişimleri 1 ile 2 dakika arasında değişen oldukça kısa bir sürede ölçülür.

ICP'nin iyonizasyon sonrası açığa çıkan ışımının (emisyona) dalga boyuna göre kalitatif ve kantitatif analiz yapan türü ICP-AES (İndüktif eşleşmiş plazma ile birleştirilmiş atomik emisyon spektrometresi) veya ICP-OES olarak adlandırılır. ICP-MS (İndüktif eşleşmiş plazma ile birleştirilmiş kütle spektrometresi) ise iyonizasyon sonrası açığa çıkan atomik emisyon yerine iyonları kütlelerine göre ayıran bir sistemdir (109).

#### 4.2.1.3. ICP-AES

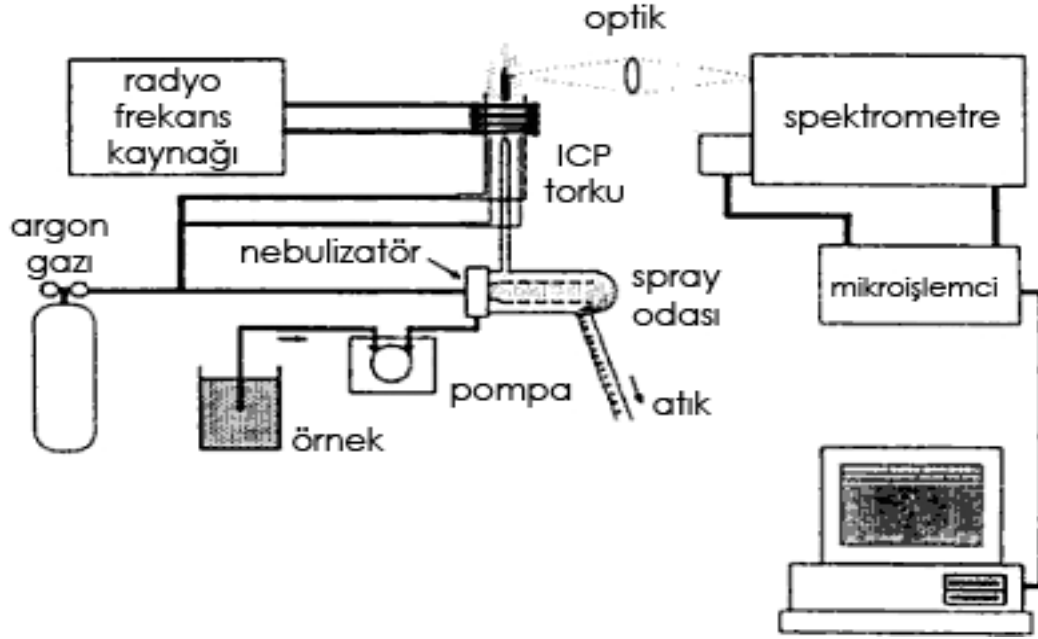
Birçok elementin aynı anda nicel tayininde kullanılan analitik metotlardan birisidir. Düşük derişim seviyelerinin tayininde başarılı bir yöntemdir. ICP kaynağı, argon gibi inert gazlardan yüksek enerjili ve yüksek frekanslı iyonlaşmış bir plazmayı üretir. Bir numune plazmanın merkezine enjekte edildiğinde, 10000 Kelvin sıcaklıktaki plazma, numunedeki elementlerin ayrışma, atomlaşma ve uyarılma işlemlerinin gerçekleşmesini sağlar. Bu olaylar, çalışılan elementlerin kendilerine özgü frekansta ışığı yayması ile sonuçlanır. Bu ışık şiddeti, numune içerisindeki elementlerin derişimi ile doğru orantılıdır ve bir emisyon spektrometresi ile ölçülür. Spektrometre özgün frekansları farklı dalga boylarına ayırabilme ve nicel sonuç alabilmeyi sağlar.

ICP-AES' in bazı avantajları;

- \_ Geniş doğrusal çalışma aralığı
- \_ Düşük gözlenebilme sınırı
- \_ Kimyasal girişimin olmaması
- \_ Elementler arası en düşük etki
- \_ Sonuçlarda kesinlik ve doğruluktur (51,83).

Slovakya'da farklı kimyasal analiz yöntemiyle (AAS, ICP-AES, ICP-MS) gerçekleştirilen çalışmada çekilmiş çürüksüz dişlerin tüm minesinde ve yüzey tabakalarında 7 eser elementin (Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Pb, Sr) tayini yapılmıştır. Çalışmanın sonunda Sr ve Mg hariç tüm elementlerin minenin ilk tabakasında daha yoğun konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. Yine Mg ve Sr düzeylerinin mine dentin bağlantısına yaklaştıkça artış göstermesine karşın diğer elementlerin

düzeylerinde azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Çalışmadan elde edilen en önemli bulgu ise birçok elementin 150 $\mu$  kalınlıkta sabit konsantrasyonlara ulaştıkları bunun da tükürük-diş etkileşiminden kaynaklandığıdır. Böylece mine de ve remineralizasyonunda en efektif kalınlığın 150 $\mu$  olduğu hipotezi de desteklenmiştir (137).



Şekil 2: ICP-AES düzeneği (50)

|                  |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |                |                |                |                |                 |  |
|------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--|
| <b>Li</b><br>0.3 | <b>Be</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  | <b>B</b><br>1  | <b>C</b><br>40 | <b>N</b><br>na |                |                 |  |
| <b>Na</b><br>3   | <b>Mg</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  | <b>Al</b><br>3 | <b>Si</b><br>4 | <b>P</b><br>30 | <b>S</b><br>30 | <b>Cl</b><br>na |  |
| <b>K</b><br>20   | <b>Ca</b><br>0.02 | <b>Sc</b><br>0.3 | <b>V</b><br>0.5 | <b>Ti</b><br>0.5 | <b>Cr</b><br>2 | <b>Mn</b><br>0.4 | <b>Fe</b><br>2   | <b>Co</b><br>1   | <b>Ni</b><br>5  | <b>Cu</b><br>0.4 | <b>Zn</b><br>1 | <b>Ga</b><br>4   | <b>Ge</b><br>20 | <b>As</b><br>20  | <b>Se</b><br>50  | <b>Br</b><br>na  |  |                |                |                |                |                 |  |
| <b>Rb</b><br>30  | <b>Sr</b><br>0.06 | <b>Y</b><br>0.3  | <b>Nb</b><br>5  | <b>Zr</b><br>0.8 | <b>Mo</b><br>3 |                  | <b>Ru</b><br>6   | <b>Th</b><br>5   | <b>Pd</b><br>3  | <b>Ag</b><br>1   | <b>Cd</b><br>1 | <b>In</b><br>9   | <b>Sn</b><br>30 | <b>Sb</b><br>10  | <b>Te</b><br>10  | <b>I</b><br>na   |  |                |                |                |                |                 |  |
| <b>Cs</b><br>10  | <b>Ba</b><br>0.1  | <b>La</b><br>1   | <b>Hf</b><br>4  | <b>Ta</b><br>15  | <b>W</b><br>8  | <b>Re</b><br>5   | <b>Os</b><br>0.4 | <b>Ir</b><br>5   | <b>Pt</b><br>10 | <b>Au</b><br>4   | <b>Hg</b><br>1 | <b>Tl</b><br>30  | <b>Pb</b><br>10 | <b>Bi</b><br>20  |                  |                  |  |                |                |                |                |                 |  |
|                  |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |                |                |                |                |                 |  |
|                  |                   |                  | <b>Ce</b><br>5  | <b>Pr</b><br>1   | <b>Nd</b><br>1 |                  | <b>Sm</b><br>2   | <b>Eu</b><br>0.1 | <b>Gd</b><br>1  | <b>Tb</b><br>2   | <b>Dy</b><br>2 | <b>Ho</b><br>0.4 | <b>Er</b><br>1  | <b>Tm</b><br>0.6 | <b>Yb</b><br>0.3 | <b>Lu</b><br>0.2 |  |                |                |                |                |                 |  |
|                  |                   |                  | <b>Th</b><br>70 |                  | <b>U</b><br>15 |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |                |                |                |                |                 |  |

Şekil 3: ICP-AES deteksiyon limitleri ( $\mu$ g/L) (80).

#### 4.2.2. Tükürüğün görevleri

Tükürüğün,

Tad alma

Yutma ve sindirme

Konuşma

Koruma ve kayganlaştırma (lubrikasyon)

Temizleme (klerens)

Tamponlama ve mine bütünlüğünün korunması

Antibakteriyel etki

Pelikül oluşumu gibi görevleri vardır (40,42,144).

#### 4.2.3. Tükürük toplama yöntemleri

Tükürük 3 farklı yöntemle toplanabilir:

##### 4.2.3.1.Uyarımsız tükürük toplama

Uyarımsız tükürük

a) **draining** (tükürüğün cazibesıyla akarak toplanması),

b) **swab** (tükürüğün pamuk peletlere emdirilerek toplanması),

c) **spitting** (tükürüğün tükürme işlemiyle toplanması)

d) **suction** ( tükürüğün vakumlanarak toplanması) olmak üzere 4 farklı şekilde toplanabilir (136,117,157).

##### 4.2.3.2.Uyarımlı tükürük toplama

Uyarımlı tükürük ise tad alma (damla, kağıt strip) ve çiğneme (paraffin, şekersiz sakız ) esaslı yöntemler ile toplanır (136,117,157).

##### 4.2.3.3.Çalkalama ile tükürük toplama

Kserostomi gibi tükürük miktarının çok az olduğu durumda ağız 5 ml steril tuzlu su ile 1 dakika çalkalandıktan sonra tükürük toplanır (89).



#### 4.2.4. Tükürük akış hızı (TAH)

Tükürüğün yapısına etki eden en önemli faktörlerden birisi olan tükürük akış hızı, bireyin istirahat pozisyonundayken dışarıdan hiçbir uyarı almaksızın birim zamanda (dakikada) ağıza akan tükürük miktarıdır. Tükürük nörotransmitter uyarana bir cevap olarak salgılanır. Günün büyük bir kısmında nörotransmitter salınımı düşük seviyededir. Bu dönemde oluşan tükürük akımı **uyarımsız tükürük akışı** olarak adlandırılır ki ortalama değeri 0,3 ml/dk dır. Sağlıklı bireylerde uyarılmamış tükürük akım hızını etkileyen birçok faktör (hidratasyon, vücut pozisyonu, ışık, biyolojik ritim, koku alma, cinsiyet, yaş, ilaç vb.) vardır (40,42,91,93).

Besinler ve çiğneme fonksiyonu nörotransmitter salınımını arttırarak tükürük akışını tetikler. Bu durumlarda oluşan tükürük akımı **uyarımlı tükürük akışı** olarak kabul edilir (maksimum 7ml/dk). Uyarımlı TAH'ye etki eden faktörler ise çiğneme, kusma, yaş, tükürük bezinin büyüklüğü, sigara ve ilaç kullanımı olarak sıralanabilir (40,42,91).

Tükürük akış hızına etki eden faktörlerin (yaş, cinsiyet, dişlenme tipi, boy, ağırlık, beslenme, iklim) incelendiği çalışmalarda ise farklı sonuçlar elde edilmiştir (18,136,175)

Torres ve ark ile Roteevel ve ark.nın (136,175) çocuklarda yaptıkları çalışmalarda TAH'nin yaş, cinsiyet, dişlenme tipine göre değişmediği belirtilmiştir

Bretz ve ark.(18) ise ırk faktörünün TAH'yi etkilemediğini ancak cinsiyete göre yaptığı değerlendirmede kızların tükürük akış hızının erkeklerinkinden daha düşük olduğunu ifade etmiştir. Söz konusu çalışmada karışık dişlenme dönemindeki TAH'nin süt dişlenme dönemine göre yüksek olduğu saptanmıştır.

Lingström ve ark.nın (102) yaptıkları çalışmada TAH'de radyoterapi sonrası meydana gelen azalma sonucunda tükürük proteinlerinde ve laktoferrin düzeyinde artış saptandığı belirtilmiştir

Tükürük miktarı azaldığında, tükürüğün yıkayıcı ve koruyucu etkisi ortadan kalkacağı için, çürük oluşma hızının arttığı bilinmektedir. Tükürük akış hızı tüm tükürük ölçümleri içinde karyostatik aktiviteye etkileri yönünden en önemli parametredir. Düşük TAH ve düşük TTK yüksek çürük tehlikesini gösterebilir.

Tulunoğlu ve ark.'ı (177) tarafından uyarımlı tükürük toplanarak yapılan çalışmada TAH'nin artmasıyla tükürük Ca seviyesinin ve TTK'nın arttığını bu nedenle çürük aktivitesinde azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir.

#### **4.2.5. Tükürük pH'sı**

Tükürük tamponlama kapasitesi ve pH'sı ağız ortamında oldukça önemli biyokimyasal verilerdir. Tükürük ilk salgılandığında pH'sı hafif asidiktir. Ancak tükürük akış hızı ile birlikte pH yükselir. Tükürük pH'sını etkileyen iyonlar bikarbonatlar, karbonik asitler, fosfatlar ve tükürük proteinleridir. Normalde tükürüğün pH'sı 6.5-7.5 arasındadır. Diş yüzeyindeki sıvının, hidroksiapatite göre doymamış olduğu ve mineden kalsiyum ve fosfatın ayrılmasına izin veren değere **kritik pH** denir. Bu değer 5.5 ve bunun altındaki pH'lardır. Kritik pH'ın altında diş minesinden çözünme başlayarak diş çürüğü oluşur.

tükürük pH'sının saptanması indikatör ve elektriksel yol ile yapılabilir (86,154).

##### **4.2.5.1. İndikatör ile pH tayini**

En kolay pH belirleme yöntemidir. İndikatörler iyonize halde zayıf asit ya da baz yapıda olduğundan pH renk değişimi ile tespit edilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı %10 dan daha az değer aldığıında değişimin gözle belirlenememesidir (154).

##### **4.2.5.2. Elektriksel yol ile tayini**

Bu yöntemde pH metre olarak adlandırılan alet kullanılır. İçinde 1 M HCl emdirilmiş platin elektrot bulunan cam elektrot vardır. İnce duvarlı cam ile kaplı ucunda elektriğı ileten özel bir camdan yapılmıştır. Standart kalomel ile birlikte cam elektrot bir hücre oluşturur. Sabit ısıda bu hücrenin elektromotiv kuvveti tamamen cam elektrotun içinde bulunduğu solüsyonun H iyonu konsantrasyonuna bağlıdır (86,154).

#### 4.2.6. Tükürük tamponlama kapasitesi (TTK)

Ortamdaki  $H^+$  ve  $OH^-$  iyonlarına bağılı olarak değişebilen pH değişikliklerine karşı direncin gücüne, **Tamponlama Gücü (Kapasitesi)** denir. Tükürük içerdiği, karbonik asit, bikarbonat, fosfat ve amfoterik proteinler sayesinde ağız içinde oluşan organik asitlerin nötralize edilmesi ve tamponlanmasında önemli rol oynamaktadır. Sözü edilen tampon maddeler, ağız içindeki sert ve yumuşak dokularda oluşabilecek kimyasal yaralanmaların ve diş çürüklerinin önlenmesinde önemlidir. Uyarımlı tükürükte en önemli tampon bileşeni inorganik fosfatken, uyarımsız tükürükte karbonik asit-bikarbonat tampon sistemidir. Tükürük uyarıldığında tamponlama kapasitesi artmaktadır (86,90,154).

Tamponlama kapasitesi 2 yöntem ile tespit edilebilir:

##### 4.2.6.1.Ericsson Yöntemi

Toplanan uyarımlı tükürük bekletilmeden, 1 ml çekilerek baska bir kaba alınır ve üzerine 3 ml 0,005 N HCL ilave edilir. Karbondioksiti çıkarmak için kaba hafifçe titreşim hareketi yaptırılır. Örnekler 10-20 dakika bekletildikten sonra pH ölçülür. Ölçüm pH metre ve pH indikatörü kullanılarak yapılabilir. Toplanan uyarımsız tükürük bekletilmeden, bir ml çekilerek başka bir kaba alınır ve uyarımlı tükürük örneğinden farklı olarak üzerine 3 ml 0,0033 N HCL ilave edilir. Karbonhidroksiti çıkarmak için kaba hafifçe titresim hareketi yaptırılır. Örnekler 10-20 dakika bekletilir. Süre sonunda pH ölçülür. Ölçüm yine pH metre ve pH indikatörü kullanılarak yapılabilir (154).

##### 4.2.6.2.Dentobuff Strip Yöntemi

Tükürük tamponlama kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan bu yöntemde özel kitler kullanılır. Bu tür kitler içerisinde zayıf bir asit bulunan özel bir tüp bulunur. 1 ml uyarılmış tükürük bu test tüpüne aktarılır ve bekletilir. Renk ayrımına göre TTK hakkında bilgi sahibi olunur. Eğer renk sarımsı kahverengi ise  $pH < 4.0$  düşük TTK, yeşil ise  $pH < 4.5-5.5$  orta düzeyde TTK, mavimsi ise  $pH > 6$  yüksek TTK olarak değerlendirme yapılır (154).

### 4.3. Ağız mikroflorası ve mikrobiyal dental plak

Dişler, dil, ağız mukozası, alveolar mukoza ve diş eti cebi gibi farklı bölgelere sahip ağız boşluğunda 700'den fazla mikroorganizma türü saptanabilmiştir (3). Farklı organizmaların değişik bölgelerde kolonize olabilmeleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar fiziko-kimyasal faktörler (fiziksel yapısı, ısı, oksijen basıncı, hidrojen iyonu konsantrasyonu, besinler) konak faktörleri (tükürük, glikoproteinler, dişeti oluk sıvısı), bakteriyel faktörler (aderans, diğer bakterilerle ilişkiler) olarak üçe ayrılır. Bu faktörlere ek olarak konağın kontrolü altındaki ağız hijyeni ve beslenme alışkanlıkları da kolonizasyonda etkilidir (63,174).

Ağız boşluğunun bakterilerle tanışması doğumdan sonraki ilk birkaç saat içerisinde gerçekleşir. Bu nedenle yeni doğanda kolonize olan ilk bakteri türleri ve flora gelişimi, gelecekteki bakteri kolonizasyonunun temelini oluşturması açısından büyük önem taşır. Doğumdan sonraki ilk hafta içerisinde ağızdan izole edilen mikroorganizmalar, streptokok türlerinden *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.salivarius* tür. İlk aylarından itibaren ağız florası kompleks bir hal almaya başlar ve ortama *veillonella*, *prevotella (bacteroides)* gibi anaerobik bakteriler katılır. Dişlerin sürmesi ile birlikte mikroorganizmaların üreyebileceği yeni yüzeyler oluşurak *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* ve *Actinomyces* türleri ağız ortamına yerleşirler(7,26,77,165).

Aas ve ark (3) PCR) kullanarak yaptıkları çalışmada, sağlıklı ağız boşluğundaki dil, bukkal epitel, sert ve yumuşak damak, diş yüzeyleri, subgingival plak gibi farklı bölgeleri incelemiştir. Mikroorganizmaların % 60'ından fazlası kültüve edilemediği bu çalışmada bazı bakteriler tüm bölgelerde saptanırken, bazıları yalnızca bölgeye özgü bulunmuştur. Örneğin *S.sangius*, *S.gordonii*, *Abistrophia defectiva*, *Actinomyces spp.* özellikle diş yüzeyinde kolonize olduğu saptanmıştır.

Aynı araştırıcının çürük kaviteledeki floranın incelendiği diğer PCR çalışmasında, 224 bakteri türü ve filotipi saptanmıştır. Bu çalışmanın bulgularına dayanarak; *S.mutans*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Atopobiu*'dan başka türlerin de çürük oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *Actinomyces spp* ve *mutans* olmayan streptokokların da çürük başlangıcında etkili oldukları belirtilmiştir (2).

**Tablo 2:** Ağız ortamında bulunan mikroorganizmalar (63).

| Gram- pozitif             |                          | Gram negatif        |                       |                  |
|---------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Kok                       | Çomak ve Filamanlar      | Kok                 | Çomak ve filamanlar   | Spiraller        |
| <i>Enterococcus</i>       | <i>Actinomyces</i>       | <i>Branharnella</i> | <i>Actinobacillus</i> | <i>Treponema</i> |
| <i>Peptostreptococcus</i> | <i>Aracnia</i>           | <i>Neisseria</i>    | <i>Campylobacter</i>  |                  |
| <i>Stomatococcus</i>      | <i>Bifidobacterium</i>   | <i>Veillonella</i>  | <i>Capnocytophaga</i> |                  |
| <i>Streptococcus</i>      | <i>Corynebacterium</i>   |                     | <i>Centipeda</i>      |                  |
|                           | <i>Eubacterium</i>       |                     | <i>Eikenella</i>      |                  |
|                           | <i>Lactobacillus</i>     |                     | <i>Fusobacterium</i>  |                  |
|                           | <i>Propionibacterium</i> |                     | <i>Haemophilus</i>    |                  |
|                           | <i>Rothia</i>            |                     | <i>Leptotrichia</i>   |                  |
|                           |                          |                     | <i>Mitsuokella</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Prevotella</i>     |                  |
|                           |                          |                     | <i>Porphyromonas</i>  |                  |
|                           |                          |                     | <i>Selenomonas</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Simonsiella</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Wollinella</i>     |                  |

Pelikül tabakası ile başlayan mikrobiyal dental plak (MDP) oluşumunda, ağız boşluğundaki farklı bölgeler, kemoterapötik maddelerin (fluor gibi) açığa çıkması, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi, tükürük ve mikrobiyal ilişki, mikroorganizmaların adezyon ve ko-adezyonu önemli rol oynar (135,138).

Ayrıca morfolojik, mikrobiyolojik, besin ile ilgili faktörler ve biyofiziksel faktörlerin de etkili olduğu bildirilmiştir. Morfolojik olarak; retantif olan diş yüzeyleri, pit ve fissürler, ayrıca pürüzlü bir yapıya sahip kök yüzeyleri, çapraşıklık gösteren dişler ve restorasyonlu dişler daha fazla plak birikimine neden olurlar. MDP kalınlığı ve akümüasyonu, ekstraselüler mikrobiyal materyal üretimine, oral hijyen uygulamalarına ve yanak/dudak hareketleri gibi konakçının fiziksel aktivitesine de bağlıdır (15,103).

#### 4.3.1. Pelikül (Kazanılmış pelikül)

Bu terim ilk kez Dawes tarafından sürme sonrası mine yüzeyinde oluşan kütiküler tabakayı tanımlamak için kullanılmıştır. Kazanılmış pelikül oluşumu 2 basamakta gerçekleşir. Dişin ağız ortamıyla temasından sonra mine yüzeyine tükürük proteinleri yapışmaya başlar. Bu proteinlere ‘pelikül öncü proteinleri’ (pellicle

precursor protein) adı verilir. Prolinden zengin proteinler (PRP), statherin, histatin ile mine yüzeyi arasındaki iyonik etkileşim 30 sn-3 dak gibi kısa sürede tamamlanır.

İkinci basamakta ise tükürük öncü proteinleri ile tükürükten gelen biyopolimerler arası bağlantı söz konusudur. Bu aşama 30-90 dakikada gerçekleşir ve başlangıç kalınlığı 10-20nm olan pelikül bu aşamanın sonunda 100-200 nm'ye ulaşır (62).

Bu ince, hücresiz ve bakterisiz biyofilm, tüm diş yüzeyini kaplayarak pit, fissür ve mine defektlerini doldurur. Pelikül ayrıca ağız içi aparatların, polietilen striplerin, çeşitli restoratif materyallerin ve protezlerin üzerinde de gözlenebilir.

Pelikül:

- Mine yüzeyinin korunmasında ve remineralizasyonunda
- Mine dokusunun seçici geçirgenlik özelliğinde
- Spesifik oral mikroorganizmaların diş yüzeyine tutunmasında (adezyon)
- Diş yüzeyinde kolonize olan plak bakterileri için üreme ortamının sağlanmasında önemli rol oynar (62,110).

#### **4.3.2. Mikrobiyal dental plak (MDP)**

İlk kez Black tarafından '**jelatinöz mikrobiyal plak**' olarak adlandırılan mikrobiyal dental plak; dil, dudak, yanak ve tükürük ile mekaniksel olarak temizlenmeyen diş bölgelerine yerleşen, diş yüzeyine sıkıca yapışan, protein ve polisakkaritleri içeren, su spreyi ile uzaklaştırılmayan beyaz-gri ya da beyaz-sarı renkli organik yığıntılardır. Yapışkan protein ve polisakkaritlerden oluşan bu kitleler içinde çok sayıda mikroorganizma bulunur (62,103,110).

Bakteriler elektrostatik, hidrofobik iyon ve van der Waals kuvvetleri ile peliküle yapışır. Bakterilerin çökmesi ve tükürükteki diğer bakterilerle proteinin yerleşmesi sonucu, plağın hem kütlesi hem de kalınlığı artar.

MDP ağırlığının % 80-90'ı sudur. Kuru ağırlığın %70'ni bakteriler, geri kalan kısmı ise polisakkarit, tükürük proteinleri ve glikoprotein içerikli matriks oluşturur (62,97).

##### **4.3.2.1. Mikrobiyal dental plak oluşum mekanizması**

Mikrobiyal dental plak,

1-Tükürük protein ve glikoproteinlerinin diş yüzeyine yapışması ile oluşan pelikül (kazanılmış pelikül) tabakası

- 2-Tükürük bakterileri ile pelikül arasında fizikokimyasal etkileşimin olduğu spesifik olmayan geri dönüşümlü bağlantı fazı
- 3-Pelikülda bulunan konak reseptörleri ile primer bakteri kolonileri arasında oluşan geri dönüşümsüz bağlantı fazı (Hücre- yüzey)
- 4-Pelikül yapılmış primer bakteri kolonileri ile sekonder bakteri kolonileri arasında oluşan ko-agregasyon fazı (Hücre- hücre)
- 5-Hücre bölünmesi ve plak kalınlığının artması sonucu oluşur (13,109).

MDP'nin oluşumu pelikül tabakası ile başlar. Pelikül içeriğinde albumin, lizozim, amilaz, IgA, PRP ve müsin bulunur. Pelikül ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan bakteriler *S.sanguis*, *S.mutans*, *A.viscosus*, *A.naeslundii* ve *V.parvula* gibi Gr+ kok ve çomaklardır (**Primer bakteri kolonileri**). Bu bakterilerden *A.viscosus* ve *S.sanguis* tükürük proteinlerinden aPRP ile bağlantı kurar. Daha sonraki aşamada primer bakteri kolonilerine *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* ve *Capnocytophaga* gibi Gr - filamanlar (**Sekonder bakteri kolonileri**) yapışarak plak kalınlığını arttırır.

MDP, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gibi bakterilerin de (**Tersiyer bakteri kolonileri**) eklenmesiyle kompleks hal alır. Bu safhada mikroskopta 'mısır koçanı' şeklinde görülür (35,54,58).

### 4.3.3. Primer bakteri kolonileri

Pelikül ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan bakteriler *Streptococcus spp* (*S.sanguis*, *S.mutans*), *Actinomyces spp.* (*A.viscosus*, *A. naeslundii*) ve *Veillonella spp.* (*V.parvula*) gibi Gr + kok ve çomaklardır. Primer bakteri kolonilerinde yer alan bakteriler, MDP oluşumunda etkili olduklarından diş çürüğü ve/ veya dışsal renklenmelerden de sorumlu tutulurlar (2,3,97,139,151).

SDR ile yapılmış sınırlı sayıda çalışmalarda *Actinomyces* türlerinin siyah renklenme oluşumunda etkili olabileceği vurgulanmıştır (11,139,151,155).

#### 4.3.3.1. *Streptococcus spp*

Ağzın tüm bölgelerinden izole edilebilen streptokoklar oral mikrofloranın çoğunluğunu oluşturur. Hücreler 0.5–2.0µm. çapında küresel veya ovoid şekillidir,

sulu ortamda ürerler, çiftler veya zincirler halindedir. Streptokoklar, besinden zengin bir ortamda 37 °C sıcaklıkta ürerler. Metabolizmaları fermantatiftir ve başlıca laktat üretirler (7,43).

Normal floranın yanı sıra ağız florasında da sık görülen viridans streptokoklar, diş plağının % 28, dilin % 45, tükürüğün de % 46'sında bulunur(183).

Günümüze kadar tanımlanmış oral streptokoklar Tablo 3'de gösterilmiştir. Diğer oral streptokoklar ise *S. pyogens*, *P. micros*, *P. magnus*, *P. anaerobius*, *P. micros*'tur.

**Tablo 3:** Oral streptokok türlerinin sınıflandırması (111).

| Grup ADI  | Tür ADI   |
|---|---|
| <i>Streptococcus mutans grubu</i><br>( <i>mutans streptococci</i> ) | <i>S. mutans, serotip c, e, f</i><br><i>S. sobrinus, serotip d, g</i><br><i>S. cricetus, serotip a</i><br><i>S. rattus, serotip b</i><br><i>S. ferus</i><br><i>S. macacae</i><br><i>S. downei serotip h</i> |
| <i>Streptococcus salivarius grubu</i>                               | <i>S. salivarius</i><br><i>S. vestibularis</i>  |
| <i>Streptococcus anginosus grubu</i>                                | <i>S. constellatus</i><br><i>S. intermedius</i><br><i>S. anginosus</i>  |
| <i>Streptococcus Mitis grubu</i>                                    | <i>S. sanguis</i><br><i>S. gordonii</i><br><i>S. parasanguis</i><br><i>S. Oralis</i><br><i>S. mitis</i><br><i>S. crista</i>   |



**a) *Streptococcus sanguis***

Küresel ve oval şekilli, 0.8-1.2µm çapında, orta veya uzun zincirler oluşturur ve diş yüzeylerinde kolonize olabilirler. Genellikle fissürlerde çürüğe sebep olurlar. Sakkaroz içeren ortamda ekstrasellüler polisakkarit (glukan) oluşturan koloniler pürüzlü yüzeyli, sert kümeler halinde ve agara yapışık olarak bulunurlar. Aerobik ortamda üreyebilen *S.sanguis*'u diğer ağız streptokoklarından ayıran en önemli özellik eskülin ve arginini hidrolize edebilmesidir (63).

**b) *Streptococcus mutans***

İlk defa 1924 yılında Clark tarafından çürük insan dişinden izole edilmiştir. Hareketsiz ve kapsülsüz olan bu mikroorganizmaların çapı yaklaşık 0.5-0.75 µm'dir. Genellikle kısa çomak veya kokobasil görünümünde olup hücre duvarındaki karbonhidrat antijenlerine göre sekiz serotipi ayırt edilmiştir. Genetik ve fenotipik heterojenitesine göre ise insan ve hayvanlardan yedi değişik tür izole edilmiştir (104,111).

Yapılan çalışmalarda, *S.mutans*'ın mutans streptokokların, %74-94'ünü oluşturduğu ve farklı populasyonlarda koronal çürük-biberon çürüğünün gelişimine büyük ölçüde eşlik ettiği gösterilmiştir (98,108).

Mutans streptokok, hücre duvarı karbonhidrat antijenlerine ve proteinlerine sahiptir.. Bu antijen, tükürük pelikül komponentleri ile birlikte, *S. mutans*'ın diş yüzeyine yapışmasında rol oynar. *S. mutans*, sakkarozdan suda çözünebilen ve çözünmeyen ekstrasellüler polisakkaritler (glukan ve fruktan) üreterek diş yüzeyine yapışır (118).

Mutans streptokoklar, 19-31. aylarda, "enfeksiyon penceresi olarak" tanımlanan bir dönemde kolonize olmaya başlar. Kolonizasyon, yaşın artması ve hipoplastik mine lezyonlarının varlığında artış gösterir. Aynı zamanda dil yüzeyi de, diş yüzeyi kadar mikroorganizmalar için rezervuar görevi görür. Azı dişleri ön dişlere göre, fissürler; aproksimal, bukkal ve lingual yüzeylere göre, restorasyon görmüş dişler; sağlam yüzeylere göre daha fazla *S.mutans* kolonizasyonuna sahiptir (25,100,108).

İlerlemiş çürük lezyonlarda yüksek düzeyde *S. mutans* saptanırken, yumuşak ve nekrotik dentinde laktobasillerin daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Öte yandan çürük ile ilgili yapılmış mikrobiyolojik çalışmalarda karşılaşılan en önemli problem, lezyon

oluşumunun başlangıcına veya çalışılan lezyonun demineralizasyon aktivitesine ait kesin tanımlamaların yokluğudur. Çürüğün dinamik doğası nedeniyle, mineral kaybı zaman içinde değişir. Bu durum sadece farklı lezyonlar arasında değil mikrofloranın metabolik aktivitesine bağlı olarak lezyonun kendi içinde bile değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir (111)

*S. mutans*' lar çoğunlukla diş yüzeyindeki retansiyon bölgelerinde kolonize olurken ağız mukozasında daha az oranda yerleşirler. Bu nedenle dişsiz ağızlarda (henüz dişleri sürmemiş bebek ve bütün dişlerini kaybetmiş bireyler) bulunmaz. Ancak dişlerin sürmesiyle anneden bebeğe *S. mutans*'ın geçiş gösterdiği değişik çalışmalarda gösterilmiştir (61,126,169).

Ertuğrul ve ark.(48) 2003 yılında yaptıkları araştırmada, 6-11 yaş arası birinci veya ikinci süt azısının aproksimalinde çürük olan 30 çocuğun bakteri ve mutans streptokok sayıları restorasyon öncesi ve sonrasıyla karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonunda restorasyon sonrası mutans streptokok sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktığı rapor edilmiştir.

Bölümümüzde gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda da restoratif tedavi sonrasında, mutans streptokok ve laktobasil değerlerinde, birinci, üçüncü ve altıncı aylarda anlamlı düşüş saptanmış ancak mutans streptokok ve laktobasil değerlerinde üçüncü ay sonunda başlangıç değerlerine geri dönüş eğilimi olduğu belirtilmiştir (178).

Reuters ve ark.(133) 1995 yılında çürük yönünden aktif olan çocukların belirlenmesi amacıyla 252 okul öncesi çocukta yaptıkları üç yıl süren çalışmalarında, tükürükteki mutans streptokok ve laktobasil sayıları arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Benzer sonuçlar Brambilla ve ark.nın (17)1999 yılında 9-13 yaş grubu 473 İtalyan çocukta mutans streptokok ve laktobasil ile çürük arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmasında da elde edilmiştir.

#### 4.3.3.2. *Actinomyces spp.*

Birçok yönüyle bakterilere, bazı yönleriyle mantarlara benzeyen ve filaman yapan *Actinomyces spp.*'ler, insan ve hayvan muköz membranlarında (ağız boşluğu, vajina) oluşan ilk bakterilerdendir. Bunlar gram pozitif, aside dirençli, fakültatif anaerob veya zorunlu anaerob, ekstrasellüler yerleşimli sporsuz basillerdir. Kolonilerinde in vivo sülfür granülleri oluşturur ve birçok besiyerinde anaerob şartlarda yavaş ürerler (60,168).

Ağız boşluğunda çok erken dönemde izole edilebilen *Actinomyces*'lerin en önemli özellikleri doku üzerine yapışması ve diğer bakterilerle birleşebilmesidir. Bu nedenle plak oluşumunun başlangıcından sorumlu tutulmaktadır.

Könönen ve ark.da bebeklerin ağızında ilk olarak kolonize olan bakterilerin *Actinomyces spp.* olduğunu belirtmişlerdir (87,137,142).

Sarkonen ve ark.(142), *Actinomyces* türlerinin oral kolonizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada 39 sağlıklı bebeğin tükürüğündeki *Actinomyces* türlerinin doğumdan 2 yaşına kadar geçen süreçteki dağılımını incelemişlerdir. Sonuçta toplam *Actinomyces* florasının yaşla birlikte % 31'den % 97'ye artış gösterdiğini, *A. odontolyticus*'un bu dönemde oral mukozadaki birinci *A. naeslundii*'nin ise ikinci en yaygın *Actinomyces* türü olduğunu vurgulamışlardır.

Aynı araştırmacının insanlardaki *Actinomyces* türlerinin fenotipik identifikasyonu konulu çalışmasında ağız boşluğunda 9 farklı *Actinomyces* türü olduğu ve bunlardan *A.israelii*'nin aktinomikoz ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu bakteri türü olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında *A. odontolyticus*, *A. naeslundii* ve *A. viscosus*'un yenidoğan ağızındaki birincil *Actinomyces* türleri olduğu ve erken dönem plak oluşumunda etkili oldukları; *A. radidentis*'in enfekte kök kanallarından ve *A.gravenitzii*'nin ise sıklıkla solunum yolu sekresyonlarından izole edildiği bildirilmiştir. Tanımlanan bu *Actinomyces* türlerinden *A.odontolyticus*, *A. radidentis*, *A.gravenitzii* ve *A.urogenitalis*'in kırmızıdan siyaha değişen pigmentler ürettikleri belirtilmiştir. (143).

Tang ve ark (167) Çinli okul öncesi çocuklarda yaptıkları PCR (southern hibridizasyonu) çalışmasında *Actinomyces* türlerinin (*A. bovis*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*) supragingival plaktaki dağılımlarını incelenmiştir. Çalışmaya aktif çürüklü ve çürüksüz 53 çocuk dahil edilmiştir. Çalışmanın sonucunda *A. gerencseriae*'nin aktif çürüklü grupta daha fazla oranda saptandığı belirtilirken, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* ve *A. naeslundii*'nin süt dişlerindeki supragingival plak oluşumunda önemli rol oynadığı vurgulanmıştır.

Diamanti-Kipioti ve ark'ı (38) *Actinomyces spp.*lerin sadece diş yüzeyine değil ortodontik bant ve braket yüzeylerine yapışarak subgingival florada anlamlı artışa neden olduklarını saptamışlardır.

1960 ve 70 lerde *Actinomyces spp.*lerin periodontal yıkımdan sorumlu olduğu düşünülürken Haffajee ve ark.(58) periodontal cerrahi ve sistemik tetrasiklin uygulamasının ardından *Actinomyces* türlerinde önceki duruma göre artış olduğunu belirtmiştir. Devam eden çalışmalarda da *Actinomyces spp.*lerin sağlıklı bireylerin dişeti ceplerinde periodontal hastalıklı bireylerdekine oranla daha yoğun olduğu rapor edilmiştir. Son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda ise *Actinomyces spp.*lerin bazı tiplerinin (*A. naeslundii*- *A. meyeri*) periodontal yıkımdan sorumlu olduğu saptanmıştır (188).

*Actinomyces spp*'ler , tükürük ve dişeti oluk sıvısındaki bazı komponentlerden enerji üretmek ve çoğalmak için gerekli enzimlere sahiptir. Bu enzimler levansukraz ve üreazdır. Levansukraz enzimi ile bakteri sukroz'u karbon kaynağı olarak kullanıp çoğalırken; üreaz enzimiyle de üre parçalanarak gerekli nitrojen kaynağı elde edilir. Açığa çıkan amonyak plak pH sınırın artmasına ve bu bölgeye daha az karyojenik olan bakterilerin (*S.salivarius*, *Actinomyces*) tutunabilip, çoğalmasına neden olur. Böylece plak pH'sındaki artışın minenin çözünürlüğünü dolayısıyla çürük oluşumunu azalttığı ve diş taşı oluşumunu da indirekt olarak arttırdığı düşünülmektedir. Bununla beraber üreden açığa çıkan amonyağın polimorf nüveli lökositlerin fagositoz, degranulasyon ve oksijen metabolizmasını inhibe etmesinden

ve subgingival plak oluşumunun artmasından dolayı periodontal hastalık oluşum riskini arttırdığı görüşü hakimdir (168,191).

*Actinomyces spp.*lerin sahip olduğu nöraminidaz enziminin ise, gerek kendilerinin gerekse bazı periopatojenlerin (*P. intermedia*, *P. gingivalis*) insan epitelyal hücrelerine bağlantılarını kolaylaştırırken, kommensal yapı gösteren bazı bakterilerin (*S. sanguis* ve *S. mitis*) bağlantısını engellediği saptanmıştır. (29).

*Actinomyces spp.*lerin çeşitli Gr (-) bakteriler ( periopatojen özellik gösteren *porhyromonas* ve *prevotella* türleri ) ile koagregasyonu sonucu subgingival plak oluşumunu arttırdığı dolayısıyla periodontal hastalıklara zemin hazırladığı düşünülmektedir (34,140).

**Tablo 4:** Tanımlanmış *Actinomyces* türlerinin günümüzdeki isimleri (137)

| Günümüzdeki ismi                  | Önceki Sınıflama   |
|-----------------------------------|--|
| <i>Actinomyces georgiae</i>       | <i>Subgingival Actinomyces</i> sp.                                 |
| <i>Actinomyces gerencseriae</i>   | <i>A. israelii</i> serotip 2                                       |
| <i>A. israelii</i>                | <i>A. israelii</i> serotip 1                                       |
| <i>A. odontolyticus</i>           | <i>A. odontolyticus</i>  |
| <i>A. naeslundii</i> genotipler 1 | <i>A. naeslundii</i> serotip 1                                     |
| <i>A. naeslundii</i> genotipler 2 | <i>A. naeslundii</i> serotip 2 & 3<br><i>A. viscosus</i> serotip 2 |
| <i>A. meyeri</i>                  | <i>A. meyeri</i>   |
| <i>A. bernardiae</i>              |  |
| <i>A. radingae</i>                |  |
| <i>A. neuii</i>                   |  |
| <i>A. europaeus</i>               |  |
| <i>A. graevenitzii</i>            |  |
| <i>A. turicensis</i>              |  |

#### 4.3.3.3. *Veillonella spp*

Gr (-) anaerobik kok grubunda yer alan *Veillonella*'nın ağız içinden izole edilen 3 türü vardır. Bunlar *V. dispar*, *V. parvula* ve *V. atipika*'dır. Çoğunlukla dil yüzeyinde ve yanak mukozasında bulunurlar. *V.dispar*, dil yüzeyinde yoğun olarak yer alması ve hidrojen sülfür üretebilmesi nedeniyle ağız kokusu oluşumundan sorumluyken; *V.parvula* dental plak oluşumunda etkili olan veillonella türüdür.

*Veillonella* türleri çoğalabilmek için gerekli karbon kaynağı olarak streptokokların ürettiği laktik asidi kullanır. Böylece streptokokların minenin demineralizasyonu üzerine etkisini dolayısıyla çürük aktivitesini azaltmış olur (9,27,76,97,180).

#### 4.3.4. Mikrobiyal dental plak ve bakteri tutunması (Aderans)

Adezyon, bir mikroorganizmanın konak dokuya tutunmasını, aderans ise adezyon yeteneğini ifade eder. Bir bakterinin konakta hastalığa sebep olabilmesi için herşeyden önce konak dokuya adezyonu şarttır. Bakterilerin ağızda tutunabilecekleri yüzeyler keratinize epitel, keratinize olmamış epitel, hidroksil apatit yüzeyler (diş sert dokuları ve seramik restorasyonlar) ve varsa protezlerin metal ve akrilik yüzeyleridir.

Bakteriler konak dokuya tutunabilmek için genellikle fimbriya (sinonimi=pili) ve kapsüllerini kullanırlar. Birçok oral patojenin ağız dokularına tutunması fimbriyaları ile olur. Ortamda mannoz varken fimbriyalar inaktive oluyorsa **Tip-1**, inaktive olmuyorsa **Tip-2 fimbria** adını alır. Birçok oral patojenin (*Actinomyces* ve *P.gingivalis*...) genellikle Tip-1 fimbriyaları vardır (26,135).

Oral patojenlerin ağız dokularına tutunmaları şu şekillerde olabilir:

#### **Doğrudan tutunma**

Bakteri hücresinin konak dokuya direkt bağlanabildiği ve bakteri-konak temasının pililer ile mümkün olduğu tutunmasıdır. *Actinomyces*'lerin Tip-1 fimbriyaları ile dişin mine dokusuna tutunması bu tutunmaya örnek teşkil eder (26,84).

## **Dolaylı Tutunma**

Konak reseptörleri ve bakteri yüzeyindeki moleküllerin yapısı birbirinin komplementeri olmadığı durumlarda, ikisi arasında adaptör rol üstlenen bir kimyasal madde veya bir başka bakteri hücresi ile adezyon gerçekleşir. Bu adaptör yapılar adezin, glukan kriptitop, koagregasyon köprüleri olabilir (26).

### **Kriptitop:**

Pelikülün yapısını oluşturan histatin (PRP- Statherin) oral patojenler tarafından üretilen proteaz ve nöraminidaz enzimleriyle parçalanır. Ve histatini oluşturan aminoasitler birbirlerinden ayrılarak konak doku yüzeyine dik gelecek şekilde serbest uçlar yaparlar. Bu uçlara **kriptitop** (kriptik, gizli kalmış yer) adı verilir. İşte bu kriptitoplar oral patojenlerin tutunma noktalarıdır. Moleküler seviyede düşünüldüğünde, kriptitoplar, diş yüzeyinde bakterilerin tutunabileceği çengel şeklindeki tutunma noktalarıdır. Aslında ağzın savunma komponenti olan histatinler bakterilerin enzimatik faaliyetleri ile bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştıran merkezler haline dönüşürler. *A.israelii*, *A. odontolyticus* ve *A. viscosus* sadece Tip-1 fimbriyaları ile dişe tutunabilirken, kriptitoplar açığa çıktıktan sonra Tip-2 fimbriyaları ile de kriptitoplara ve dolayısıyla dişlere tutunabilirler (23,26,103,184).

### **4.3.5. Mikrobiyal dental plak ve diş çürüğü**

Plağın kalınlığındaki artış, asit üretim miktarını ve plaktan dışarı ve içeri olan difüzyon oranını etkilediğinden çürük gelişiminde önemlidir. Plağın kalınlığı nedeniyle, plağın dişe bakan bölgelerine tükürük ulaşamaz ve demineralize edici organik asitler tamponlanamaz. Böylece plak hem derin tabakalarda asit üreten bir ortam oluşturması, hem de bu asiti nötralize eden tükürüğün ortama ulaşmasına engel olması nedeniyle çürük oluşumunda iki yönlü sorumluluk taşır (12,85).

MDP'nin diş çürüğü etyolojisiyle ilgili 3 hipotez söz konusudur.

**Spesifik Plak Hipotezi:** MDP'de bulunan bakterilerden sadece bazı bakteri gruplarının diş çürüğüne neden olduğu kabul edilir.

**Non-spesifik Plak Hipotezi:** Tüm plak mikroflorasının diş çürüğünde etkili olduğu düşünülür.

**Ekolojik Plak Hipotezi:** Potansiyel çürük yapıcı (kariyojenik) bakterilerin tüm plak bakterisine oranı düşüktür ve nötral pH'da, sağlıklı beslenmede minedeki de-mineralizasyon denge halindedir. Ancak fermente edilebilen karbonhidrat alımında

sıklık ve pH'da oluşan düşüş ile bu denge bozulur. Sonucunda kariyojenik bakterilerin sayısı, tüm plak florasına oranla az da olsa dengeyi demineralizasyon yönünde bozar ve çürük meydana gelir (112).

#### **4.4. Oral patojenlerin saptanmasında kullanılan yöntemler**

##### **1) Direkt İnceleme**

Mikroskopi

Gram Boyama

##### **2) Kültür ve Duyarlılık Testleri**

###### **a) Kültür Teknikleri**

Aerobik ve Anaerobik Teknikler

###### **b) Özelleştirme Teknikleri**

Gaz-sıvı Kromatografi

DNA-DNA Hibridizasyon

###### **c) Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

Broth Dilusyon Testleri

Broth Disk Testi

Bakteriyel Disk Difüzyon Testi

Antimikrobiyal Duyarlılık için Hızlı Test

##### **3) İmmunolojik Testler**

İmmunofloresans (IF)

Enzim Immunoassays (EIA)

Latex Aglutinasyon

İmmunodot/Blot

Flow Sitometri

Enzyme-linked İmmunosorbent Assay (ELISA)

##### **4)Diğer Testler**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Antikorların Tanımlanması (ELISA)

Bu yöntemlerden en güncel olanı kültür yöntemleri ile bakterilerin özgül DNA dizilerini taklit eden oligonükleotid primerlerin kullanıldığı 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'dur.

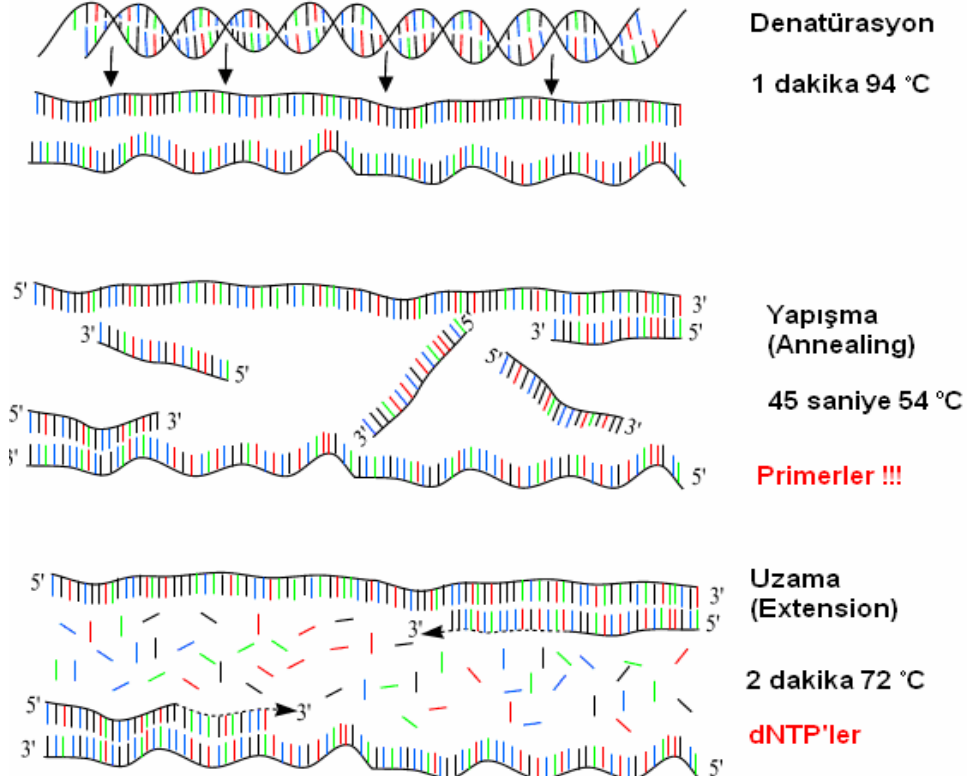


#### 4.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) (PCR)

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi *in vitro* koşullarda çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin (primer) bilinmesi gereklidir. Amplimer olarak da bilinen bu baz dizilerinin, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA bölgeleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridizasyonu yapılmaktadır.

Primerlerin hedef dizilere özgün bağlanması düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enziminin, uygun tampon ve deoksiribonükleozid trifosfat varlığında primerin 3' ucundan uzayarak yeni tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlediği gösterilmiştir. PCR'in bir döngüsünün, denatürasyon, yapışma (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere üç aşamadan oluştuğu ve döngülerin defalarca tekrarlanmasıyla sonuç elde edildiği bildirilmiştir. PCR basamakları için gereken en uygun ısılar, denatürasyon için 94 °C, annealing için 40-72 °C , polimerizasyon için 72 °C' dir. Bu üç basamak 25-40 kere tekrarlanır, daha sonra reaksiyonun soğuması için ürünler, PCR tipine göre 4 °C'ye alınır veya oda sıcaklığında bırakılır. Amaca uygun olarak PCR teknikleri modifiye edilmiş, Touchdown, Hot start, Multipleks, Nested, Kısmi Nested, Koloni, Arbitrary, Revers Transkriptaz, RealTime PCR gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir (47,59,141,170).

## PCR : POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU



Şekil 4: PCR çalışma protokolü (47)

### 4.4.2. PCR'nin temel bileşenleri

- Çoğaltılacak olan kalıp DNA,
- DNA'da çoğaltılması planlanan , bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak DNA primerleri,
- Primerlere bağlanıp 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid-trifosfatlar (dNTP),
- Polimerazın çalışması için gerekli, tampon görevi yapacak maddeler, tuzlar ve enzim çalışması için önemli bir yardımcı faktör olan Mg<sup>2+</sup> iyonlarıdır (81,170).

### **1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA**

PCR’da, genomik DNA’lar, plazmid ve faj DNA’ları, çeşitli genler ve herhangi bir DNA parçası da kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri, amaca göre, cDNA, genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden veya ticari olarak elde edilir (170).

### **2. Sentezde kullanılan primerler ve zellikleri**

Primer, sentetik olarak hazırlanan tek iplikiğe sahip, spesifik DNA segmentidir. Başarılı bir PCR’da, en önemli parametre, primerlerin dizaynıdır. İyi dizayn edilmemiş primer, non-spesifik amplifikasyon (oğalma) ve/veya primer-dimer formasyonu nedeniyle ürün oluşmamasına veya çok az oluşmasına neden olur.

Kalıp DNA ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20–30 nükleotid uzunluğunda düzenlenmiştir. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizinin bilinen kısımları dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primerlerin tasarımı yapılırken mümkün olduğunca dört nükleotid bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Doğru sonuç alınabilmesi için önem verilmesi gereken bazı noktalar; primerlerin polirin, poliprimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır (81,170).

### **3. Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleri**

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan (dNTP) uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler.

Bu enzimler, sentezi başlatmak için, kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yn, 5' uçtan 3' uca doğrudur. Primerlerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP’lerin nükleofilik etki yapmaları ile birlikte fosfodiester bağlarının katalizi sonucu yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (81,170).

#### 4.4.3. Real Time PCR (RT-PCR)

Real Time PCR hedef DNA parçasının hem amplifikasyonu hem de miktarının saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Kantitatif Real Time PCR (Quantification: QRT-PCR) veya kinetik PCR veya homojen PCR olarak adlandırıldığı da olmuştur. İşlem sırasında PCR protokolü kullanılırken DNA miktarının her amplifikasyon sonrası ölçülmesi reaksiyona “Real Time” yaklaşımını kazandırmaktadır. DNA ölçümü sırasında çift sarmal DNA’ya yapışan floresan boyalar veya DNA ile birleştiğinde floresan veren modifiye oligonükleotitler kullanılmaktadır. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA molekülü (amplikon) ile doğru orantılı floresan meydana gelmektedir. PCR duyarlılığını arttırmak için ısı kontrol mekanizması geliştirilerek, amplifikasyonun 30 siklusunun 10–30 dk gibi kısa sürede gerçekleşmesi sağlanmıştır. RT-PCR sonunda oluşan ürünlerin varlığını göstermek için bir jel elektroforezi basamağı kullanılmamakta, amplifikasyon floresan sinyallerinin ölçümü ile monitorize edilmekte ve aynı zamanda aranan hedef molekülün örnek içindeki miktarı verilmektedir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşmaktadır. Önemli artışı işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilmektedir. CT (**threshold cycle**) parametresi ise tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir. Ayrıca bu sistemde kapiller tüplerin kullanılması ile bir siklus 30 saniyeden daha az bir zamana düşürülmüş ve kontaminasyon riski ise kapalı tüp sistemi kullanımı ile ortadan kaldırılmıştır (185, [www.dorak.info/genetics/realttime](http://www.dorak.info/genetics/realttime), Erişim tarihi: 01. 03.2009).

#### 4.4.4. RT-PCR’nin Kültür Yöntemine Göre Sağladığı Avantajlar

1. Hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türlerini saptayabilmektedir.
2. Yüksek özgüllük gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin tanımlanmasına olanak sağlar.
3. Klinik örneklerdeki mikrobiyal türleri üretilmelerine gerek duymaksızın saptayabilmektedir. Başka bir deyişle mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla onların canlılıklarına gerek duymamaktadır.
4. Kültür yöntemine ve diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre daha duyarlıdır.
5. Hızlı ve kolay uygulanabilirdir.

6. Kapalı sistemlerde gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riski minimumdur
- 7.Örnekleme ve taşıma sırasında kontrollü anaerobik ortamlara gereksinim göstermemektedir. Zor üreyen bakteriler taşıma sırasında canlılıklarını yitirseler bile saptanabilmektedir.
8. Antimikrobiyal tedavi sırasında da kullanılabilir.
9. Az sayıda mikroorganizmayı bile saptayabilen bir yöntem olduğu için örnek miktarının az olması sorun yaratmaz.
10. Epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örnek kullanıldığında örnekler düşük sıcaklıklarda saklanıp bir seferde incelenebilir(67, [www.dorak.info/genetics/realtime](http://www.dorak.info/genetics/realtime), Erişim tarihi: 01. 03.2009).

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Renklenme

Renk, gözle görülebilir dalga boyundaki ışığın, gözümüzde oluşturduğu algılamadır. On milyondan fazla farklı rengi algılama özelliğine sahip olan insanoğlu, kendi dışında de bu renklere 100,000 tanesini ayırdedebilmektedir. Bu ayırım bireyler hatta aynı bireydeki farklı dişler arasında bile değişiklik gösterir (19). Diş rengi, dişlerin optik özelliklerinin bir kombinasyonudur. Işık ile diş arasındaki etkileşim sonucu, ışığın diş geçmesi, yüzeyde yansması, dokularda absorpsiyon ve ışığın dağılması gibi dört farklı olgu gözlenir (122).

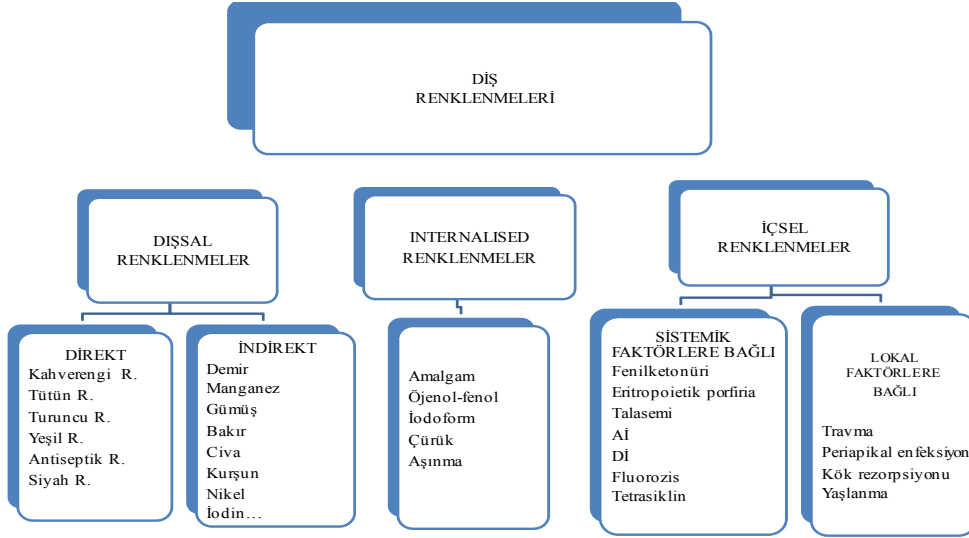
Sağlıklı dişin rengini etkileyen 3 faktör vardır:

- a) Kuru kaplayan mine ve dentinin rengi
- b) Kalsifikasyon derecesine göre değişen mine saydamlığı
- c) Okluzal-insizal kenarda en kalın, servikal 1/3'e doğru incelen mine kalınlığı (36).

Doğal diş rengi dişin kuronunu oluşturan mine, dentin ve pulpasının ışığı emme ve yansıtmasına bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu yapılarda, oluşum sırası veya sonrasında meydana gelebilecek değişiklik ışığın geçirgenlik (**transmission**) özelliklerini etkileyerek renklenmeye yol açar.

Diş renklenmeleri, gerek hasta gerekse hekimlerin üzerinde oldukça fazla zaman ve para harcadıkları kozmetik problemlerin başında gelmektedir. Çünkü hasta ve tüketiciler sağlıklı bir ağız-diş sağlığının yanısıra mükemmel bir gülüşe de sahip olmak isterler. Günümüzde diş beyazlatma ajanlarının tüketiminin hızla artması da bunu doğrular niteliktedir (75,159).

Diş renklenmeleri etiyojisi, görünüm, kompozisyon, lokalizasyon olarak farklılıklar gösterse de temel olarak içsel ve dışsal renklenmeler olmak üzere iki grupta toplanır. Ancak son yıllarda literatüre geçen 'internalized renklenmeler' ile bu temel sınıflama biraz daha genişletilmiştir (116,159,182).



**Şekil 1:** Diş renklenmelerinin sınıflaması

#### 4.1.1. İçsel renklenmeler

Mine ve dentinin diş oluşumu ve sürme sırasında kromojen materyaller tarafından etkilenmesi ile oluşan bu tür renklenmeler, sistemik ve lokal faktörlere bağlı olarak gelişir.

##### 4.1.1.1 Sistemik faktörlere bağlı içsel renklenmeler

**1.Fenilketonüri (Alkaptanuri):** Tirozin ve Fenilalanin gibi bazı aminoasitlerin oksidasyonundaki eksiklik nedeniyle oluşan asit dişlerde renklenme meydana getirir.

**2.Eritroblastozis fötalis:**Yeni doğanda görülen bir kan hastalığı olup doğum sırasında kalsifiye olan dişleri yeşilimsi-mavi, mavimsi-siyah veya kahverengiye boyar. Çocuk büyüdükçe renklenme kendiğiliğinden kaybolur.

**3.Konjenital eritropoietik porfiriya:** Porfirin metabolizmasındaki bozukluk sonucu kemik ve dişlerde hemato porfiri depolanarak dişlerde kırmızı-kahverengi renklenme oluşturur (eritrodonti).

**4.Talasemi:** Akdeniz anemisi olarak da bilinen bu genetik hastalıkta kan pigmentleri dentin tubullerinde birikerek dişlerde renklenmeye neden olur.

**5. Amelogenesis imperfekta (AI):** Süt ve sürekli dişlerde mineyi etkilemesiyle karakterize genetik bir hastalıktır. Bu hastalık hipoplastik, hipokalsifiye, hipomature ve taurodontizm ile beraber gözlenen hipomature-hipoplastik olmak üzere dört tipe ayrılır. Beyazlatma tedavilerine yanıt vermeyen bu tip dişlerde sarıdan kahverengiye değişen renklenmeler gözlenir.

**6. Dentinogenesis imperfekta (DI):** Süt dişlerinin sürekli dişlerden daha çok etkilendiği bu kalıtsal gelişim bozukluğunda mine dentinden kolayca ayrılabilir. Açığa çıkan dentin kanalları yoluyla gıda artıkları ve kromojen bakteriler dişin sarı-kahverengi renklenmesine neden olur.

**7.Mine displazileri:** Displaziler matriks oluşumunu ve kalsifikasyonu etkilerler. Dişlerin gelişim döneminde herhangi bir nedenle oluşan kalsifikasyon defektlerinde dişler sürdükten sonra ağıza giren yiyecek, içecek ve debris birikimi sonucunda oluşan pigmentasyonlara 'Dismineralizasyon' denir. Bunlar opak beyaz lezyonlar (White Spot) veya renklenmeler olabilir.

**8.Fluorozis:** Bir mine displazisidir.Simetrik olarak gözlenen renklenmeler opak noktalar veya olgunun şiddetine göre sarıdan kahverengi şeritlere kadar değişebilir. Mine yüzeyinde kahverengi pigmentasyonlarla kendini belli eden basit fluorozis beyazlatma tedavisine çok iyi yanıt verir.

**9.Tetrasiklin:** 1948 yılında kullanılmaya başlanan 1958 yılında ise dişlerde renklenmelere neden olduğu saptanan Tetrasiklin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Tetrasiklin plasental bariyeri aşabilir. Bu nedenle gebe, emzirenlerde ve en az 7-8 yaşına kadar olan çocuklarda kullanılmamalıdır.

Tetrasiklin renklenmesi gösteren diş güneş ışığı görürse rengi daha da koyulaşır. Bu nedenle kesici dişlerin dudak yüzeyleri kısa sürede gri ve kahverengine dönerken azı dişleri uzun süre sarı olarak kalır. Tetrasiklin renklenmesinin tipik görünümü bantlaşma özelliğine dayanır. Bant yapısının nedeni aralıklı ilaç kullanımına bağlıdır. Tetrasiklin renklenmelerinin şiddeti kullanılan ilacın dozuna, kullanım süresine ve ilacın tipine göre değişebilir (19,36,65,182 ).



#### 4.1.1.2. Lokal faktörlere bağlı içsel renklenmeler

**1. Travma:** Burada başlıca neden pulpa içi kanamalardır. Pulpadaki kanama ile kan pigmentleri dentin kanallarının içerisine girerler. Böylece oluşan renklenme başlangıçta pembe, daha sonra kırmızı- kahverengidir. Eğer pulpa nekroze olmamışsa diş birkaç hafta içinde ana rengine döner.

Pulpanın nekroz olduğu durumlarda ise eritrositler'in hemoliziyle hemoglobinin parçalanarak demir (Fe) açığa çıkar. Nekroza neden olan bakterilerin ürettiği hidrojen sülfür açığa çıkan demir ile birleşerek siyah renkte demir sülfür oluşturur ki bunun sonucunda diş klinikte gri-kahverengi-siyah görünür.

**2. Süt dişi periapikal iltihapları:** Süt dişinin periapikal iltihabı yakınındaki sürekli diş germini etkileyerek displazilere neden olur. 'Turner dişi' olarak adlandırılan bu dişler genelde tek taraflı olup küçük azılarda daha yoğun gözlenir.

**3. Kök rezorpsiyonu:** Pulpal ya da periodontal kaynaklı (içsel ya da dışsal) olabilir. Klinik olarak sıklıkla asemptomatik olup mine sement birleşiminde pembe renkte noktasal lezyon (pink spot) ile karakterizedir.

**4. Yaşlanma:** Yaşla birlikte mine ve dentinin ışığı yansıtma özelliklerindeki değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkar. Dişler daha koyu sarı- kahverengimsi görünüm alır. Nedeni, sekonder ve tersiyer dentin yapımının yaşla orantılı olarak artmasıdır (19,36,65,159,182 ).

#### 4.1.2. Dışsal renklenmeler

Dişin diş yüzeyinin kromojenler tarafından etkilenmesiyle meydana gelir. Mine defektleri, pelikül, tükürük yapısı, tükürük akış hızı ve ağız hijyen eksikliği dışsal renklenmelerde hazırlayıcı faktörlerdir (65).

Dışsal renklenmelerin fiziksel özellikleri incelendiğinde fırçalamanın yetersiz olduğu bölgelerde (diş-dişeti sınırı ve ara yüzeyler ) yaygın ya da bölgesel dağılım gösterdiği ve etiyolojisine bağlı olarak siyah, kahverengi,yeşil, turuncu ve sarı renklenmelere neden olduğu belirtilmiştir. Dışsal renklenmeleri içsel renklenmelerden ayırt etmede kullanılan en etkin yöntem 'kazıma testidir (*scratch test*). İçsel renklenmede, renkli alanın kazıma yapılarak uzaklaştırılması söz konusu değildir (116).

Dışsal renklenmeler her iki dişlenme dönemini (süt-sürekli) etkileyebilir. Çocuklarda görülen dışsal renklenmelerin etiolojisinde kötü ağız hijyeni, demir preparatlarının kullanımı ve kromojen bakteriler (*Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas* türleri) ön plandadır (139,155).

Dışsal renklenme:

- 1-Plaktaki kromojen bakteriler tarafından,
- 2-Renklenmeye neden olabilecek materyalin ağız boşluğu ile teması ve dokuya tutunması ,
- 3-Pelikül içeriğinin kimyasal değişimi sonucu oluşabilir (94).

Dışsal renklenmeler 2 grupta incelenir:

Direkt dışsal renklenme ( Metalik kaynaklı olmayan)

İndirekt dışsal renklenme ( Metalik kaynaklı)

#### **4.1.2.1 Direkt dışsal renklenme (metalik kaynaklı olmayan)**

Kromojenlerin direkt plak ya da kazanılmış pelikula etki ederek oluşturduğu dışsal renklenme tipidir. Etiolojisinde diyet içeriği, tütün, çay, kahve, ağız gargaraları, kromojen bakteriler ve diğer medikamentler yer alır (159,182).

Renklenmeye eğilimi arttıran en önemli unsur protein denaturasyonudur. Denaturasyon işlemi ile yapıdaki sülfat-hidrojen (S-H) bağları koparak sülfat serbestlenir. Gerek klorheksidin ve diğer kimyasal plak önleyici ajanlar gerekse çay, kırmızı şarap gibi tannin içerikli içecekler güçlü denatüranlardır (46).

Direkt dışsal renklenmelerin oluşumundan sorumlu tutulan ferrik sülfid'i inhibe etmek amacıyla klorheksidin ve diğer denatüranlar ile birlikte çinkoasetat, bakır klorid ve krom florid gibi bileşikler kullanılmıştır. Sonuçta çinkoasetatın renklenme üzerinde etkisi olmadığı bildirilmiştir. Ancak diğer 2 bileşiğin redoks tepkimesi sonucu sülfür ile birleşip, ferrik sülfid oluşumunu önlediği, bunun sonucunda renklenmenin azaldığı vurgulanmıştır (41).

#### **Kahverengi dışsal renklenme**

Üst çene büyük azıların yanak yüzeyi ile alt çene kesici dişlerin dil yüzeyinde bakteri içermeyen, ince renkli alanlardır. Çay, kahve gibi içeceklerdeki tannin maddesinin dişlerde birikmesi ile meydana geldiği düşünülmektedir.

### **Tütün renklenmesi**

Tütün, dişlerde servikal 1/3 ile 1/2 oranında koyu kahverengi, siyah renklenmeye yol açar. Renklenmenin yoğunluğu tütün ürünlerinin kullanım sıklığının yanı sıra mine yüzeyinin pürüzlülüğüne bağlı olarak değişebilir.

### **Yeşil dışsal renklenme**

Üst çene kesici dişlerin dudak yüzeyinde kolenin 1/3'ünü kaplayan bant şeklindeki oluşumlardır. Çocuklarda daha sık görülür. Yeşil renklenmeye primer mine kütikül artıklarının neden olduğu düşünülmeyle birlikte henüz kesinlik kazanmamıştır. Yeşil dışsal renklenmeden *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi floresan bakteri ve mantar sorumlu tutulur.

### **Turuncu dışsal renklenme**

Yeşil ve kahverengi renklenmelere oranla daha az sıklıkta görülen turuncu renklenmeye, kesici dişlerin dudak yüzeyinin diş etine yakın bölgesinde rastlanılır. Etiyolojisinde kromojen bakterilerden *Serratia marcescens* ve *Flavobacterium lutescens*'in rol oynadığı turuncu renklenme, ağız hijyeni kötü olan bireylerde daha sık görülür.

### **Antiseptiklere bağlı dışsal renklenme**

Klorheksidin, aleksidin, cetylpyridinium chloride gibi antiplak ajanların uzun süreli kullanımı sonucu dil, diş ve kompozit restorasyonlarda kahverengi renklenmelerin oluştuğu gözlenmiştir (19,36,65).

Araştırmacılar, klorheksidin içeriğine beyazlatma ajanı olarak kullanılan % 1-2'lik peroksi-monosülfat (Caroat) eklenmesi durumunda renklenmenin azaldığını belirtmişlerdir. Caroat'ın bu sonucu, klorheksidinin antiplak özelliğini değiştirmeksizin sadece renklenmeden sorumlu olduğu düşünülen sülfid gruplarına etki ederek oluşturduğu düşünülmemektedir (45,46,156).

### **Siyah dışsal renklenme (SDR)**

Süt ve sürekli dişlerde dişeti kenarına paralel seyreden noktasal, ince çizgi ya da geniş bant şeklinde görülen renklenmedir. Konu ile ilgili yaptığımız kaynak taramasında çeşitli ülkelerde siyah dışsal renklenme görülme sıklığı ile ilgili çalışmaların mevcut olduğunu saptadık (Tablo 1) (53,68,82,83,160).

Ancak ülkemizde bu konuyla ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla yaptığımız ön çalışmada, SDR görülme sıklığını %18 olarak belirledik (52).

**Tablo 1:** Değişik ülkelerde siyah dışsal renklenme ile ilgili prevalans çalışmaları

| <b>Araştırmacı</b> | <b>Yıl</b> | <b>Ülke</b> | <b>Yaş</b> | <b>Görülme sıklığı (%)</b> | <b>Çocuk sayısı (n)</b> |
|--------------------|------------|-------------|------------|----------------------------|-------------------------|
| Gülzow             | 1963       | İsviçre     | 7-15       | 19,90                      | -----                   |
| Sutcliffe          | 1967       | -----       | 11-13      | 21,00                      | 1000                    |
| Surdacka           | 1987       | Polonya     | 4-16       | 4,50                       | 3125                    |
| Koch               | 1996       | Almanya     | 6-11       | 4,00                       | 801                     |
| Koch               | 2001       | İtalya      | 6-12       | 6,30                       | 1086                    |
| Gasperetto         | 2003       | Brezilya    | 6-12       | 14,80                      | 263                     |
| Paredes            | 2005       | İspanya     | 4-11       | 7,54                       | 1,100                   |
| Heinrich-Weltzien  | 2008       | Finlandiya  | 11-12      | 16                         | 1748                    |

Diğer taraftan SDR'yi mikrobiyolojik açıdan irdeleyen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (11,96,130,139,151,155,171). Bu çalışmaların sonucuna göre SDR'nin bakterilerin ürettiği hidrojen sülfür ile tükürük ve diş eti oluk sıvısındaki demirin reaksiyonu sonucu oluşan ferrik sülfid'den kaynaklandığı günümüzde de kabul edilen en önemli görüştür. Etken bakterilerin araştırıldığı çalışmalarda kesin olmamakla birlikte *Actinomyces spp*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* sorumlu tutulmaktadır (130,139,145,155).

#### **4.1.2.2 İndirekt renklenme (metalik kaynaklı)**

Endüstriyel alanda çalışanların metal tozlarına (demir, manganez, gümüş, bakır, nikel civa, kurşun) maruz kalmaları sonucu veya ağız yoluyla alınan terapötik ajanlara bağlı olarak ortaya çıkabilen dışsal renklenmedir.

Demir, manganez ve gümüş dişlerde siyah; civa ve kurşun tozları gri renklenmeye yol açarken; bakır ve nikel dişleri mavi-yeşil, kromik asit ise turuncuya boyar. Anemi tedavisinde kullanılan demir içerikli preparatlar ve gümüş nitrat dişlerde siyah, iyodin solüsyonları kahverengi, potasyum permanganat içerikli ağız gargaraları ise mor renklenmeye yol açar (19,36,65,182).

#### **4.1.3. İnternalized renklenme**

Diş hekimliği literatürüne yeni girmiş bir terminoloji olan internalised renklenme , diş gelişimini takiben dışsal renklenmenin dişteki defekt yoluyla diş yapısına dahil olduğu renklenme tipi olarak tanımlanır. Diş aşınması, çürükler ve restoratif materyallerin neden olduğu renklenmeler bu grupta yer alır (159,182).

#### **Restoratif materyaller**

Poliantibiyotik patlar, iyotlu solüsyonlar, civa içerikli antiseptikler, amalgam iyodofom patı dişlerde renklenmeye neden olurlar. Metalik bileşenlere bağlı renklenmeler beyazlatma tedavilerine yanıt vermezler.

Öjenol ve fenol içeren patlar dişlerde sarı- turuncu ; amalgam restorasyonlar gri-siyah renklenmeye neden olurlar. Kompozit restorasyonlar da mikrosızıntı varlığında dişlerde renklenme görülür (19,36,68,126,186).

## **Çürük**

Diş çürükleri, lezyonun derinliğine (içinde bulunduğu gelişim basamağına ) göre farklı renklerde olabilmektedir. Derin dentin çürüklerindeki kahverengi-siyah renklenmenin **Maillard reaksiyonu** sonucu oluşan Maillard pigmentlerine bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (19,36,68,186).

## **Aşınma**

Diş aşınması, erozyon, abrazyon ve atrizyona bağlı olarak mine ve dentindeki madde kaybı olarak tanımlanır. Minenin aşınmasıyla alttaki dentin dokusu daha belirgin hale gelmesi sonucu kromojenlerin dişe nüfuz etmesini kolaylaştırır (19,36,65,182).

### **4.1.4. Renklenme Tedavisi**

Renklenmenin etiyojisine bağlı olarak aşağıda belirtilen tedavi seçenekleri uygulanır:

#### **Diyet ve alışkanlıklar**

Dişlerde renklenmeye yol açan gıdalardan (çay, kahve..) uzak diyet ve tütün ürünlerinin kullanımının kısıtlanması önerilmektedir. Mesleki olarak metal tozlarına maruz kalan bireylerin mutlaka maske takarak önlem almaları gerekmektedir.

#### **Diş fırçalama**

Doğru fırçalama teknikleri ile birlikte gerektiğinde aşındırıcı veya beyazlatma özelliği fazla olan diş macunlarının kullanımı önerilmektedir.

#### **Profesyonel diş temizliği**

Bazı dışsal renklenmeler ancak döner aletler ve aşındırıcı özelliği olan profilaktik pat ile giderilebilmektedir. Bu uygulama mine kalınlığında azalmaya neden olduğundan sık tekrarlanan uygulamalar tercih edilmemektedir.

#### **Mine mikroabrazyonu**

Zayıf hidroklorik asit ve silikon karbid partiküllerinden oluşan suda çözünen patın döner alet yardımıyla uygulandığı tekniktir. İçsel diş renklenmelerinde (özellikle fluorozis) kullanımı uygundur. Tek başına yada beyazlatma tedavisiyle birlikte kullanılabilir.

## **Beyazlatma**

Beyazlatma tedavisinde hidrojen peroksit, karbamid peroksit ve sodyum perborat gibi oksitleyici ajanlar kullanılır. Süt dişlerinde beyazlatma tedavisi önerilmez.

2 tip beyazlatma vardır:

a)Vital beyazlatma

b)Vital olmayan beyazlatma

Beyazlatma tedavilerine sarı-kahverengi renklenme (protein renklenmeleri) olumlu, gri-siyah (demir renklenmesi) ve mavimsi-gri (tetrasiklin renklenmesi) renklenmeler ise daha zor yanıt verir.

## **Dental restorasyonlar**

Beyazlatmanın uygulanamadığı yada yeterli olmadığı generalize içsel renklenmelerde parsiyel laminate veneer, tam estetik restorasyonlar, parsiyel- tam hareketli protezler uygulanır.

Diş çekimi ve implant destekli protezler A.İ veya D.İ olgularında tedavi seçenekleri arasında yer alır (19,36,65, 182).

### **4.1.5. Dışsal renklenmelerin tanısında kullanılan skala-indeksler**

Dışsal renklenmelerin tanısında kullanılan skala ve indeksler

- Kısa sürede uygulanabilecek kadar basit, düşük maliyetli ve hassas olmalı,
- İstatistiksel olarak analiz edilebilmelidir (148).

Yapılan literatür taramasında çalışmalarda,

- Synder(1964) ‘Diversified Dental Index (Pigmentation)’
- Davies (1968)
- Lobene (1968)
- Horowitz& Chamberlin (1971)
- Davis & Rees (1975)
- Nathoo (1997)
- Koch (2001) indekslerinin kullanıldığı görüldü (49,51,83,116,148).

Sık kullanılan bazı indekslerin açıklamaları aşağıdadır:

**Lobene İndeksi (49,51)**

0: renklenme yok

1: Hafif renklenme

2: Orta renklenme

3: Ağır renklenme

**Nathoo İndeksi (116)**

N1: Kromojenlerin (çay, kahve, şarap, kromojenik bakteri) diş yüzeyine yapıştığı hafif renklenme

N2: Kromojenlerin (çay, kahve, şarap, kromojenik bakteri) diş yüzeyine yapışıp zamanla koyulaştığı renklenme

N3: Renksiz materyal veya prekromojenlerin (kalay florid, klorheksidin) dişe yapışıp kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşturduğu renklenme

**Koch İndeksi (83)**

0: renklenme yok

1: noktasal ya da dişetine paralel **kesintili** ince çizgi şeklinde renklenme

2: servikal 1/3 ü aşmayacak şekilde dişetine paralel **kesintisiz** çizgi halinde renklenme.

3: servikal 1/3 ü aşan, dişetine paralel kalın renklenme.

## **4.2. Tükürük**

Büyük ve küçük tükürük bezleri tarafından salgılanan tükürük, dişeti oluk sıvısının yanısıra ağız florası, epitel hücreleri ve gıda artıklarını da içeren önemli bir diş salgıdır. Ağızda ortalama 1,1 ml bulunur ve tüm ağız içi yapıları 0,1 ml (100 mikron) kalınlığında ince bir film tabakası (biyofilm) oluşturarak kaplar. Yarı sıvı karakterli ve seyreltik bu salgının %99,5'ni su %0,3'ünü organik elementler ve %0,2'lik kısmını ise inorganik ve eser elementler oluşturmaktadır (40,144).

Inorganik içeriğin ana elemanları arasında sodyum, potasyum, klor, kalsiyum magnezyum, fosfat, iyot ve fluor yer alırken; organik içerikte salgısal proteinler ön plandadır. Bunlar amilaz, immunglobulinler (IgA, IgG, IgM), antibakteriyel



proteinler (lizozim, laktoferrin, sialoperoksidaz), glikoprotein (statherin, sialin, prolinden zengin proteinler) serbest aminoasitler, karbonhidrat ve besin artıklarıdır.

Bikarbonatlar, fosfat ve üre tükürüğün pH'sının ve tamponlama kapasitesinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Makromoleküllü proteinler ve musinler temizlenmeyi, çökmeyi ve/veya oral mikroorganizmaların yapışmasını yani dental plak metabolizmasını düzenlemektedir. Kalsiyum, fosfat ve proteinler mineralizasyonda görevlidir. İmmunglobulinler, proteinler ve enzimler ise antibakteriyel etki göstermektedir (40,42,70).

#### 4.2.1. Tükürük Eser Elementleri

Biyolojik yapı ve sıvılardaki oranı oldukça düşük ( $\mu\text{g/g}$ ) olan, demir (Fe), magnezyum (Mg), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), çinko (Zn), selenyum (Se), stronsiyum (Sr), gümüş (Ag) gibi eser elementlerin tükürükteki dağılımı ağız içi dokuların fonksiyonel devamlılığının korunmasında, amilaz aktivitesinde, diş-kemik gelişimi ve mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır (28,192)

Eser elementler ağız içi etkilerini 2 şekilde gösterir. Minenin kimyasal yapısına dahil olabilirler, bakteri plağı ile tükürük yapısına girip mikroorganizmaların ekolojisini etkiler ve ağız florasını değiştirebilirler. Minenin inorganik bölümü, apatit kristallerinden oluşmuştur. Böyle bir yapı iyon alışverişi için çok uygun olduğundan, eser elementlerin üçte birinden fazlası bu yapıya girerek minenin asitler karşısında çözünürlüğünü, dolayısıyla dişin çürük oluşumuna direncini değiştirir (176). Bu nedenle bazı tükürük ve plak minerallerinin çürük aktivitesini belirlemede önemli rol oynadığı belirtilmektedir (125).

Ayrıca bakır, demir, fluor, mangan, gümüş, kurşun gibi eser elementlerin gıda, tükürük ve dişeti oluk sıvısı yardımıyla oluşturdukları sülfid formlarının dişlerde renklenmelere neden olduğu bilinmektedir (73).

Eser elementlerinin çürük, yaş ve cinsiyet ile ilişkisinin araştırıldığı birçok çalışmada farklı ve birbirleriyle çelişen sonuçlar rapor edilmiştir (10,14,20,21,28,31, 39,133).

İngiltere'de 272 çocukta yapılan çalışmada tükürük Zn, Cu, Fe, Mn ve F düzeyi ile çürük arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çürük ile Cu ve F arasında negatif

korelasyon saptanırken; Zn, Fe ve Mn ilişkili bulunmamıştır. İtalya’da yapılan benzer çalışmada ise kızların erkeklerden daha düşük tükürük elektrolit seviyesine sahip olduğu bununla beraber çürüklü bireylerin tükürük Zn/Cu oranının çürüksüzlere kıyasla azaldığı vurgulanmıştır (14).

Zahir ve ark.nın (192) kariyojenik ve kariyostatik etkili eser elementleri inceledikleri çalışmanın sonucunda, Cu’nun hafif kariyostatik, Pb ve K’nin kariyojenik olduğu; Na’nın ise çürükle ilişkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Eser elementlerden Cu, Fe ve F’nin asit oluşumu ve çürük üzerine etkisi araştırıldığında, şeker ile kristallendirilmiş Cu, Fe ve F’nin laktik asit oluşumu ve bakteri kolonizasyonunu azaltarak, şekerin kariyojenik potansiyelini zayıflattığı sonucuna varılmıştır (134).

#### **4.2.1.1. Eser elementlerin analizinde kullanılan yöntemler**

- Nötron Aktivasyon Analizi (NAA)
- X-Işınları Floresansı (XRF)
- Total Refleksiyon Floresansı (TXRF)
- Atomik Emisyon Spektrometresi (AES)
- Atomik Absorpsiyon Spektrometresi (AAS)
- Atomik Floresans Spektrometresi (AFS)
- İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP-AES, ICP-MS) (107,183) .

#### **4.2.1.2. İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP)**

Katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir. Teknik elektromanyetik indüksiyonla bir radyofrekans güç kaynağı vasıtasıyla kuartz tüp içinde yaratılan 10.000 Kelvin sıcaklığındaki argon plazmaya beslenen analiz edilecek çözeltide bulunan elementlerin iyonize edilmesi; iyonize elementlerin atomlarının yaydıkları emisyonun belirlenmesi ve element derişimlerinin elektron çoklayıcı bir dedektör

tarafından ölçülmesi aşamalarını içerir. Örnekteki tüm elementlerin derişimleri 1 ile 2 dakika arasında değişen oldukça kısa bir sürede ölçülür.

ICP'nin iyonizasyon sonrası açığa çıkan ışımının (emisyona) dalga boyuna göre kalitatif ve kantitatif analiz yapan türü ICP-AES (İndüktif eşleşmiş plazma ile birleştirilmiş atomik emisyon spektrometresi) veya ICP-OES olarak adlandırılır. ICP-MS (İndüktif eşleşmiş plazma ile birleştirilmiş kütle spektrometresi) ise iyonizasyon sonrası açığa çıkan atomik emisyon yerine iyonları kütlelerine göre ayıran bir sistemdir (109).

#### 4.2.1.3. ICP-AES

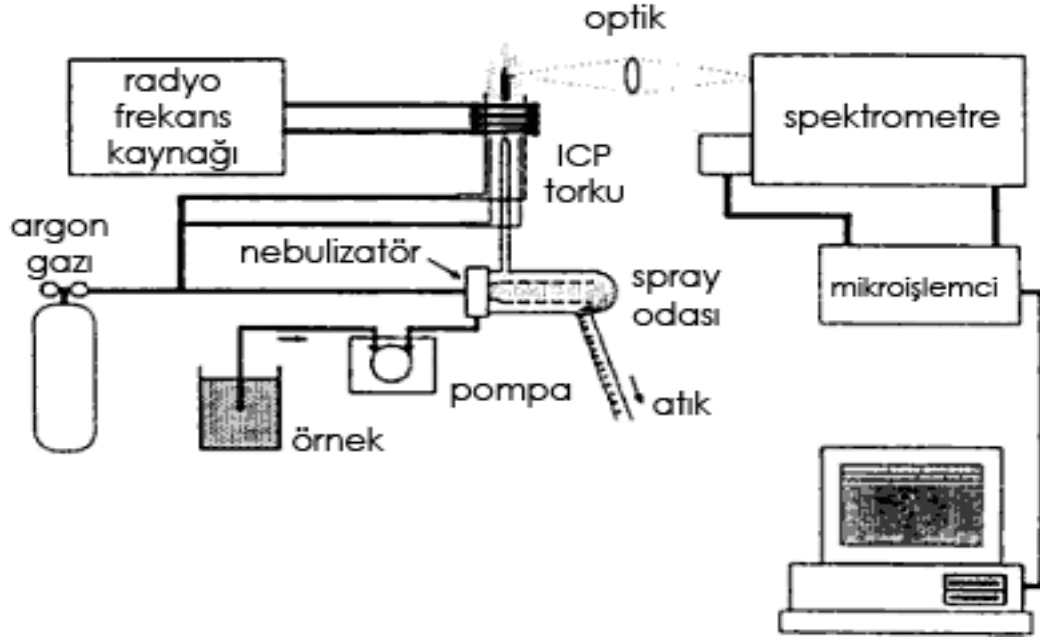
Birçok elementin aynı anda nicel tayininde kullanılan analitik metotlardan birisidir. Düşük derişim seviyelerinin tayininde başarılı bir yöntemdir. ICP kaynağı, argon gibi inert gazlardan yüksek enerjili ve yüksek frekanslı iyonlaşmış bir plazmayı üretir. Bir numune plazmanın merkezine enjekte edildiğinde, 10000 Kelvin sıcaklıktaki plazma, numunedeki elementlerin ayrışma, atomlaşma ve uyarılma işlemlerinin gerçekleşmesini sağlar. Bu olaylar, çalışılan elementlerin kendilerine özgü frekansta ışığı yayması ile sonuçlanır. Bu ışık şiddeti, numune içerisindeki elementlerin derişimi ile doğru orantılıdır ve bir emisyon spektrometresi ile ölçülür. Spektrometre özgün frekansları farklı dalga boylarına ayırabilme ve nicel sonuç alabilmeyi sağlar.

ICP-AES' in bazı avantajları;

- \_ Geniş doğrusal çalışma aralığı
- \_ Düşük gözlenebilme sınırı
- \_ Kimyasal girişimin olmaması
- \_ Elementler arası en düşük etki
- \_ Sonuçlarda kesinlik ve doğruluktur (51,83).

Slovakya'da farklı kimyasal analiz yöntemiyle (AAS, ICP-AES, ICP-MS) gerçekleştirilen çalışmada çekilmiş çürüksüz dişlerin tüm minesinde ve yüzey tabakalarında 7 eser elementin (Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Pb, Sr) tayini yapılmıştır. Çalışmanın sonunda Sr ve Mg hariç tüm elementlerin minenin ilk tabakasında daha yoğun konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. Yine Mg ve Sr düzeylerinin mine dentin bağlantısına yaklaştıkça artış göstermesine karşın diğer elementlerin

düzeylerinde azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Çalışmadan elde edilen en önemli bulgu ise birçok elementin 150µ kalınlıkta sabit konsantrasyonlara ulaştıkları bunun da tükürük-diş etkileşiminden kaynaklandığıdır. Böylece mine de ve remineralizasyonunda en efektif kalınlığın 150µ olduğu hipotezi de desteklenmiştir (137).



Şekil 2: ICP-AES düzeneği (50)

|                  |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
|------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--|--|--|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--|--|
| <b>Li</b><br>0.3 | <b>Be</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |  |  | <b>B</b><br>1  | <b>C</b><br>40 | <b>N</b><br>na |                |                 |  |  |
| <b>Na</b><br>3   | <b>Mg</b><br>0.1  |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |  |  | <b>Al</b><br>3 | <b>Si</b><br>4 | <b>P</b><br>30 | <b>S</b><br>30 | <b>Cl</b><br>na |  |  |
| <b>K</b><br>20   | <b>Ca</b><br>0.02 | <b>Sc</b><br>0.3 | <b>V</b><br>0.5 | <b>Ti</b><br>0.5 | <b>Cr</b><br>2 | <b>Mn</b><br>0.4 | <b>Fe</b><br>2   | <b>Co</b><br>1   | <b>Ni</b><br>5  | <b>Cu</b><br>0.4 | <b>Zn</b><br>1 | <b>Ga</b><br>4   | <b>Ge</b><br>20 | <b>As</b><br>20  | <b>Se</b><br>50  | <b>Br</b><br>na  |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
| <b>Rb</b><br>30  | <b>Sr</b><br>0.06 | <b>Y</b><br>0.3  | <b>Nb</b><br>5  | <b>Zr</b><br>0.8 | <b>Mo</b><br>3 |                  | <b>Ru</b><br>6   | <b>Th</b><br>5   | <b>Pd</b><br>3  | <b>Ag</b><br>1   | <b>Cd</b><br>1 | <b>In</b><br>9   | <b>Sn</b><br>30 | <b>Sb</b><br>10  | <b>Te</b><br>10  | <b>I</b><br>na   |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
| <b>Cs</b><br>10  | <b>Ba</b><br>0.1  | <b>La</b><br>1   | <b>Hf</b><br>4  | <b>Ta</b><br>15  | <b>W</b><br>8  | <b>Re</b><br>5   | <b>Os</b><br>0.4 | <b>Ir</b><br>5   | <b>Pt</b><br>10 | <b>Au</b><br>4   | <b>Hg</b><br>1 | <b>Tl</b><br>30  | <b>Pb</b><br>10 | <b>Bi</b><br>20  |                  |                  |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
|                  |                   |                  |                 |                  |                |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
|                  |                   |                  | <b>Ce</b><br>5  | <b>Pr</b><br>1   | <b>Nd</b><br>1 |                  | <b>Sm</b><br>2   | <b>Eu</b><br>0.1 | <b>Gd</b><br>1  | <b>Tb</b><br>2   | <b>Dy</b><br>2 | <b>Ho</b><br>0.4 | <b>Er</b><br>1  | <b>Tm</b><br>0.6 | <b>Yb</b><br>0.3 | <b>Lu</b><br>0.2 |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |
|                  |                   |                  | <b>Th</b><br>70 |                  | <b>U</b><br>15 |                  |                  |                  |                 |                  |                |                  |                 |                  |                  |                  |  |  |  |                |                |                |                |                 |  |  |

Şekil 3: ICP-AES deteksiyon limitleri (µg/L) (80).

#### 4.2.2. Tükürüğün görevleri

Tükürüğün,

Tad alma

Yutma ve sindirme

Konuşma

Koruma ve kayganlaştırma (lubrikasyon)

Temizleme (klerens)

Tamponlama ve mine bütünlüğünün korunması

Antibakteriyel etki

Pelikül oluşumu gibi görevleri vardır (40,42,144).

#### 4.2.3. Tükürük toplama yöntemleri

Tükürük 3 farklı yöntemle toplanabilir:

##### 4.2.3.1.Uyarımsız tükürük toplama

Uyarımsız tükürük

a) **draining** (tükürüğün cazibesıyla akarak toplanması),

b) **swab** (tükürüğün pamuk peletlere emdirilerek toplanması),

c) **spitting** (tükürüğün tükürme işlemiyle toplanması)

d) **suction** ( tükürüğün vakumlanarak toplanması) olmak üzere 4 farklı şekilde toplanabilir (136,117,157).

##### 4.2.3.2.Uyarımlı tükürük toplama

Uyarımlı tükürük ise tad alma (damla, kağıt strip) ve çiğneme (paraffin, şekersiz sakız ) esaslı yöntemler ile toplanır (136,117,157).

##### 4.2.3.3.Çalkalama ile tükürük toplama

Kserostomi gibi tükürük miktarının çok az olduğu durumda ağız 5 ml steril tuzlu su ile 1 dakika çalkalandıktan sonra tükürük toplanır (89).

#### 4.2.4. Tükürük akış hızı (TAH)

Tükürüğün yapısına etki eden en önemli faktörlerden birisi olan tükürük akış hızı, bireyin istirahat pozisyonundayken dışarıdan hiçbir uyarı almaksızın birim zamanda (dakikada) ağıza akan tükürük miktarıdır. Tükürük nörotransmitter uyarana bir cevap olarak salgılanır. Günün büyük bir kısmında nörotransmitter salınımı düşük seviyededir. Bu dönemde oluşan tükürük akımı **uyarımsız tükürük akışı** olarak adlandırılır ki ortalama değeri 0,3 ml/dk dır. Sağlıklı bireylerde uyarılmamış tükürük akım hızını etkileyen birçok faktör (hidratasyon, vücut pozisyonu, ışık, biyolojik ritim, koku alma, cinsiyet, yaş, ilaç vb.) vardır (40,42,91,93).

Besinler ve çiğneme fonksiyonu nörotransmitter salınımını arttırarak tükürük akışını tetikler. Bu durumlarda oluşan tükürük akımı **uyarımlı tükürük akışı** olarak kabul edilir (maksimum 7ml/dk). Uyarımlı TAH'ye etki eden faktörler ise çiğneme, kusma, yaş, tükürük bezinin büyüklüğü, sigara ve ilaç kullanımı olarak sıralanabilir (40,42,91).

Tükürük akış hızına etki eden faktörlerin (yaş, cinsiyet, dişlenme tipi, boy, ağırlık, beslenme, iklim) incelendiği çalışmalarda ise farklı sonuçlar elde edilmiştir (18,136,175)

Torres ve ark ile Roteevel ve ark.nın (136,175) çocuklarda yaptıkları çalışmalarda TAH'nin yaş, cinsiyet, dişlenme tipine göre değişmediği belirtilmiştir

Bretz ve ark.(18) ise ırk faktörünün TAH'yi etkilemediğini ancak cinsiyete göre yaptığı değerlendirmede kızların tükürük akış hızının erkeklerinkinden daha düşük olduğunu ifade etmiştir. Söz konusu çalışmada karışık dişlenme dönemindeki TAH'nin süt dişlenme dönemine göre yüksek olduğu saptanmıştır.

Lingström ve ark.nın (102) yaptıkları çalışmada TAH'de radyoterapi sonrası meydana gelen azalma sonucunda tükürük proteinlerinde ve laktoferrin düzeyinde artış saptandığı belirtilmiştir

Tükürük miktarı azaldığında, tükürüğün yıkayıcı ve koruyucu etkisi ortadan kalkacağı için, çürük oluşma hızının arttığı bilinmektedir. Tükürük akış hızı tüm tükürük ölçümleri içinde karyostatik aktiviteye etkileri yönünden en önemli parametredir. Düşük TAH ve düşük TTK yüksek çürük tehlikesini gösterebilir.

Tulunoğlu ve ark.'ı (177) tarafından uyarımlı tükürük toplanarak yapılan çalışmada TAH'nin artmasıyla tükürük Ca seviyesinin ve TTK'nın arttığını bu nedenle çürük aktivitesinde azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir.

#### **4.2.5. Tükürük pH'sı**

Tükürük tamponlama kapasitesi ve pH'sı ağız ortamında oldukça önemli biyokimyasal verilerdir. Tükürük ilk salgılandığında pH'sı hafif asidiktir. Ancak tükürük akış hızı ile birlikte pH yükselir. Tükürük pH'sını etkileyen iyonlar bikarbonatlar, karbonik asitler, fosfatlar ve tükürük proteinleridir. Normalde tükürüğün pH'sı 6.5-7.5 arasındadır. Diş yüzeyindeki sıvının, hidroksiapatite göre doymamış olduğu ve mineden kalsiyum ve fosfatın ayrılmasına izin veren değere **kritik pH** denir. Bu değer 5.5 ve bunun altındaki pH'lardır. Kritik pH'ın altında diş minesinden çözünme başlayarak diş çürüğü oluşur.

tükürük pH'sının saptanması indikatör ve elektriksel yol ile yapılabilir (86,154).

##### **4.2.5.1. İndikatör ile pH tayini**

En kolay pH belirleme yöntemidir. İndikatörler iyonize halde zayıf asit ya da baz yapıda olduğundan pH renk değişimi ile tespit edilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı %10 dan daha az değer aldığıında değişimin gözle belirlenememesidir (154).

##### **4.2.5.2. Elektriksel yol ile tayini**

Bu yöntemde pH metre olarak adlandırılan alet kullanılır. İçinde 1 M HCl emdirilmiş platin elektrot bulunan cam elektrot vardır. İnce duvarlı cam ile kaplı ucunda elektriğı ileten özel bir camdan yapılmıştır. Standart kalomel ile birlikte cam elektrot bir hücre oluşturur. Sabit ısıda bu hücrenin elektromotiv kuvveti tamamen cam elektrotun içinde bulunduğu solüsyonun H iyonu konsantrasyonuna bağlıdır (86,154).

#### 4.2.6. Tükürük tamponlama kapasitesi (TTK)

Ortamdaki  $H^+$  ve  $OH^-$  iyonlarına bağlı olarak değişebilen pH değişikliklerine karşı direncin gücüne, **Tamponlama Gücü (Kapasitesi)** denir. Tükürük içerdiği, karbonik asit, bikarbonat, fosfat ve amfoterik proteinler sayesinde ağız içinde oluşan organik asitlerin nötralize edilmesi ve tamponlanmasında önemli rol oynamaktadır. Sözü edilen tampon maddeler, ağız içindeki sert ve yumuşak dokularda oluşabilecek kimyasal yaralanmaların ve diş çürüklerinin önlenmesinde önemlidir. Uyarımlı tükürükte en önemli tampon bileşeni inorganik fosfatken, uyarımsız tükürükte karbonik asit-bikarbonat tampon sistemidir. Tükürük uyarıldığında tamponlama kapasitesi artmaktadır (86,90,154).

Tamponlama kapasitesi 2 yöntem ile tespit edilebilir:

##### 4.2.6.1.Ericsson Yöntemi

Toplanan uyarımlı tükürük bekletilmeden, 1 ml çekilerek baska bir kaba alınır ve üzerine 3 ml 0,005 N HCL ilave edilir. Karbondioksiti çıkarmak için kaba hafifçe titreşim hareketi yaptırılır. Örnekler 10-20 dakika bekletildikten sonra pH ölçülür. Ölçüm pH metre ve pH indikatörü kullanılarak yapılabilir. Toplanan uyarımsız tükürük bekletilmeden, bir ml çekilerek başka bir kaba alınır ve uyarımlı tükürük örneğinden farklı olarak üzerine 3 ml 0,0033 N HCL ilave edilir. Karbonhidroksiti çıkarmak için kaba hafifçe titresim hareketi yaptırılır. Örnekler 10-20 dakika bekletilir. Süre sonunda pH ölçülür. Ölçüm yine pH metre ve pH indikatörü kullanılarak yapılabilir (154).

##### 4.2.6.2.Dentobuff Strip Yöntemi

Tükürük tamponlama kapasitesinin ölçülmesinde kullanılan bu yöntemde özel kitler kullanılır. Bu tür kitler içerisinde zayıf bir asit bulunan özel bir tüp bulunur. 1 ml uyarılmış tükürük bu test tüpüne aktarılır ve bekletilir. Renk ayrımına göre TTK hakkında bilgi sahibi olunur. Eğer renk sarımsı kahverengi ise  $pH < 4.0$  düşük TTK, yeşil ise  $pH < 4.5-5.5$  orta düzeyde TTK, mavimsi ise  $pH > 6$  yüksek TTK olarak değerlendirme yapılır (154).



### 4.3. Ağız mikroflorası ve mikrobiyal dental plak

Dişler, dil, ağız mukozası, alveolar mukoza ve diş eti cebi gibi farklı bölgelere sahip ağız boşluğunda 700'den fazla mikroorganizma türü saptanabilmiştir (3). Farklı organizmaların değişik bölgelerde kolonize olabilmeleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar fiziko-kimyasal faktörler (fiziksel yapısı, ısı, oksijen basıncı, hidrojen iyonu konsantrasyonu, besinler) konak faktörleri (tükürük, glikoproteinler, dişeti oluk sıvısı), bakteriyel faktörler (aderans, diğer bakterilerle ilişkiler) olarak üçe ayrılır. Bu faktörlere ek olarak konağın kontrolü altındaki ağız hijyeni ve beslenme alışkanlıkları da kolonizasyonda etkilidir (63,174).

Ağız boşluğunun bakterilerle tanışması doğumdan sonraki ilk birkaç saat içerisinde gerçekleşir. Bu nedenle yeni doğanda kolonize olan ilk bakteri türleri ve flora gelişimi, gelecekteki bakteri kolonizasyonunun temelini oluşturması açısından büyük önem taşır. Doğumdan sonraki ilk hafta içerisinde ağızdan izole edilen mikroorganizmalar, streptokok türlerinden *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.salivarius* tür. İlk aylarından itibaren ağız florası kompleks bir hal almaya başlar ve ortama *veillonella*, *prevotella (bacteroides)* gibi anaerobik bakteriler katılır. Dişlerin sürmesi ile birlikte mikroorganizmaların üreyebileceği yeni yüzeyler oluşurak *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* ve *Actinomyces* türleri ağız ortamına yerleşirler(7,26,77,165).

Aas ve ark (3) PCR) kullanarak yaptıkları çalışmada, sağlıklı ağız boşluğundaki dil, bukkal epitel, sert ve yumuşak damak, diş yüzeyleri, subgingival plak gibi farklı bölgeleri incelemiştir. Mikroorganizmaların % 60'ından fazlası kültüve edilemediği bu çalışmada bazı bakteriler tüm bölgelerde saptanırken, bazıları yalnızca bölgeye özgü bulunmuştur. Örneğin *S.sangius*, *S.gordonii*, *Abistrophia defectiva*, *Actinomyces spp.* özellikle diş yüzeyinde kolonize olduğu saptanmıştır.

Aynı araştırıcının çürük kaviteledeki floranın incelendiği diğer PCR çalışmasında, 224 bakteri türü ve filotipi saptanmıştır. Bu çalışmanın bulgularına dayanarak; *S.mutans*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Atopobiu*'dan başka türlerin de çürük oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *Actinomyces spp* ve *mutans* olmayan streptokokların da çürük başlangıcında etkili oldukları belirtilmiştir (2).

**Tablo 2:** Ağız ortamında bulunan mikroorganizmalar (63).

| Gram- pozitif             |                          | Gram negatif        |                       |                  |
|---------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Kok                       | Çomak ve Filamanlar      | Kok                 | Çomak ve filamanlar   | Spiraller        |
| <i>Enterococcus</i>       | <i>Actinomyces</i>       | <i>Branharnella</i> | <i>Actinobacillus</i> | <i>Treponema</i> |
| <i>Peptostreptococcus</i> | <i>Aracnia</i>           | <i>Neisseria</i>    | <i>Campylobacter</i>  |                  |
| <i>Stomatococcus</i>      | <i>Bifidobacterium</i>   | <i>Veillonella</i>  | <i>Capnocytophaga</i> |                  |
| <i>Streptococcus</i>      | <i>Corynebacterium</i>   |                     | <i>Centipeda</i>      |                  |
|                           | <i>Eubacterium</i>       |                     | <i>Eikenella</i>      |                  |
|                           | <i>Lactobacillus</i>     |                     | <i>Fusobacterium</i>  |                  |
|                           | <i>Propionibacterium</i> |                     | <i>Haemophilus</i>    |                  |
|                           | <i>Rothia</i>            |                     | <i>Leptotrichia</i>   |                  |
|                           |                          |                     | <i>Mitsuokella</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Prevotella</i>     |                  |
|                           |                          |                     | <i>Porphyromonas</i>  |                  |
|                           |                          |                     | <i>Selenomonas</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Simonsiella</i>    |                  |
|                           |                          |                     | <i>Wollinella</i>     |                  |

Pelikül tabakası ile başlayan mikrobiyal dental plak (MDP) oluşumunda, ağız boşluğundaki farklı bölgeler, kemoterapötik maddelerin (fluor gibi) açığa çıkması, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi, tükürük ve mikrobiyal ilişki, mikroorganizmaların adezyon ve ko-adezyonu önemli rol oynar (135,138).

Ayrıca morfolojik, mikrobiyolojik, besin ile ilgili faktörler ve biyofiziksel faktörlerin de etkili olduğu bildirilmiştir. Morfolojik olarak; retantif olan diş yüzeyleri, pit ve fissürler, ayrıca pürüzlü bir yapıya sahip kök yüzeyleri, çapraşıklık gösteren dişler ve restorasyonlu dişler daha fazla plak birikimine neden olurlar. MDP kalınlığı ve akümüasyonu, ekstraselüler mikrobiyal materyal üretimine, oral hijyen uygulamalarına ve yanak/dudak hareketleri gibi konakçının fiziksel aktivitesine de bağlıdır (15,103).

#### 4.3.1. Pelikül (Kazanılmış pelikül)

Bu terim ilk kez Dawes tarafından sürme sonrası mine yüzeyinde oluşan kütiküler tabakayı tanımlamak için kullanılmıştır. Kazanılmış pelikül oluşumu 2 basamakta gerçekleşir. Dişin ağız ortamıyla temasından sonra mine yüzeyine tükürük proteinleri yapışmaya başlar. Bu proteinlere ‘pelikül öncü proteinleri’ (pellicle

precursor protein) adı verilir. Prolinden zengin proteinler (PRP), statherin, histatin ile mine yüzeyi arasındaki iyonik etkileşim 30 sn-3 dak gibi kısa sürede tamamlanır.

İkinci basamakta ise tükürük öncü proteinleri ile tükürükten gelen biyopolimerler arası bağlantı söz konusudur. Bu aşama 30-90 dakikada gerçekleşir ve başlangıç kalınlığı 10-20nm olan pelikül bu aşamanın sonunda 100-200 nm'ye ulaşır (62).

Bu ince, hücresiz ve bakterisiz biyofilm, tüm diş yüzeyini kaplayarak pit, fissür ve mine defektlerini doldurur. Pelikül ayrıca ağız içi aparatların, polietilen striplerin, çeşitli restoratif materyallerin ve protezlerin üzerinde de gözlenebilir.

Pelikül:

- Mine yüzeyinin korunmasında ve remineralizasyonunda
- Mine dokusunun seçici geçirgenlik özelliğinde
- Spesifik oral mikroorganizmaların diş yüzeyine tutunmasında (adezyon)
- Diş yüzeyinde kolonize olan plak bakterileri için üreme ortamının sağlanmasında önemli rol oynar (62,110).

#### **4.3.2. Mikrobiyal dental plak (MDP)**

İlk kez Black tarafından 'jelatinöz mikrobiyal plak' olarak adlandırılan mikrobiyal dental plak; dil, dudak, yanak ve tükürük ile mekanik olarak temizlenmeyen diş bölgelerine yerleşen, diş yüzeyine sıkıca yapışan, protein ve polisakkaritleri içeren, su spreyi ile uzaklaştırılmayan beyaz-gri ya da beyaz-sarı renkli organik yığıntılardır. Yapışkan protein ve polisakkaritlerden oluşan bu kitleler içinde çok sayıda mikroorganizma bulunur (62,103,110).

Bakteriler elektrostatik, hidrofobik iyon ve van der Waals kuvvetleri ile peliküle yapışır. Bakterilerin çökmesi ve tükürükteki diğer bakterilerle proteinin yerleşmesi sonucu, plağın hem kütlesi hem de kalınlığı artar.

MDP ağırlığının % 80-90'ı sudur. Kuru ağırlığın %70'ni bakteriler, geri kalan kısmı ise polisakkarit, tükürük proteinleri ve glikoprotein içerikli matris oluşturur (62,97).

##### **4.3.2.1. Mikrobiyal dental plak oluşum mekanizması**

Mikrobiyal dental plak,

1-Tükürük protein ve glikoproteinlerinin diş yüzeyine yapışması ile oluşan pelikül (kazanılmış pelikül) tabakası

- 2-Tükürük bakterileri ile pelikül arasında fizikokimyasal etkileşimin olduğu spesifik olmayan geri dönüşümlü bağlantı fazı
- 3-Pelikülda bulunan konak reseptörleri ile primer bakteri kolonileri arasında oluşan geri dönüşümsüz bağlantı fazı (Hücre- yüzey)
- 4-Pelikül yapılmış primer bakteri kolonileri ile sekonder bakteri kolonileri arasında oluşan ko-agregasyon fazı (Hücre- hücre)
- 5-Hücre bölünmesi ve plak kalınlığının artması sonucu oluşur (13,109).

MDP'nin oluşumu pelikül tabakası ile başlar. Pelikül içeriğinde albumin, lizozim, amilaz, IgA, PRP ve müsin bulunur. Pelikül ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan bakteriler *S.sanguis*, *S.mutans*, *A.viscosus*, *A.naeslundii* ve *V.parvula* gibi Gr+ kok ve çomaklardır (**Primer bakteri kolonileri**). Bu bakterilerden *A.viscosus* ve *S.sanguis* tükürük proteinlerinden aPRP ile bağlantı kurar. Daha sonraki aşamada primer bakteri kolonilerine *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* ve *Capnocytophaga* gibi Gr - filamanlar (**Sekonder bakteri kolonileri**) yapışarak plak kalınlığını arttırır.

MDP, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gibi bakterilerin de (**Tersiyer bakteri kolonileri**) eklenmesiyle kompleks hal alır. Bu safhada mikroskopta 'mısır koçanı' şeklinde görülür (35,54,58).

### 4.3.3. Primer bakteri kolonileri

Pelikül ile kaplı diş yüzeyine ilk tutunan bakteriler *Streptococcus spp* (*S.sanguis*, *S.mutans*), *Actinomyces spp.* (*A.viscosus*, *A. naeslundii*) ve *Veillonella spp.* (*V.parvula*) gibi Gr + kok ve çomaklardır. Primer bakteri kolonilerinde yer alan bakteriler, MDP oluşumunda etkili olduklarından diş çürüğü ve/ veya dışsal renklenmelerden de sorumlu tutulurlar (2,3,97,139,151).

SDR ile yapılmış sınırlı sayıda çalışmalarda *Actinomyces* türlerinin siyah renklenme oluşumunda etkili olabileceği vurgulanmıştır (11,139,151,155).

#### 4.3.3.1. *Streptococcus spp*

Ağzın tüm bölgelerinden izole edilebilen streptokoklar oral mikrofloranın çoğunluğunu oluşturur. Hücreler 0.5–2.0µm. çapında küresel veya ovoid şekillidir,

sulu ortamda ürerler, çiftler veya zincirler halindedir. Streptokoklar, besinden zengin bir ortamda 37 °C sıcaklıkta ürerler. Metabolizmaları fermantatiftir ve başlıca laktat üretirler (7,43).

Normal floranın yanı sıra ağız florasında da sık görülen viridans streptokoklar, diş plağının % 28, dilin % 45, tükürüğün de % 46'sında bulunur(183).

Günümüze kadar tanımlanmış oral streptokoklar Tablo 3'de gösterilmiştir. Diğer oral streptokoklar ise *S. pyogens*, *P. micros*, *P. magnus*, *P. anaerobius*, *P. micros*'tur.

**Tablo 3:** Oral streptokok türlerinin sınıflandırması (111).

| Grup ADI  | Tür ADI   |
|---|---|
| <i>Streptococcus mutans grubu</i><br>( <i>mutans streptococci</i> ) | <i>S. mutans, serotip c, e, f</i><br><i>S. sobrinus, serotip d, g</i><br><i>S. cricetus, serotip a</i><br><i>S. rattus, serotip b</i><br><i>S. ferus</i><br><i>S. macacae</i><br><i>S. downei serotip h</i> |
| <i>Streptococcus salivarius grubu</i>                               | <i>S. salivarius</i><br><i>S. vestibularis</i>  |
| <i>Streptococcus anginosus grubu</i>                                | <i>S. constellatus</i><br><i>S. intermedius</i><br><i>S. anginosus</i>  |
| <i>Streptococcus Mitis grubu</i>                                    | <i>S. sanguis</i><br><i>S. gordonii</i><br><i>S. parasanguis</i><br><i>S. Oralis</i><br><i>S. mitis</i><br><i>S. crista</i>   |

**a) *Streptococcus sanguis***

Küresel ve oval şekilli, 0.8-1.2µm çapında, orta veya uzun zincirler oluşturur ve diş yüzeylerinde kolonize olabilirler. Genellikle fissürlerde çürüğe sebep olurlar. Sakkaroz içeren ortamda ekstrasellüler polisakkarit (glukan) oluşturan koloniler pürüzlü yüzeyli, sert kümeler halinde ve agara yapışık olarak bulunurlar. Aerobik ortamda üreyebilen *S.sanguis*'u diğer ağız streptokoklarından ayıran en önemli özellik eskülin ve arginini hidrolize edebilmesidir (63).

**b) *Streptococcus mutans***

İlk defa 1924 yılında Clark tarafından çürük insan dişinden izole edilmiştir. Hareketsiz ve kapsülsüz olan bu mikroorganizmaların çapı yaklaşık 0.5-0.75 µm'dir. Genellikle kısa çomak veya kokobasil görünümünde olup hücre duvarındaki karbonhidrat antijenlerine göre sekiz serotipi ayırt edilmiştir. Genetik ve fenotipik heterojenitesine göre ise insan ve hayvanlardan yedi değişik tür izole edilmiştir (104,111).

Yapılan çalışmalarda, *S.mutans*'ın mutans streptokokların, %74-94'ünü oluşturduğu ve farklı populasyonlarda koronal çürük-biberon çürüğünün gelişimine büyük ölçüde eşlik ettiği gösterilmiştir (98,108).

Mutans streptokok, hücre duvarı karbonhidrat antijenlerine ve proteinlerine sahiptir.. Bu antijen, tükürük pelikül komponentleri ile birlikte, *S. mutans*'ın diş yüzeyine yapışmasında rol oynar. *S. mutans*, sakkarozdan suda çözünebilir ve çözünmeyen ekstrasellüler polisakkaritler (glukan ve fruktan) üreterek diş yüzeyine yapışır (118).

Mutans streptokoklar, 19-31. aylarda, "enfeksiyon penceresi olarak" tanımlanan bir dönemde kolonize olmaya başlar. Kolonizasyon, yaşın artması ve hipoplastik mine lezyonlarının varlığında artış gösterir. Aynı zamanda dil yüzeyi de, diş yüzeyi kadar mikroorganizmalar için rezervuar görevi görür. Azı dişleri ön dişlere göre, fissürler; aproksimal, bukkal ve lingual yüzeylere göre, restorasyon görmüş dişler; sağlam yüzeylere göre daha fazla *S.mutans* kolonizasyonuna sahiptir (25,100,108).

İlerlemiş çürük lezyonlarda yüksek düzeyde *S. mutans* saptanırken, yumuşak ve nekrotik dentinde laktobasillerin daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Öte yandan çürük ile ilgili yapılmış mikrobiyolojik çalışmalarda karşılaşılan en önemli problem, lezyon

oluşumunun başlangıcına veya çalışılan lezyonun demineralizasyon aktivitesine ait kesin tanımlamaların yokluğudur. Çürüğün dinamik doğası nedeniyle, mineral kaybı zaman içinde değişir. Bu durum sadece farklı lezyonlar arasında değil mikrofloranın metabolik aktivitesine bağlı olarak lezyonun kendi içinde bile değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir (111)

*S. mutans*' lar çoğunlukla diş yüzeyindeki retansiyon bölgelerinde kolonize olurken ağız mukozasında daha az oranda yerleşirler. Bu nedenle dişsiz ağızlarda (henüz dişleri sürmemiş bebek ve bütün dişlerini kaybetmiş bireyler) bulunmaz. Ancak dişlerin sürmesiyle anneden bebeğe *S. mutans*'ın geçiş gösterdiği değişik çalışmalarda gösterilmiştir (61,126,169).

Ertuğrul ve ark.(48) 2003 yılında yaptıkları araştırmada, 6-11 yaş arası birinci veya ikinci süt azısının aproksimalinde çürük olan 30 çocuğun bakteri ve mutans streptokok sayıları restorasyon öncesi ve sonrasıyla karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonunda restorasyon sonrası mutans streptokok sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktığı rapor edilmiştir.

Bölümümüzde gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda da restoratif tedavi sonrasında, mutans streptokok ve laktobasil değerlerinde, birinci, üçüncü ve altıncı aylarda anlamlı düşüş saptanmış ancak mutans streptokok ve laktobasil değerlerinde üçüncü ay sonunda başlangıç değerlerine geri dönüş eğilimi olduğu belirtilmiştir (178).

Reuters ve ark.(133) 1995 yılında çürük yönünden aktif olan çocukların belirlenmesi amacıyla 252 okul öncesi çocukta yaptıkları üç yıl süren çalışmalarında, tükürükteki mutans streptokok ve laktobasil sayıları arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Benzer sonuçlar Brambilla ve ark.nın (17)1999 yılında 9-13 yaş grubu 473 İtalyan çocukta mutans streptokok ve laktobasil ile çürük arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmasında da elde edilmiştir.

#### 4.3.3.2. *Actinomyces spp.*

Birçok yönüyle bakterilere, bazı yönleriyle mantarlara benzeyen ve filaman yapan *Actinomyces spp.*'ler, insan ve hayvan muköz membranlarında (ağız boşluğu, vajina) oluşan ilk bakterilerdendir. Bunlar gram pozitif, aside dirençli, fakültatif anaerob veya zorunlu anaerob, ekstrasellüler yerleşimli sporsuz basillerdir. Kolonilerinde in vivo sülfür granülleri oluşturur ve birçok besiyerinde anaerob şartlarda yavaş ürerler (60,168).

Ağız boşluğunda çok erken dönemde izole edilebilen *Actinomyces*'lerin en önemli özellikleri doku üzerine yapışması ve diğer bakterilerle birleşebilmesidir. Bu nedenle plak oluşumunun başlangıcından sorumlu tutulmaktadır.

Könönen ve ark.da bebeklerin ağızında ilk olarak kolonize olan bakterilerin *Actinomyces spp.* olduğunu belirtmişlerdir (87,137,142).

Sarkonen ve ark.(142), *Actinomyces* türlerinin oral kolonizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada 39 sağlıklı bebeğin tükürüğündeki *Actinomyces* türlerinin doğumdan 2 yaşına kadar geçen süreçteki dağılımını incelemişlerdir. Sonuçta toplam *Actinomyces* florasının yaşla birlikte % 31'den % 97'ye artış gösterdiğini, *A. odontolyticus*'un bu dönemde oral mukozadaki birinci *A. naeslundii*'nin ise ikinci en yaygın *Actinomyces* türü olduğunu vurgulamışlardır.

Aynı araştırmacının insanlardaki *Actinomyces* türlerinin fenotipik identifikasyonu konulu çalışmasında ağız boşluğunda 9 farklı *Actinomyces* türü olduğu ve bunlardan *A.israelii*'nin aktinomikoz ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu bakteri türü olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında *A. odontolyticus*, *A. naeslundii* ve *A. viscosus*'un yenidoğan ağızındaki birincil *Actinomyces* türleri olduğu ve erken dönem plak oluşumunda etkili oldukları; *A. radidentis*'in enfekte kök kanallarından ve *A.gravenitzi*'nin ise sıklıkla solunum yolu sekresyonlarından izole edildiği bildirilmiştir. Tanımlanan bu *Actinomyces* türlerinden *A.odontolyticus*, *A. radidentis*, *A.gravenitzi* ve *A.urogenitalis*'in kırmızıdan siyaha değişen pigmentler ürettikleri belirtilmiştir. (143).



Tang ve ark (167) Çinli okul öncesi çocuklarda yaptıkları PCR (southern hibridizasyonu) çalışmasında *Actinomyces* türlerinin (*A. bovis*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*) supragingival plaktaki dağılımlarını incelenmiştir. Çalışmaya aktif çürüklü ve çürüksüz 53 çocuk dahil edilmiştir. Çalışmanın sonucunda *A. gerencseriae*'nin aktif çürüklü grupta daha fazla oranda saptandığı belirtilirken, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* ve *A. naeslundii*'nin süt dişlerindeki supragingival plak oluşumunda önemli rol oynadığı vurgulanmıştır.

Diamanti-Kipioti ve ark'ı (38) *Actinomyces spp.*lerin sadece diş yüzeyine değil ortodontik bant ve braket yüzeylerine yapışarak subgingival florada anlamlı artışa neden olduklarını saptamışlardır.

1960 ve 70 lerde *Actinomyces spp.*lerin periodontal yıkımdan sorumlu olduğu düşünülürken Haffajee ve ark.(58) periodontal cerrahi ve sistemik tetrasiklin uygulamasının ardından *Actinomyces* türlerinde önceki duruma göre artış olduğunu belirtmiştir. Devam eden çalışmalarda da *Actinomyces spp.*lerin sağlıklı bireylerin dişeti ceplerinde periodontal hastalıklı bireylerdekine oranla daha yoğun olduğu rapor edilmiştir. Son yıllarda yapılan yeni çalışmalarda ise *Actinomyces spp.*lerin bazı tiplerinin (*A. naeslundii*- *A. meyeri*) periodontal yıkımdan sorumlu olduğu saptanmıştır (188).

*Actinomyces spp*'ler , tükürük ve dişeti oluk sıvısındaki bazı komponentlerden enerji üretmek ve çoğalmak için gerekli enzimlere sahiptir. Bu enzimler levansukraz ve üreazdır. Levansukraz enzimi ile bakteri sukroz'u karbon kaynağı olarak kullanıp çoğalırken; üreaz enzimiyle de üre parçalanarak gerekli nitrojen kaynağı elde edilir. Açığa çıkan amonyak plak pH sınırın artmasına ve bu bölgeye daha az karyojenik olan bakterilerin (*S.salivarius*, *Actinomyces*) tutunabilip, çoğalmasına neden olur. Böylece plak pH'sındaki artışın minenin çözünürlüğünü dolayısıyla çürük oluşumunu azalttığı ve diş taşı oluşumunu da indirekt olarak arttırdığı düşünülmektedir. Bununla beraber üreden açığa çıkan amonyağın polimorf nüveli lökositlerin fagositoz, degranulasyon ve oksijen metabolizmasını inhibe etmesinden

ve subgingival plak oluşumunun artmasından dolayı periodontal hastalık oluşum riskini arttırdığı görüşü hakimdir (168,191).

*Actinomyces spp.*lerin sahip olduğu nöraminidaz enziminin ise, gerek kendilerinin gerekse bazı periopatojenlerin (*P. intermedia*, *P. gingivalis*) insan epitelyal hücrelerine bağlantılarını kolaylaştırırken, kommensal yapı gösteren bazı bakterilerin (*S. sanguis* ve *S. mitis*) bağlantısını engellediği saptanmıştır. (29).

*Actinomyces spp.*lerin çeşitli Gr (-) bakteriler ( periopatojen özellik gösteren *porhyromonas* ve *prevotella* türleri ) ile koagregasyonu sonucu subgingival plak oluşumunu arttırdığı dolayısıyla periodontal hastalıklara zemin hazırladığı düşünülmektedir (34,140).

**Tablo 4:** Tanımlanmış *Actinomyces* türlerinin günümüzdeki isimleri (137)

| Günümüzdeki ismi                  | Önceki Sınıflama   |
|-----------------------------------|--|
| <i>Actinomyces georgiae</i>       | <i>Subgingival Actinomyces sp.</i>                                 |
| <i>Actinomyces gerencseriae</i>   | <i>A. israelii</i> serotip 2                                       |
| <i>A. israelii</i>                | <i>A. israelii</i> serotip 1                                       |
| <i>A. odontolyticus</i>           | <i>A. odontolyticus</i>  |
| <i>A. naeslundii</i> genotipler 1 | <i>A. naeslundii</i> serotip 1                                     |
| <i>A. naeslundii</i> genotipler 2 | <i>A. naeslundii</i> serotip 2 & 3<br><i>A. viscosus</i> serotip 2 |
| <i>A. meyeri</i>                  | <i>A. meyeri</i>   |
| <i>A. bernardiae</i>              |  |
| <i>A. radingae</i>                |  |
| <i>A. neuii</i>                   |  |
| <i>A. europaeus</i>               |  |
| <i>A. graevenitzii</i>            |  |
| <i>A. turicensis</i>              |  |

#### 4.3.3.3. *Veillonella spp*

Gr (-) anaerobik kok grubunda yer alan *Veillonella*'nın ağız içinden izole edilen 3 türü vardır. Bunlar *V. dispar*, *V. parvula* ve *V. atipika*'dır. Çoğunlukla dil yüzeyinde ve yanak mukozasında bulunurlar. *V.dispar*, dil yüzeyinde yoğun olarak yer alması ve hidrojen sülfür üretebilmesi nedeniyle ağız kokusu oluşumundan sorumluyken; *V.parvula* dental plak oluşumunda etkili olan veillonella türüdür.

*Veillonella* türleri çoğalabilmek için gerekli karbon kaynağı olarak streptokokların ürettiği laktik asidi kullanır. Böylece streptokokların minenin demineralizasyonu üzerine etkisini dolayısıyla çürük aktivitesini azaltmış olur (9,27,76,97,180).

#### 4.3.4. Mikrobiyal dental plak ve bakteri tutunması (Aderans)

Adezyon, bir mikroorganizmanın konak dokuya tutunmasını, aderans ise adezyon yeteneğini ifade eder. Bir bakterinin konakta hastalığa sebep olabilmesi için herşeyden önce konak dokuya adezyonu şarttır. Bakterilerin ağızda tutunabilecekleri yüzeyler keratinize epitel, keratinize olmamış epitel, hidroksil apatit yüzeyler (diş sert dokuları ve seramik restorasyonlar) ve varsa protezlerin metal ve akrilik yüzeyleridir.

Bakteriler konak dokuya tutunabilmek için genellikle fimbriya (sinonimi=pili) ve kapsüllerini kullanırlar. Birçok oral patojenin ağız dokularına tutunması fimbriyaları ile olur. Ortamda mannoz varken fimbriyalar inaktive oluyorsa **Tip-1**, inaktive olmuyorsa **Tip-2 fimbria** adını alır. Birçok oral patojenin (*Actinomyces* ve *P.gingivalis*...) genellikle Tip-1 fimbriyaları vardır (26,135).

Oral patojenlerin ağız dokularına tutunmaları şu şekillerde olabilir:

#### **Doğrudan tutunma**

Bakteri hücrelerinin konak dokuya direkt bağlanabildiği ve bakteri-konak temasının pililer ile mümkün olduğu tutunmasıdır. *Actinomyces*'lerin Tip-1 fimbriyaları ile dişin mine dokusuna tutunması bu tutunmaya örnek teşkil eder (26,84).

## **Dolaylı Tutunma**

Konak reseptörleri ve bakteri yüzeyindeki moleküllerin yapısı birbirinin komplementeri olmadığı durumlarda, ikisi arasında adaptör rol üstlenen bir kimyasal madde veya bir başka bakteri hücresi ile adezyon gerçekleşir. Bu adaptör yapılar adezin, gluklan kriptitop, koagregasyon köprüleri olabilir (26).

### **Kriptitop:**

Pelikülün yapısını oluşturan histatin (PRP- Statherin) oral patojenler tarafından üretilen proteaz ve nöraminidaz enzimleriyle parçalanır. Ve histatini oluşturan aminoasitler birbirlerinden ayrılarak konak doku yüzeyine dik gelecek şekilde serbest uçlar yaparlar. Bu uçlara **kriptitop** (kriptik, gizli kalmış yer) adı verilir. İşte bu kriptitoplar oral patojenlerin tutunma noktalarıdır. Moleküler seviyede düşünüldüğünde, kriptitoplar, diş yüzeyinde bakterilerin tutunabileceği çengel şeklindeki tutunma noktalarıdır. Aslında ağzın savunma komponenti olan histatinler bakterilerin enzimatik faaliyetleri ile bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştıran merkezler haline dönüşürler. *A.israelii*, *A. odontolyticus* ve *A. viscosus* sadece Tip-1 fimbriyaları ile dişe tutunabilirken, kriptitoplar açığa çıktıktan sonra Tip-2 fimbriyaları ile de kriptitoplara ve dolayısıyla dişlere tutunabilirler (23,26,103,184).

### **4.3.5. Mikrobiyal dental plak ve diş çürüğü**

Plağın kalınlığındaki artış, asit üretim miktarını ve plaktan dışarı ve içeri olan difüzyon oranını etkilediğinden çürük gelişiminde önemlidir. Plağın kalınlığı nedeniyle, plağın dişe bakan bölgelerine tükürük ulaşamaz ve demineralize edici organik asitler tamponlanamaz. Böylece plak hem derin tabakalarda asit üreten bir ortam oluşturması, hem de bu asiti nötralize eden tükürüğün ortama ulaşmasına engel olması nedeniyle çürük oluşumunda iki yönlü sorumluluk taşır (12,85).

MDP'nin diş çürüğü etyolojisiyle ilgili 3 hipotez söz konusudur.

**Spesifik Plak Hipotezi:** MDP'de bulunan bakterilerden sadece bazı bakteri gruplarının diş çürüğüne neden olduğu kabul edilir.

**Non-spesifik Plak Hipotezi:** Tüm plak mikroflorasının diş çürüğünde etkili olduğu düşünülür.

**Ekolojik Plak Hipotezi:** Potansiyel çürük yapıcı (kariyojenik) bakterilerin tüm plak bakterisine oranı düşüktür ve nötral pH'da, sağlıklı beslenmede minedeki de-remineralizasyon denge halindedir. Ancak fermente edilebilen karbonhidrat alımında

sıklık ve pH'da oluşan düşüş ile bu denge bozulur. Sonucunda kariyojenik bakterilerin sayısı, tüm plak florasına oranla az da olsa dengeyi demineralizasyon yönünde bozar ve çürük meydana gelir (112).

#### **4.4. Oral patojenlerin saptanmasında kullanılan yöntemler**

##### **1) Direkt İnceleme**

Mikroskopi

Gram Boyama

##### **2) Kültür ve Duyarlılık Testleri**

###### **a) Kültür Teknikleri**

Aerobik ve Anaerobik Teknikler

###### **b) Özelleştirme Teknikleri**

Gaz-sıvı Kromatografi

DNA-DNA Hibridizasyon

###### **c) Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

Broth Dilusyon Testleri

Broth Disk Testi

Bakteriyel Disk Difüzyon Testi

Antimikrobiyal Duyarlılık için Hızlı Test

##### **3) İmmunolojik Testler**

İmmunofloresans (IF)

Enzim Immunoassays (EIA)

Latex Aglutinasyon

İmmunodot/Blot

Flow Sitometri

Enzyme-linked İmmunosorbent Assay (ELISA)

##### **4)Diğer Testler**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Antikorların Tanımlanması (ELISA)

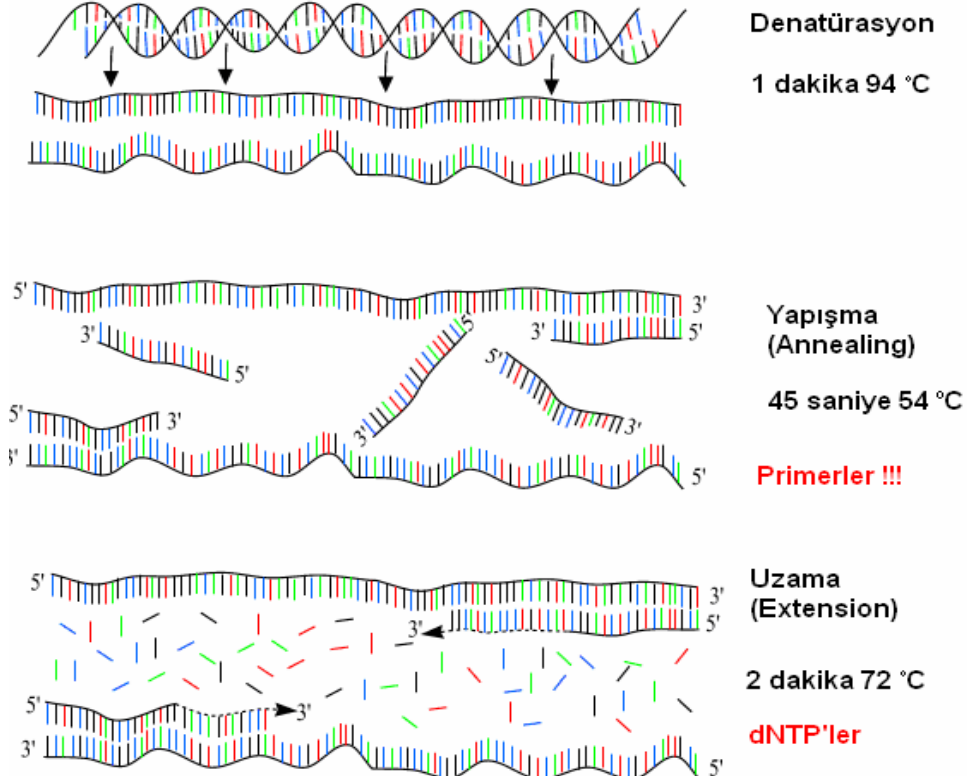
Bu yöntemlerden en güncel olanı kültür yöntemleri ile bakterilerin özgül DNA dizilerini taklit eden oligonükleotid primerlerin kullanıldığı 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'dur.

#### 4.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) (PCR)

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi *in vitro* koşullarda çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin (primer) bilinmesi gereklidir. Amplimer olarak da bilinen bu baz dizilerinin, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA bölgeleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridizasyonu yapılmaktadır.

Primerlerin hedef dizilere özgün bağlanması düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enziminin, uygun tampon ve deoksiribonükleozid trifosfat varlığında primerin 3' ucundan uzayarak yeni tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlediği gösterilmiştir. PCR'in bir döngüsünün, denatürasyon, yapışma (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere üç aşamadan oluştuğu ve döngülerin defalarca tekrarlanmasıyla sonuç elde edildiği bildirilmiştir. PCR basamakları için gereken en uygun ısılar, denatürasyon için 94 °C, annealing için 40-72 °C , polimerizasyon için 72 °C' dir. Bu üç basamak 25-40 kere tekrarlanır, daha sonra reaksiyonun soğuması için ürünler, PCR tipine göre 4 °C'ye alınır veya oda sıcaklığında bırakılır. Amaca uygun olarak PCR teknikleri modifiye edilmiş, Touchdown, Hot start, Multipleks, Nested, Kısmi Nested, Koloni, Arbitrary, Revers Transkriptaz, RealTime PCR gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir (47,59,141,170).

## PCR : POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU



Şekil 4: PCR çalışma protokolü (47)

### 4.4.2. PCR'nin temel bileşenleri

- Çoğaltılacak olan kalıp DNA,
- DNA'da çoğaltılması planlanan , bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak DNA primerleri,
- Primerlere bağlanıp 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid-trifosfatlar (dNTP),
- Polimerazın çalışması için gerekli, tampon görevi yapacak maddeler, tuzlar ve enzim çalışması için önemli bir yardımcı faktör olan Mg<sup>2+</sup> iyonlarıdır (81,170).

### **1. Çoğaltılacak olan kalıp DNA**

PCR'da, genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve herhangi bir DNA parçası da kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri, amaca göre, cDNA, genomik DNA, genomik kitaplıklar halinde, araştırma laboratuvarları ve kliniklerden veya ticari olarak elde edilir (170).

### **2. Sentezde kullanılan primerler ve zellikleri**

Primer, sentetik olarak hazırlanan tek iplikiğe sahip, spesifik DNA segmentidir. Başarılı bir PCR'da, en önemli parametre, primerlerin dizaynıdır. İyi dizayn edilmemiş primer, non-spesifik amplifikasyon (oğalma) ve/veya primer-dimer formasyonu nedeniyle ürün oluşmamasına veya çok az oluşmasına neden olur.

Kalıp DNA ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20–30 nükleotid uzunluğunda düzenlenmiştir. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizinin bilinen kısımları dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primerlerin tasarımı yapılırken mümkün olduğunca dört nükleotid bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Doğru sonuç alınabilmesi için önem verilmesi gereken bazı noktalar; primerlerin polirin, poliprimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır (81,170).

### **3. Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleri**

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan (dNTP) uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler.

Bu enzimler, sentezi başlatmak için, kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yn, 5' uçtan 3' uca doğrudur. Primerlerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile birlikte fosfodiester bağlarının katalizi sonucu yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (81,170).



#### 4.4.3.Real Time PCR (RT-PCR)

Real Time PCR hedef DNA parçasının hem amplifikasyonu hem de miktarının saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Kantitatif Real Time PCR (Quantification: QRT-PCR) veya kinetik PCR veya homojen PCR olarak adlandırıldığı da olmuştur. İşlem sırasında PCR protokolü kullanılırken DNA miktarının her amplifikasyon sonrası ölçülmesi reaksiyona “Real Time” yaklaşımını kazandırmaktadır. DNA ölçümü sırasında çift sarmal DNA’ya yapışan floresan boyalar veya DNA ile birleştiğinde floresan veren modifiye oligonükleotitler kullanılmaktadır. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA molekülü (amplikon) ile doğru orantılı floresan meydana gelmektedir. PCR duyarlılığını arttırmak için ısı kontrol mekanizması geliştirilerek, amplifikasyonun 30 siklusunun 10–30 dk gibi kısa sürede gerçekleşmesi sağlanmıştır. RT-PCR sonunda oluşan ürünlerin varlığını göstermek için bir jel elektroforezi basamağı kullanılmamakta, amplifikasyon floresan sinyallerinin ölçümü ile monitorize edilmekte ve aynı zamanda aranan hedef molekülün örnek içindeki miktarı verilmektedir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşmaktadır. Önemli artışı işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilmektedir. CT (**threshold cycle**) parametresi ise tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir. Ayrıca bu sistemde kapiller tüplerin kullanılması ile bir siklus 30 saniyeden daha az bir zamana düşürülmüş ve kontaminasyon riski ise kapalı tüp sistemi kullanımı ile ortadan kaldırılmıştır (185, [www.dorak.info/genetics/realttime](http://www.dorak.info/genetics/realttime), Erişim tarihi: 01. 03.2009).

#### 4.4.4. RT-PCR’nin Kültür Yöntemine Göre Sağladığı Avantajlar

1. Hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türlerini saptayabilmektedir.
- 2.Yüksek özgüllük gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin tanımlanmasına olanak sağlar.
- 3.Klinik örneklerdeki mikrobiyal türleri üretilmelerine gerek duymaksızın saptayabilmektedir. Başka bir deyişle mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla onların canlılıklarına gerek duymamaktadır.
4. Kültür yöntemine ve diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre daha duyarlıdır.
5. Hızlı ve kolay uygulanabilirdir.

6. Kapalı sistemlerde gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riski minimumdur
- 7.Örnekleme ve taşıma sırasında kontrollü anaerobik ortamlara gereksinim göstermemektedir. Zor üreyen bakteriler taşıma sırasında canlılıklarını yitirseler bile saptanabilmektedir.
8. Antimikrobiyal tedavi sırasında da kullanılabilir.
9. Az sayıda mikroorganizmayı bile saptayabilen bir yöntem olduğu için örnek miktarının az olması sorun yaratmaz.
10. Epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örnek kullanıldığında örnekler düşük sıcaklıklarda saklanıp bir seferde incelenebilir(67, [www.dorak.info/genetics/realtime](http://www.dorak.info/genetics/realtime), Erişim tarihi: 01. 03.2009).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza, Marmara Üniversitesi (M.Ü) Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniği'ne başvuran, karışık dişlenme dönemindeki 6-12 yaşları arasında toplam 60 çocuk dahil edildi. Ancak örneklerin transportu ve çalışılması sırasında meydana gelen olumsuzluklar nedeniyle çalışmamız 45 çocuk ile sürdürüldü. Çocuklar yaş (6-9 ve 10-12) ve çürük sayısına göre (1-5 ve 6-10) iki gruba ayrıldı.

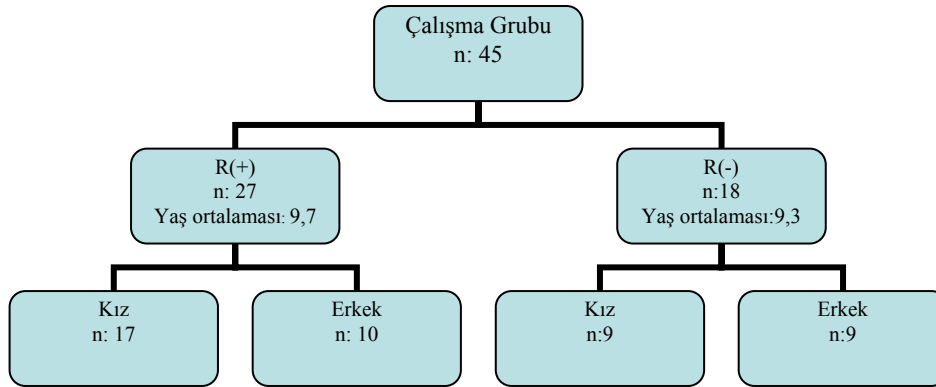
Çalışmamıza son 2 haftada antibiyotik kullanmış olan, dışsal renklenmeye neden olabilecek preparatlar (klorheksidin, demir..) kullanan, ağız kokusu bulunan, periodontal ve sistemik hastalığı olan çocuklar dahil edilmedi.

Çalışmaya başlamadan önce M.Ü Araştırma Etik Kurulu'ndan Etik Kurul Raporu alındı ve tüm ebeveynlere Bilgilendirilmiş Onam Formları imzalatıldı (Ek-1,2)

Çalışma grupları:

Siyah dışsal renklenmesi olan çocuklar R(+)

Siyah dışsal renklenmesi olmayan çocuklar R(-) olarak oluşturuldu.



Şekil 5: Çalışma grubunun dağılımı

### 5.1. Ağız içi muayene

Ağız içi muayene reflektör ışığı altında ayna ve sond yardımıyla DSÖ kriterlerine uygun olarak yapıldı (190). Süt dişlerindeki çürük, dolgulu diş sayısı **df-t indeksi** ve sürekli dişlerdeki çürük, kayıp, dolgulu diş sayısı **DMF-T indeksi**'ne göre belirlendi.

Siyah dışsal renklenme derecesinin saptanmasında **Koch indeksi** kullanıldı.



**Resim 1:** Koch indeksine göre  
1.derece renklenme



**Resim 2:** Koch indeksine göre  
2. derece renklenme



**Resim 3:** Koch indeksine göre 3.derece renklenme

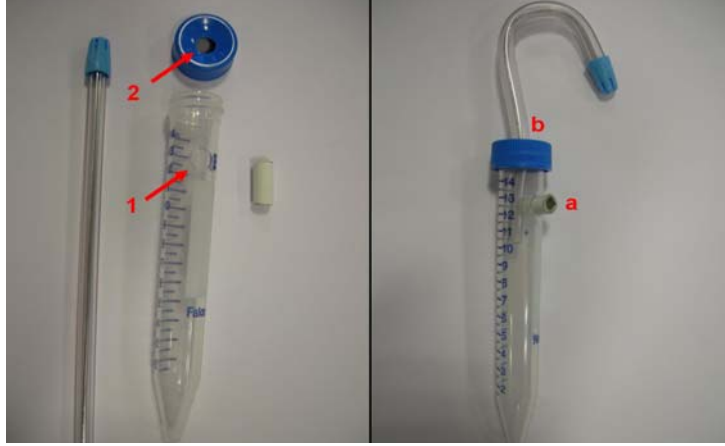
### 5.2. Tükürük örneklerinin toplanması

Çocukların karışık ve uyarımsız tükürük örnekleri sirkadiyen ritm değişiklikleri göz önüne alınarak, sabah 9:00-12:00 saatleri arasında ve standart kahvaltıdan en az iki saat sonra toplandı.

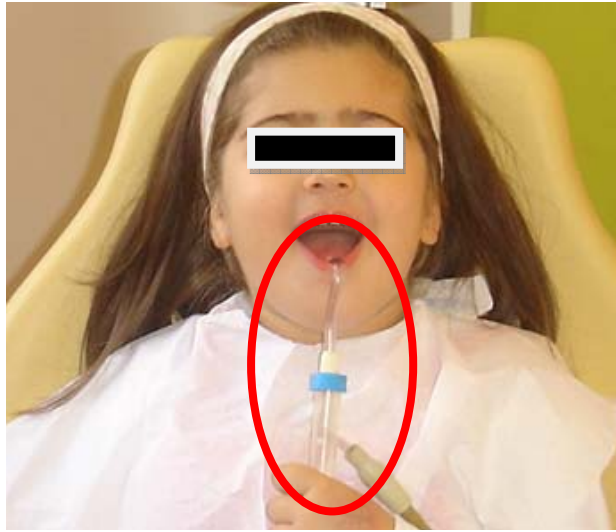
Tükürük örneklerin toplanmasında suction esaslı bir tükürük toplama aparatı kullanıldı. 15 ml.'lik falkon tüp üzerinde 2 delik açıldı. a deliğinden aspirasyon

sisteminin negatif basıncı temin edildi ve b deliğine adapte edilen bir tükürük emici, elde edilen negatif basınç yardımıyla ağızdan tükürük örneği toplandı. (Resim 4,5).

Alınan tükürük örneklerinde, öncelikle tükürük akış hızı ölçüldü. Örnekler 2 ayrı ependorfa paylaştırılarak kuru buz ile ilgili birimlere ulaştırıldı.



**Resim 4:** Çalışmada kullanılan tükürük toplama aparatı.



**Resim 5:** Tükürük toplama

### 5.2.1. Tükürük akış hızı ölçümü

Tükürük akış hızının ölçümü, dereceli tüpte aşağıdaki formüle göre hesaplandı.  
Akım oranı = 2,5 ml tükürük örneği/ dakika

### 5.2.2. Tükürük pH' sının tayini

Tükürük örneklerinin pH'sı indikatör yardımıyla saptandı



Resim 6: Tükürük pH indikatörü

### 5.2.3. Tükürük tamponlama kapasitesinin tayini

Tükürük tamponlama kapasitesi tayini, M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler, Biyokimya Bilim Dalı'nda yapıldı. İçerisinde 1,0 ml tükürük bulunan tüp içine 3,0 ml 0,0033 N HCl eklendikten sonra tüp iyice çalkalandı. Karbondioksitin çıkması için kapağı açık olarak 10 dakika bekletildi. pH indikatörü (GC America) ile tamponlama kapasitesi tespit edildi.

### 5.3. Tükürük örneklerinin ICP-AES ile analizi

Çocuklardan alınan tükürük örneklerinin ikinci kısmı ise ICP-AES ile analiz edilmek üzere Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne gönderildi. Tükürük örneklerinde Cu, Fe, Zn, Mg, Mn, Ca, P elementlerinin analizi için Perkin Elmer Optima 2100 DV model ICP-AES cihazı kullanıldı (Resim 7). Örnekler 1 M HNO<sub>3</sub> ile seyreltikten sonra Tablo 6'da verilen şartlar altında direkt olarak ICP-AES ile analiz edildi.

Analizi yapılan elementlere ait kalibrasyon verileri Tablo 5'de verilmiştir. Kalibrasyon eşitlikleri; Cu için 10-200 ng/ml, Fe için 20-400 ng/ml, Mg için 100-200 ng/ml, Zn için 50-100 ng/ml, Ca için ng/ml, P için 70.5-1410 ng/ml ve Mn için 10-120 ng/ml derişim aralıklarında hazırlandı.



**Resim 7:** ICP-AES Cihazı (Perkin Elmer Optima 2100 DV)

**Tablo 5:** ICP-AES ile analizi yapılan elementlere ilişkin kalibrasyon verileri

| Element | Kayma    | Eğim   | $r^2$  |
|---------|----------|--------|--------|
| Cu      | -266,7   | 455,5  | 0,9996 |
| Fe      | -590,3   | 471,5  | 0,9998 |
| Zn      | 4050,5   | 140,6  | 0,9951 |
| Mg      | -10086,2 | 811,7  | 0,9989 |
| Ca      | -7943,5  | 254500 | 09993  |
| P       | 17242    | 51206  | 0,9926 |
| Mn      | -1464,8  | 2827   | 0,9998 |

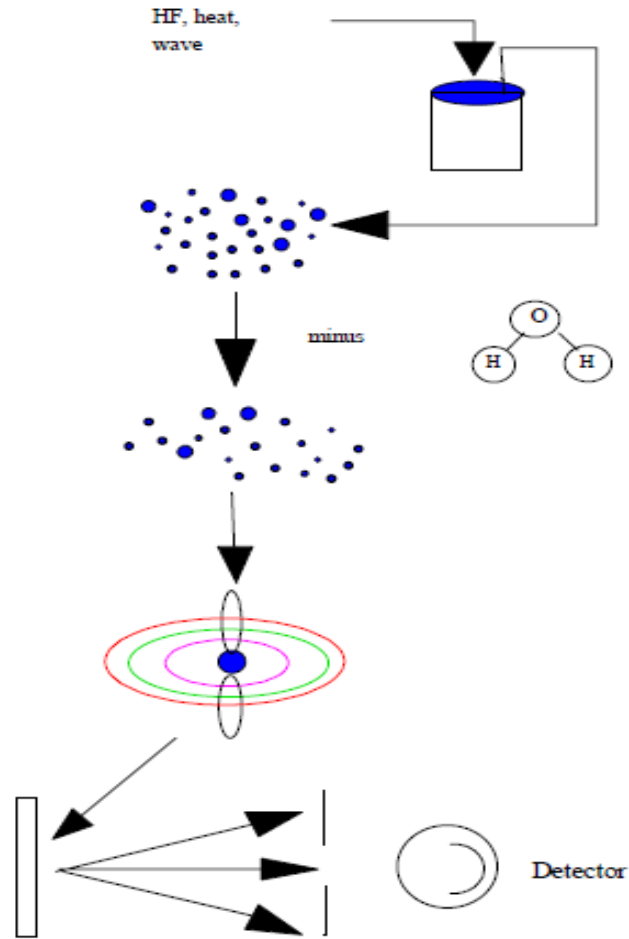
**Tablo 6:** ICP-AES cihazının çalışma şartları

| Parametre   |   |
|---|---|
| RF gücü (W)                                       | 1450  |
| Plazma gaz akış hızı (L min <sup>-1</sup> )       | 15  |
| Yardımcı gaz akış hızı (L min <sup>-1</sup> )     | 0.2   |
| Sisleştirici gaz akış hızı (L min <sup>-1</sup> ) | 0.8   |
| Örnek akış hızı (L min <sup>-1</sup> )            | 1.5   |
| Okuma modu  | Aksiyal-Radyal  |
| Değerlendirme                                     | Pik alanı   |
| Source equilibration time (s)                     | 15  |
| Okuma gecikmesi (s)                               | 60  |
| Tekrar  | 3   |
| Zemin düzeltme                                    | 2-noktalı (el ile nokta seçimi)   |
| Sprey çember                                      | Scott tip sprey çember  |
| Sisleştirici                                      | Çapraz akış GemTip Sisleştirici<br>(HF dirençli)  |
| Dedektör  | Yük eşleşmiş dedektör (CCD)   |
| Purge gas   | Azot  |
| Shear gaz   | Hava  |
| Gaz   | Argon   |
| Analitik dalga boyları (nm)                       | Cu 327.393<br>Fe 238.204<br>Mg 285.213<br>Zn 206.200<br>Ca 393.366<br>P 213.617<br>Mn 257.610 |



Çalışma Prensipleri:

- 1- Örneğin ön hazırlığı (asit / ısı / mikrodalga ile)
- 2- Nebulizatör yardımı ile aerosol hale dönüşme (püskürtülme)
- 3- Sıvı haldeki örneklerin püskürtüldükten sonra gaz haline dönüşmesi
- 4- Gaz halindeki örneklerin iyonlara ayrışması
- 5- Atomların uyarılarak belirli dalga boylarında ışık yayması (emisyon)
- 6- Yayılan ışıkların spektrometre ile kantitatif ölçümünden oluşmaktadır.



Şekil 6: ICP-AES çalışma basamakları (50)

#### 5.4. Dental plak örneklerinin toplanması

Araştırmaya katılan çocuklara, plak birikimini sağlamak amacıyla 24 saat süreyle her türlü oral hijyen işlemi bırakıldı. Plak toplama işlemi kahvaltıdan en az 2 saat sonra yapıldı.

Her plak toplama işleminden önce, plak örneklerinin konacağı steril tüplerin ağırlığı önceden hassas terazi ile tartılarak belirlendi.

Dişler pamuk tamponlar ile tükürükten izole edildikten sonra hafifçe hava ile kurutuldu. Supragingival dental plak örnekleri, renklenmenin yoğun olarak gözlemlendiği alt kesici dişlerin dile komşu yüzeylerinden steril ekskavatör yardımı ile kanamaya neden olabilecek hasar oluşturmadan toplandı. Toplanan plak örnekleri yukarıda bahsedilen tüplere konulduktan sonra tekrar tartılıp başlangıç ağırlıkları çıkartılarak yaş plak ağırlıkları belirlendi. Daha sonra tartılan plak örnekleri kuru buz ile İ.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji- İmmunoloji AD PCR laboratuvarına taşındı.

#### 5.5. Dental plak örneklerinin mikrobiyolojik analizi

Çalışmamızın mikrobiyolojik analiz kısmında sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

- Plak örneklerinin homojenizasyonu ve saklanması (Deneysel Tıp Araştırma Merkezi: DETAM)
- Suşların üretilmesi ve DNA izolasyonu (İ.Ü Dis Hek. Fak. Mikrobiyoloji Bilim Dalı)
- Plazmide klonlanarak standartların oluşturulması. ( $10^9$ ..... $10^0$ ) (GENMAR)
- Negatif Kontrol (NCT) ve klonlama ile elde edilen standartların, Real Time PCR'de (Light Cycler 2.0) standart eğri eldesi (İ.ÜTıp Fak. Mikrobiyoloji-İmmunoloji AD)
- $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  lik standartlar , NCT, hazırlanan örneklerin Real Time PCR cihazı ile kantitasyonu. (İ.Ü Tıp Fak. Mikrobiyoloji-İmmunoloji AD.)

### 5.5.1. Dental plak örneklerinin homojenizasyonu

Çalışmamızın bu kısmı DETAM' da gerçekleştirildi. Islak ağırlığı ortalama 55 mg olan dental plak örnekleri, içinde 1,0 ml PBS (fosfatla tamponlanmış solüsyon) bulunan MagNA Lyser Green Beads tüplerine alındı (Resim 8).

Yaklaşık 60 sn MagNa Lyser cihazında en son devirde çalıştırılarak homojenizasyon sağlandı (Resim 9). Homojen sıvı, pipetle R-Nase D-Nase Free 1.5 ml lik santrifüj tüplerine alındı. Santrifüj tüpüne alınan örnekler etiketlenip RT-PCR için kullanılana kadar derin dondurucuda ( -20<sup>0</sup> C) saklandı.



**Resim 8:** MagNA Lyser Green Beads (Roche) **Resim 9:** MagNA Lyser Cihazı (Roche)

### 5.5.2 ATCC suşlarının çoğaltımı ve PCR için hazırlanması

#### Çalışmada kullanılan ATCC suşları

Çalışmada kullanılan bakteri suşları American Type Culture Collection (ATCC) dan sağlandı.

ATCC 43146  $\longrightarrow$  *Actinomyces viscosus*

ATCC 51655  $\longrightarrow$  *Actinomyces naeslundii*

ATCC 25175  $\longrightarrow$  *Streptococcus mutans* (163).

### 5.5.2.1. ATCC suşlarının uygun koşullarda çoğaltımı

ATCC 43146 ( *A. viscosus*): %5 lik Koyun kanı içeren Triptik Soy agarda, 35<sup>0</sup>C de, Anaerobik ortamda 3 gün süre ile inkübe edildi.

ATCC 51655 ( *A. naeslundii* ): %5 lik Koyun kanı içeren Triptik Soy agarda, 35<sup>0</sup>C de, Anaerobik ortamda 3 gün süre ile inkübe edildi

ATCC 25175( *S. mutans* ): %5 lik Koyun kanı içeren Triptik Soy agarda, 35<sup>0</sup>C de, Aaerobik ortamda 3 gün süre ile inkübe edildi.

### 5.5.2.2. ATCC suşlarının DNA izolasyonu

- 1- Tüm ATCC suşları steril distile suda sulandırıldıktan sonra ( 10<sup>9</sup> bakteri), 200µl si 1.5 ml lik ependorf tüplere alınarak 3000 x g de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- Pelletin üzerine 200µl PBS eklendi
- 3- 5µl Lizozim ( 10mM Tris HCL içinde10mg/ml, pH: 8.0 ) eklendi ve 15 dakika 37<sup>0</sup>C de inkübe edildi.
- 4- 200 µl Binding Buffer, 40 µl Proteinaz K eklendi ve yavaşça karıştırılıp 10 dakika 70<sup>0</sup>C de inkübe edildi.
- 5- 100µl isopropanol eklenip iyice karıştırıldı.
- 6- Kitin içinde bulunan toplama tüpleri filtreli tüplerle kombine edilip, tüm sıvı filtreli tüpe aktarıldı ve 8000 x g de 1 dakika santrifüj edildi.
- 7- Toplama tüpünde biriken sıvı tüple birlikte atıldı ve filtreli tüp yeni bir toplama tüpüyle kombine edildi.
- 8- 500 µl Removal Buffer, filtreli tüpe eklenip 8000 x g de 1 dakika santrifüj edildi.
- 9- Toplama tüpünde biriken sıvı tüple birlikte atıldı ve filtreli tüp yeni bir toplama tüpüyle kombine edildi.
- 10- 500 µl Wash Buffer, filtreli tüpe eklenip 8000 x g de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11- Toplama tüpünde biriken sıvı tüple birlikte atıldı ve filtreli tüp yeni bir toplama tüpüyle kombine edildi.
- 12- 500 µl Wash Buffer, filtreli tüpe eklenip 8000 x g de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ikinci kez tekrar edilmiş oldu. Alt tüpte biriken sıvı dökülüp tekrar aynı filtreli tüple kombine edilip 10 saniye en yüksek devirde santrifüj

edildikten sonra toplama tüpü atıldı, filtreli tüp steril RNase-DNase Free 1.5 ml lik ependorf tüpüyle kombine edildi.

13- Filtreli tüplerin içine 200 µl önceden 70<sup>0</sup>C de ısıtılmış Elution Buffer eklenip 8000 x g de 1 dakika santrifüj edildi.

14- Ependorf tüpünde toplanan DNA örnekleri – 20<sup>0</sup>C de saklandı.

### 5.5.3. Standartların hazırlanması

ATCC suşlarına ait tüm DNA lar spesifik primerler ile birlikte GENMAR firması tarafından plazmide klonlanıp, sırasıyla 10<sup>9</sup>-10<sup>1</sup> seyreltilerek standartlar hazırlandı.

### 5.5.4. Real Time PCR analizi

Her biri 15 µl PCR mixi ve 5 µl DNA içeren örneklerin Real Time PCR (LightCycler 2.0- Roche) ile kantitasyonu tüm bakteri türleri için (*A. viscosus*, *A. naeslundii*, *S. mutans*) aynı çalışma protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

#### 5.5.4.1. RT-PCR çalışma protokolü

Kullanılan primer'e göre değişkenlik gösteren 'Yapışma (annealing) sıcaklığı' ve 'süresi' 55<sup>0</sup>C de 30 saniye olarak optimize edildi

|                      |                    |                   |           |          |
|----------------------|--------------------|-------------------|-----------|----------|
| <b>Preinkübasyon</b> | -----Denatürasyon  | 95 <sup>0</sup> C | 1 dakika  | 1 döngü  |
| <b>Amplifikasyon</b> | ----- Denatürasyon | 95 <sup>0</sup> C | 10 saniye | 45 döngü |
|                      | Yapışma            | 55 <sup>0</sup> C | 30 saniye |          |
|                      | Uzama              | 72 <sup>0</sup> C | 1 saniye  |          |
| <b>Soğuma</b>        |                    | 40 <sup>0</sup> C | 30 saniye | 1 döngü  |

#### 5.5.4.2. Master mix'in hazırlanması

Bu karışımın hazırlanmasında LightCycler® TaqMan® Master (Roche, 04535286001) kitinin prospektüsünün önerileri dikkate alındı.

#### LightCycler® TaqMan® Master Kit İçeriği

- LightCycler® FastStart Enzyme ( FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu,dNTP karışımı ve MgCl<sub>2</sub>) **(1a etiketli tüp)**
- LightCycler® FastStart TaqMan® Reaction Mix **(1b etiketli tüp)**
- H<sub>2</sub>O, PCR-grade, 2 x 1 ml

1a etiketli tüp den 10 µl alınıp 1b etiketli tüpe eklenip iyice karıştırılarak **master mix** elde edildi.

#### 5.5.4.3. PCR karışımının hazırlanması

PCR sıvısı (su) : 9,9µl

Forward Primer: 0.5µl ( solüsyonda son konsantrasyon 0,5µM)

Reverse Primer: 0,5 µl ( solüsyonda son konsantrasyon 0,5µM)

TaqMan Probe : 0,1 µl ( solüsyonda son konsantrasyon 0,1µM)

Master mix (tüp1): 4 µl

(Sadece 1 örnek için verilen 15 µl bu karışımın miktarı örnek sayısı ile doğru orantılı olarak artırıldı).

#### 5.5.4.4. Kullanılan Primer dizileri

*A.naeslundii* Forward: 5'-TCGAAACTCAGCAAGTAGCCG-3'

*A.naeslundii* Reverse: 5'-AGAGGAGGGCCACAAAAGAAA-3'

( Amplikon uzunluğu: 96 bp)

*A.viscosus* Forward: 5'-ATGTGGGTCTGACCTGCTGC-3'

*A.viscosus* Reverse: 5'-CAAATCGATCACGCTCCG-3'

( Amplikon uzunluğu: 96 bp)

*S.mutans* Forward: 5'-GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT-3'

*S.mutans* Reverse: 5'-GCCATACACCACTCATGAATTGA-3'

( Amplikon uzunluğu: 114 bp)

#### 5.5.4.5. Kullanılan TaqMan (Hidroliz) Probe dizileri

*A.naeslundii*: 5\_-FAM-GGGTACTCTAGTCCAAACTGGCGGATAGCG-TAMRA-3

*A.viscosus*: 5\_-FAM-ACGGAGGTCGGGAACGGTGGAAAG-TAMRA-3

*S.mutans*: 5\_-FAM-TGGAAATGACGGTCGCCGTTATGAA-TAMRA-3



**Resim 10:** Primer-Probe (ATCC)

#### 5.5.4.6. Örneklerin Real-Time PCR ile kantitasyonu

Real-Time PCR’de çalışılmak üzere -20 C’de saklanan örnekler kontaminasyon riskini önlemek için biyolojik kabinde çalışıldı (Resim 11).

Her kapillere (LightCycler ® Capillaries, 11 909 339 001) önce 15µl PCR karışımı dağıtıldı. Sonrasında her bir kapillere başta standartlar olmak üzere sırayla örneklere ait DNA dan 5µl eklendi (Resim 12)

Kapiller adaptörüne yerleştirilen örnekler santrifüj cihazına yerleştirilerek 3000 devirde 15 sn santrifüj edildikten sonra RT-PCR (LightCycler ® 2.0,Instrument- 03 351 414 001) cihazına konulmak üzere carousele (LightCycler® Carousel 2.0- 03 724 697 001) yerleştirildi ( Resim 13, 14,15,16 ).



**Resim 11:** Örneklerin çalışıldığı biyolojik kabin





**Resim 12:** Kapiller (LightCycler®Capillaries)



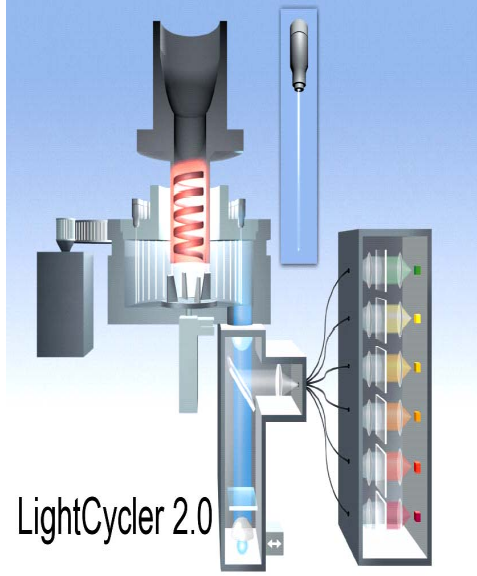
**Resim13:** Kapiller adaptör (LightCycler ® Centrifuge Adapters).



**Resim 14:** Santrifüj cihazı  
(Centrifuge 5804 R, Eppendorf )

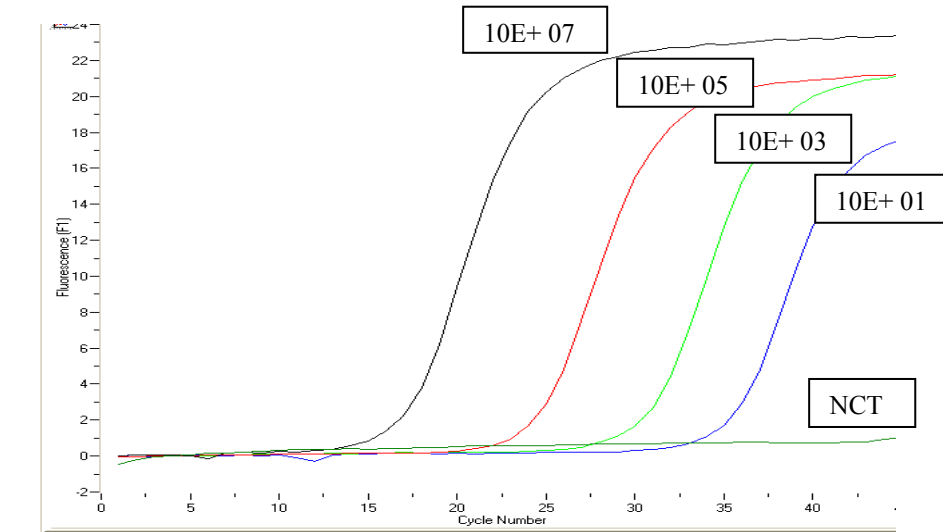


**Resim 15:** Kapillerlerin santrifüj cihazına yerleştirilmesi



Sekil: LightCycler 2.0 iç kısım şematik görüntüsü **Resim16:** RT-PCR cihazı (LightCycler® 2.0, Instrument, Roche)

Kantitasyon yapılmadan önce, seri dilüsyonlar sonucu elde edilen standartlar ve negatif kontrol (NCT) bulunan kapillerler, RT-PCR’de bakteri suşlarına özgün hazırlanmış protokolle çalıştırılarak standart eğri elde edildi.



**Resim17:** Standardizasyon eğrisi

Son olarak örnekler ve standartların bulunduğu carousel, RT-PCR cihazına yerleştirilerek yaklaşık 50 dakika devam eden çalışma protokolü sonunda elde edilen kantitasyon değerleri ve eğriler LightCycler bilgisayar yazılımı ile bilgisayara kaydedildi.(Versiyon 3.5) (Roche Diagnostics)



Resim18: Bilgisayarda izlenen analiz sonuçları

| Well | Well Name   | Dye | Well Type | Replicate | Threshold (dRn) | Ct (dRn) | Quantity (nan... | Quantity Avg. (nano... | Quantity SD (nanograms) | RSq (dRn) |
|------|-------------|-----|-----------|-----------|-----------------|----------|------------------|------------------------|-------------------------|-----------|
| A1   | 50.0ng      | FAM | Standard  | 1         | 0.0700          | 24.07    | 5.00e+001        | 5.000e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| A2   | 50.0ng      | FAM | Standard  | 1         | 0.0700          | 24.08    | 5.00e+001        | 5.000e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| A3   | 50.0ng      | FAM | Standard  | 1         | 0.0700          | 24.03    | 5.00e+001        | 5.000e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| B1   | 25.0ng      | FAM | Standard  | 2         | 0.0700          | 25.11    | 2.50e+001        | 2.500e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| B2   | 25.0ng      | FAM | Standard  | 2         | 0.0700          | 25.07    | 2.50e+001        | 2.500e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| B3   | 25.0ng      | FAM | Standard  | 2         | 0.0700          | 25.13    | 2.50e+001        | 2.500e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| C1   | 12.5ng      | FAM | Standard  | 3         | 0.0700          | 26.16    | 1.25e+001        | 1.250e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| C2   | 12.5ng      | FAM | Standard  | 3         | 0.0700          | 26.14    | 1.25e+001        | 1.250e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| C3   | 12.5ng      | FAM | Standard  | 3         | 0.0700          | 26.06    | 1.25e+001        | 1.250e+001             | 0.000e+000              | 0.999     |
| D1   | 6.25ng      | FAM | Standard  | 4         | 0.0700          | 27.22    | 6.25e+000        | 6.25                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| D2   | 6.25ng      | FAM | Standard  | 4         | 0.0700          | 27.16    | 6.25e+000        | 6.25                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| D3   | 6.25ng      | FAM | Standard  | 4         | 0.0700          | 27.13    | 6.25e+000        | 6.25                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| E1   | 3.125ng     | FAM | Standard  | 5         | 0.0700          | 28.15    | 3.13e+000        | 3.13                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| E2   | 3.125ng     | FAM | Standard  | 5         | 0.0700          | 28.08    | 3.13e+000        | 3.13                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| E3   | 3.125ng     | FAM | Standard  | 5         | 0.0700          | 28.10    | 3.13e+000        | 3.13                   | 0.000e+000              | 0.999     |
| F1   | hREF 10ng   | FAM | Unknown   | 6         | 0.0700          | 29.11    | 1.62             | 1.66                   | 5.058e-002              | 0.999     |
| F2   | hREF 10ng   | FAM | Unknown   | 6         | 0.0700          | 29.02    | 1.72             | 1.66                   | 5.058e-002              | 0.999     |
| F3   | hREF 10ng   | FAM | Unknown   | 6         | 0.0700          | 29.07    | 1.66             | 1.66                   | 5.058e-002              | 0.999     |
| G1   | hPPAR       | FAM | NTC       | 7         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| G2   | hPPAR       | FAM | NTC       | 7         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| G3   | hPPAR       | FAM | NTC       | 7         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| H1   | 46:06/03... | FAM | NAC       | 8         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| H2   | 5:05/07/97  | FAM | NAC       | 8         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| H3   | 6:05/21/97  | FAM | NAC       | 8         | 0.0700          | No Ct    | No Ct            | No Ct                  | No Ct                   | 0.999     |
| A4   | 4:04/30/97  | FAM | Unknown   | 9         | 0.0700          | 25.78    | 1.563e+001       | 1.484e+001             | 7.224e-001              | 0.999     |
| A5   | 4:04/30/97  | FAM | Unknown   | 9         | 0.0700          | 25.92    | 1.422e+001       | 1.484e+001             | 7.224e-001              | 0.999     |
| A6   | 4:04/30/97  | FAM | Unknown   | 9         | 0.0700          | 25.88    | 1.466e+001       | 1.484e+001             | 7.224e-001              | 0.999     |
| B4   | 4:11/20/... | FAM | Unknown   | 10        | 0.0700          | 26.04    | 1.311e+001       | 1.325e+001             | 1.734e-001              | 0.999     |
| B5   | 4:11/20/... | FAM | Unknown   | 10        | 0.0700          | 26.03    | 1.320e+001       | 1.325e+001             | 1.734e-001              | 0.999     |
| B6   | 4:11/20/... | FAM | Unknown   | 10        | 0.0700          | 26.00    | 1.345e+001       | 1.325e+001             | 1.734e-001              | 0.999     |
| C4   | 40:02/03... | FAM | Unknown   | 11        | 0.0700          | 26.50    | 9.58             | 9.63                   | 6.092e-001              | 0.999     |
| C5   | 40:02/03... | FAM | Unknown   | 11        | 0.0700          | 26.59    | 9.04             | 9.63                   | 6.092e-001              | 0.999     |
| C6   | 40:02/03... | FAM | Unknown   | 11        | 0.0700          | 26.40    | 1.026e+001       | 9.63                   | 6.092e-001              | 0.999     |
| D4   | 40:07/22... | FAM | Unknown   | 12        | 0.0700          | 26.77    | 7.99             | 8.01                   | 4.159e-001              | 0.999     |
| D5   | 40:07/22... | FAM | Unknown   | 12        | 0.0700          | 26.69    | 8.43             | 8.01                   | 4.159e-001              | 0.999     |
| D7   | 40:07/22... | FAM | Unknown   | 12        | 0.0700          | 26.77    | 7.99             | 8.01                   | 4.159e-001              | 0.999     |

Resim19: Bilgisayarda okunan kantitatif değerler

## 5.6. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılıma uygunluk göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk gösteren parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Student t test, normal dağılıma uygunluk göstermeyen parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Spearman's rho korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## 6. BULGULAR

Çalışmamızın bu bölümünde yaşları 6 ile 12 arasında değişen 26'sı (%57.8) kız, 19'u (%42.2) erkek olmak üzere toplam 45 çocuğa ait sonuçlar verilmiştir. Çocukların ortalama yaşları  $9.64 \pm 1.61$ 'dir.

**Tablo 7:** Gruplara göre yaş, cinsiyet ve çürük durumunun değerlendirilmesi

|                     |              | <b>R (+)</b><br><b>n (%)</b>     | <b>R (-)</b><br><b>n (%)</b>     | <sup>+</sup> <i>p</i>  |
|---------------------|--------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| <b>Yaş</b>          | <b>6-9</b>   | 10 (%37,0)                       | 11 (%61,1)                       | <b>0,113</b>           |
|                     | <b>10-12</b> | 17 (%63,0)                       | 7 (%38,9)                        |                        |
| <b>Cinsiyet</b>     | <b>Erkek</b> | 10 (%37,0)                       | 9 (%50,0)                        | <b>0,388</b>           |
|                     | <b>Kız</b>   | 17 (%63,0)                       | 9 (%50,0)                        |                        |
| <b>Çürük Durumu</b> | <b>1-5</b>   | 24 (%88,9)                       | 8 (%44,4)                        | <b>0,001**</b>         |
|                     | <b>6-10</b>  | 3 (%11,1)                        | 10 (%55,6)                       |                        |
|                     |              | <b>Ort±SS</b><br><b>(Medyan)</b> | <b>Ort±SS</b><br><b>(Medyan)</b> | <sup>++</sup> <i>p</i> |
| <b>DMF-T</b>        |              | 1,74±1,13 (2)                    | 2,11±1,64 (2)                    | <b>0,498</b>           |
| <b>df-t</b>         |              | 1,33±1,64 (1)                    | 4,05±3,33 (3)                    | <b>0,006**</b>         |

<sup>+</sup>Ki-kare test kullanıldı

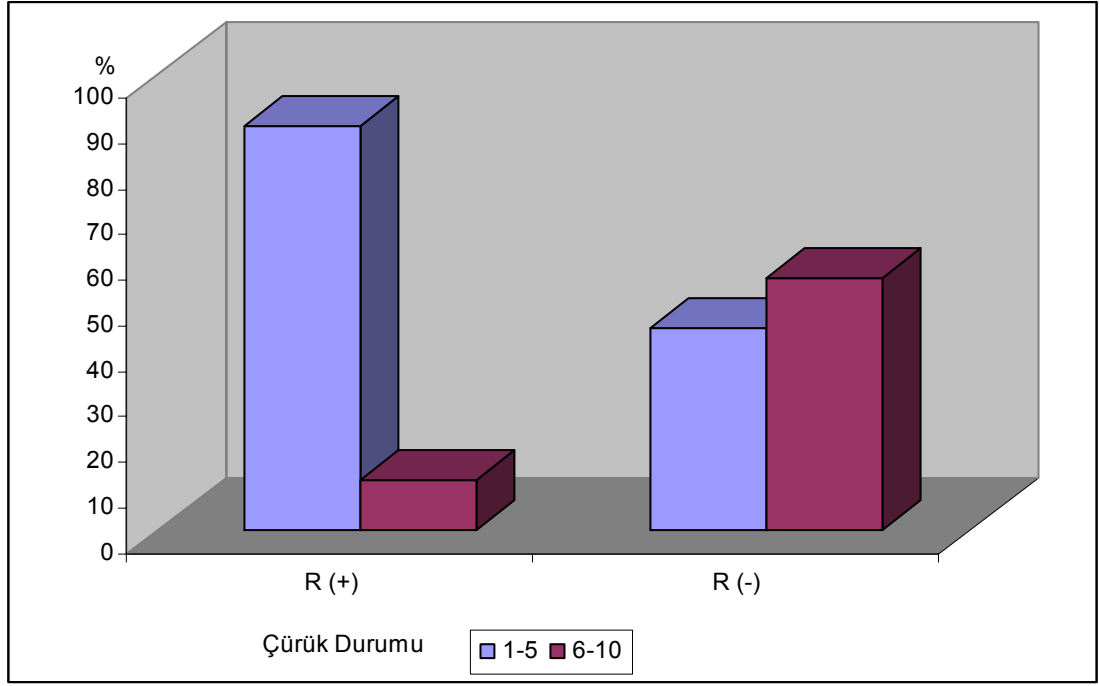
<sup>++</sup>Mann Whitney U test

\*\*  $p < 0.01$

Gruplara göre çocukların yaş dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Gruplara göre çocukların cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

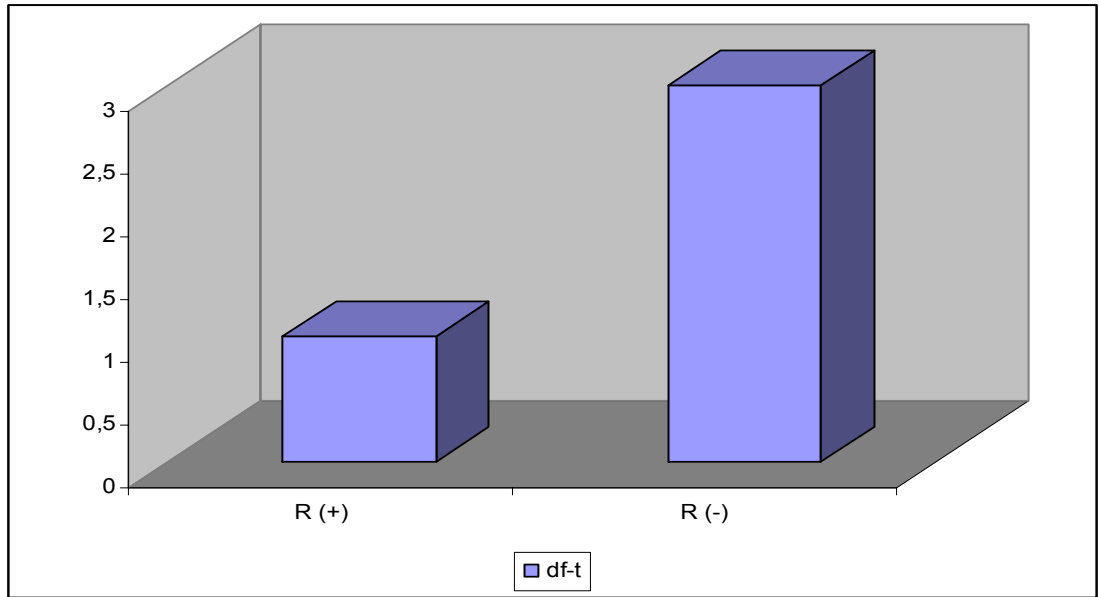
Gruplara göre çocukların çürük durumlarının dağılımları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0.01$ ). R(+) çocuklarda 1-5 arasında çürük görülme oranı, R(-) çocuklarda ise 6-10 adet dişte çürük görülme oranı anlamlı şekilde yüksektir.



**Şekil 8:** Gruplara göre çürük durumu dağılımı

Gruplara göre çocukların DMFT sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Gruplara göre çocukların df-t sayıları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0.01$ ). R(-) çocukların df-t sayıları, R(+) çocukların df-t sayılarından anlamlı şekilde yüksektir.



**Şekil 9:** Gruplara göre df-t dağılımı

**Tablo 8:** Renklenme derecesine göre yaş ve cinsiyetin değerlendirilmesi

|                 |              | Renklenme Derecesi          |                              |                             | <i>P</i>     |
|-----------------|--------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|
|                 |              | 1. Derece<br>(n=7)<br>n (%) | 2. Derece<br>(n=14)<br>n (%) | 3. Derece<br>(n=6)<br>n (%) |              |
| <b>Yaş</b>      | <b>6-9</b>   | 5 (%71,4)                   | 4 (%28,6)                    | 1 (%16,7)                   | <b>0,080</b> |
|                 | <b>10-12</b> | 2 (%28,6)                   | 10 (%71,4)                   | 5 (%83,38)                  |              |
| <b>Cinsiyet</b> | <b>Erkek</b> | 4 (%37,1)                   | 5 (%35,7)                    | 1 (%16,7)                   | <b>0,318</b> |
|                 | <b>Kız</b>   | 3 (%42,9)                   | 9 (%64,3)                    | 5 (%83,3)                   |              |

*Ki-kare test kullanıldı*

Renklenme derecesine göre yaş gruplarının dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

## 6.1. Tükürük Bulguları

**Tablo 9:** Gruplara göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| <b>ng/ml</b>                                 | <b>R (+) n: 27<br/>Ort±SS</b> | <b>R (-)n:18<br/>Ort±SS</b> | <b>P</b>       |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 7,14±4,66                     | 6,01±3,57                   | <b>0,472</b>   |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 20,64±9,70                    | 40,89±16,65                 | <b>0,001**</b> |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1737,18±307,54                | 1791,55±261,08              | <b>0,541</b>   |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 11,59±6,84                    | 17,18±6,29                  | <b>0,020*</b>  |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 260,10±164,87                 | 314,96±189,27               | <b>0,316</b>   |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 9010,70±4431,78               | 7757,94±2958,40             | <b>0,299</b>   |
| <b>P</b>                                     | 12837,48±3791,48              | 13724,44±4386,61            | <b>0,474</b>   |
| <b>Tükürük akış hızı<br/>(ml/dak)</b>        | 0,49±0,13                     | 0,55±0,22                   | <b>0,251</b>   |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,78±0,52                     | 3,14±0,51                   | <b>0,001**</b> |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,73±0,09                     | 7,68±0,12                   | <b>0,095</b>   |

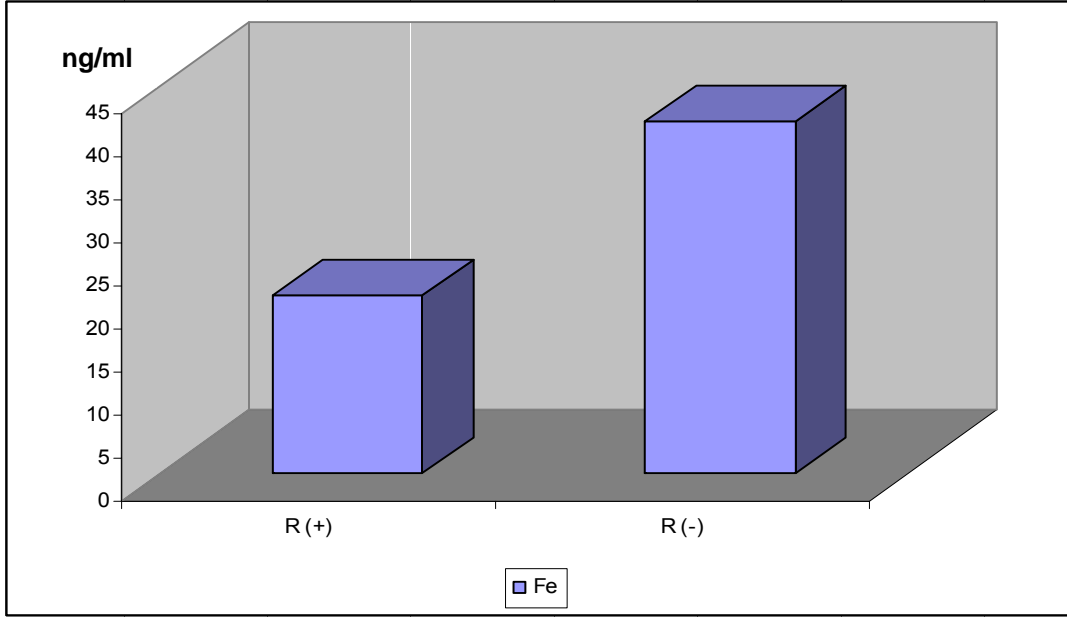
*Student t testi kullanıldı*

*\*\* p<0.01*

Gruplara göre çocukların Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(-) çocukların Fe değerleri, R(+) çocukların Fe değerlerinden ileri derecede anlamlı yüksektir ( $p<0.01$ ).

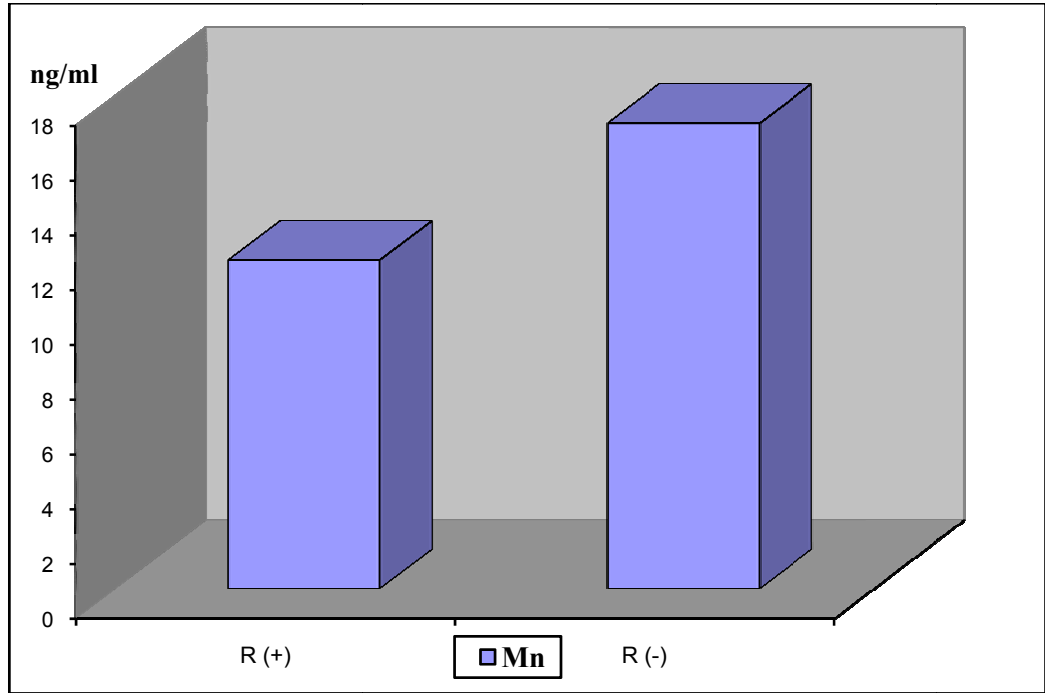




**Şekil 10:** Gruplara göre tükürük Fe dağılımı

Gruplara göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(+) çocukların tükürük Mn değerleri, R(-) çocukların Mn değerlerinden anlamlı derecede düşüktür ( $p<0.05$ ).



**Şekil 11:** Gruplara göre tükürük Mn dağılımı

Gruplara göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

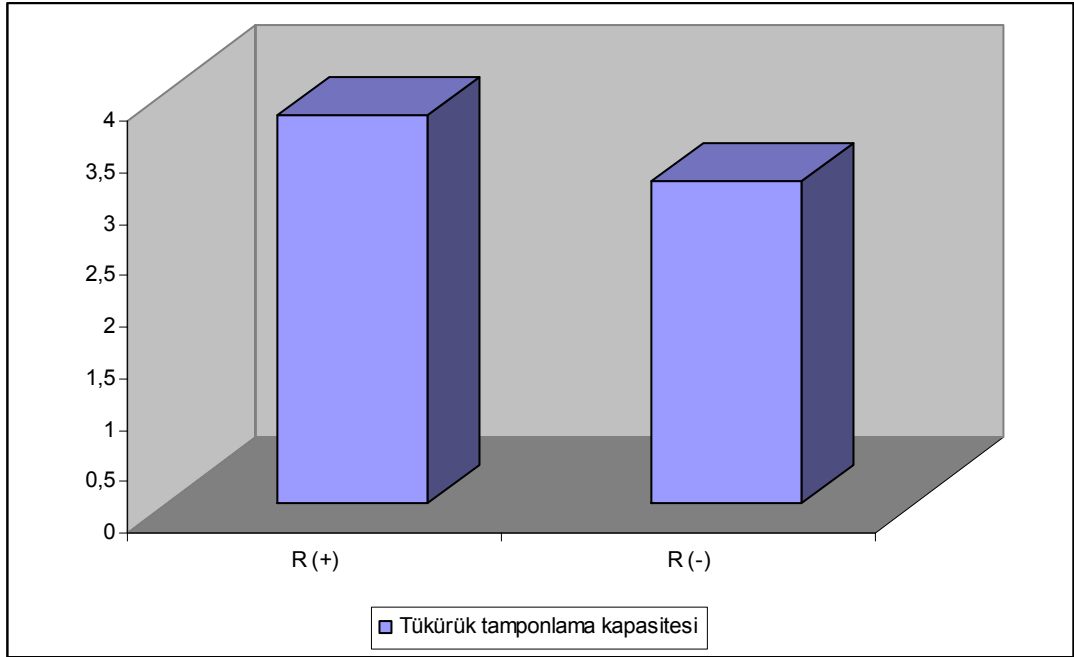
Gruplara göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(+) çocukların tükürük tamponlama kapasitesi, R(-) çocukların tükürük tamponlama kapasitesinden ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 12:** Gruplara göre tükürük tamponlama kapasitesi dağılımı

**Tablo 10:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların, gruplara göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| ng/ml  | R(+) (n=24)     | R(-) (n=8)      | P              |
|--|-----------------|-----------------|----------------|
|  | Ort±SS          | Ort±SS          |                |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 6,55±3,89       | 4,62±1,98       | <b>0,359</b>   |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 21,03±9,98      | 46,2±17,47      | <b>0,001**</b> |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1746,9±312,35   | 1726,9±207,19   | <b>0,338</b>   |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 11,84±7,15      | 18,69±6,56      | <b>0,016*</b>  |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 252,65±164,31   | 404,59±202,03   | <b>0,098</b>   |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 9103,67±4682,67 | 6683,13±2608-83 | <b>0,223</b>   |
| <b>P</b>                                     | 12762±3976,89   | 13676±4039,35   | <b>0,695</b>   |
| <b>Tükürük akış hızı<br/>(ml/dak)</b>        | 0,48±0,14       | 0,58±0,30       | <b>0,368</b>   |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,75±0,55       | 3,06±0,62       | <b>0,014*</b>  |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,72±0,09       | 7,70±0,10       | <b>0,539</b>   |

*Student t test kullanıldı*                      \*  $p<0.05$                       \*\*  $p<0.01$

**Çürük sayısı 1-5 olan R(+) ve R(-) gruplarda,**

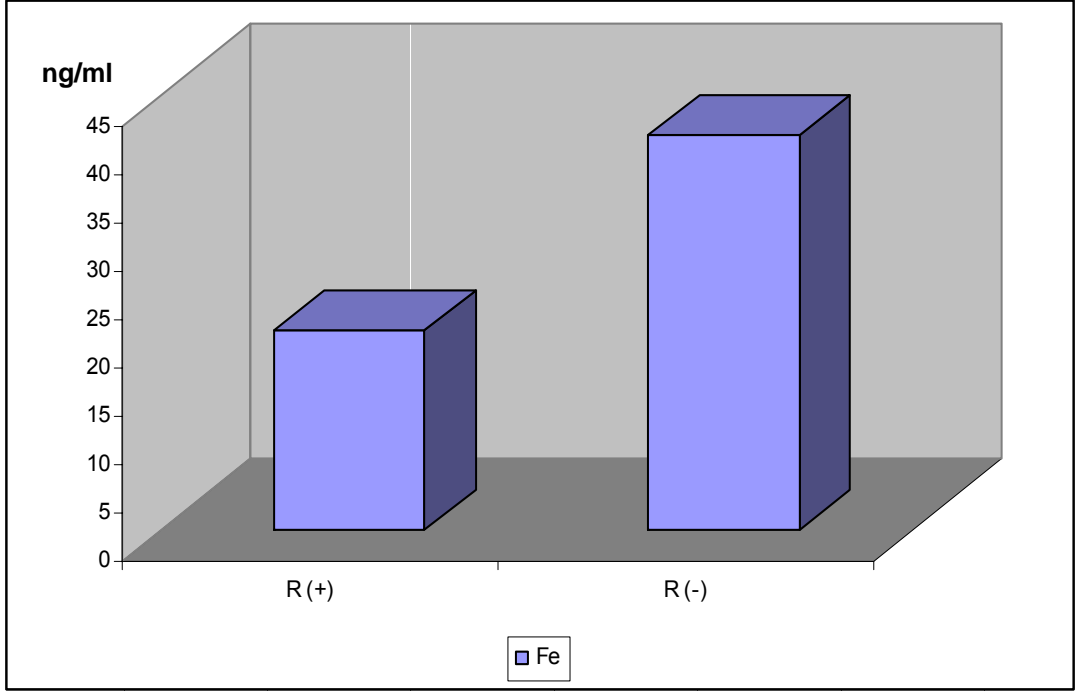
Gruplara göre çocukların tükürük Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(-) çocukların tükürük Fe değeri, R(+) çocukların Fe değerinden ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).

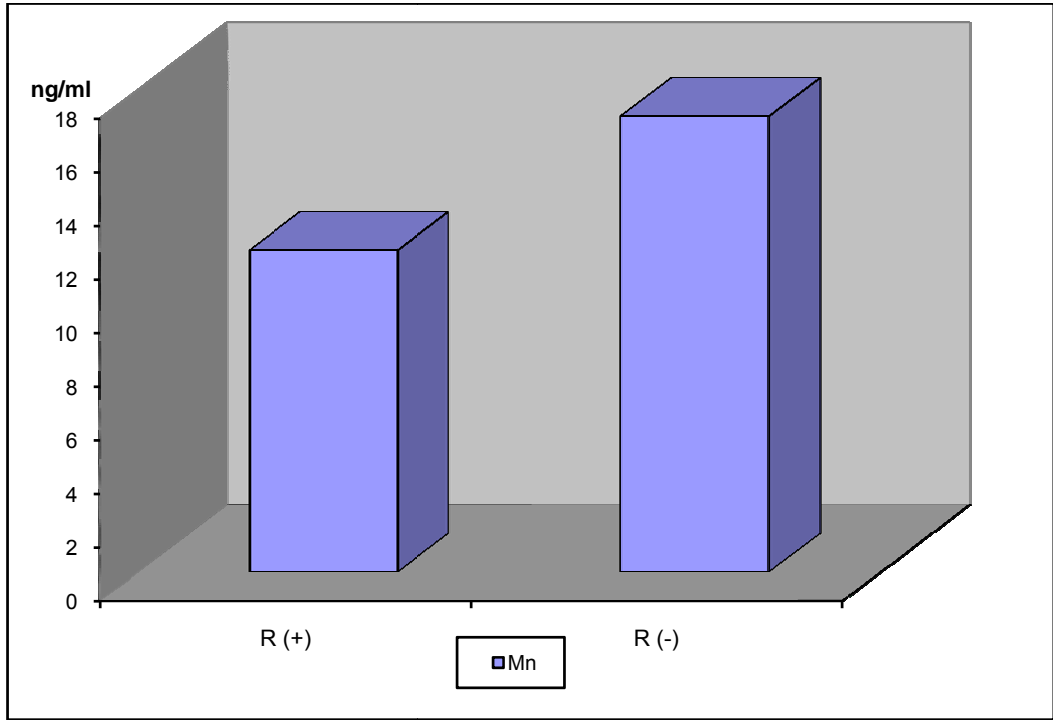
Gruplara göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(+) çocukların tükürük Mn değeri, R(-) çocukların Mn değerinden anlamlı derecede düşüktür ( $p<0.05$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 13:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tükürük Fe dağılımı



**Şekil 14:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tükürük Mn dağılımı

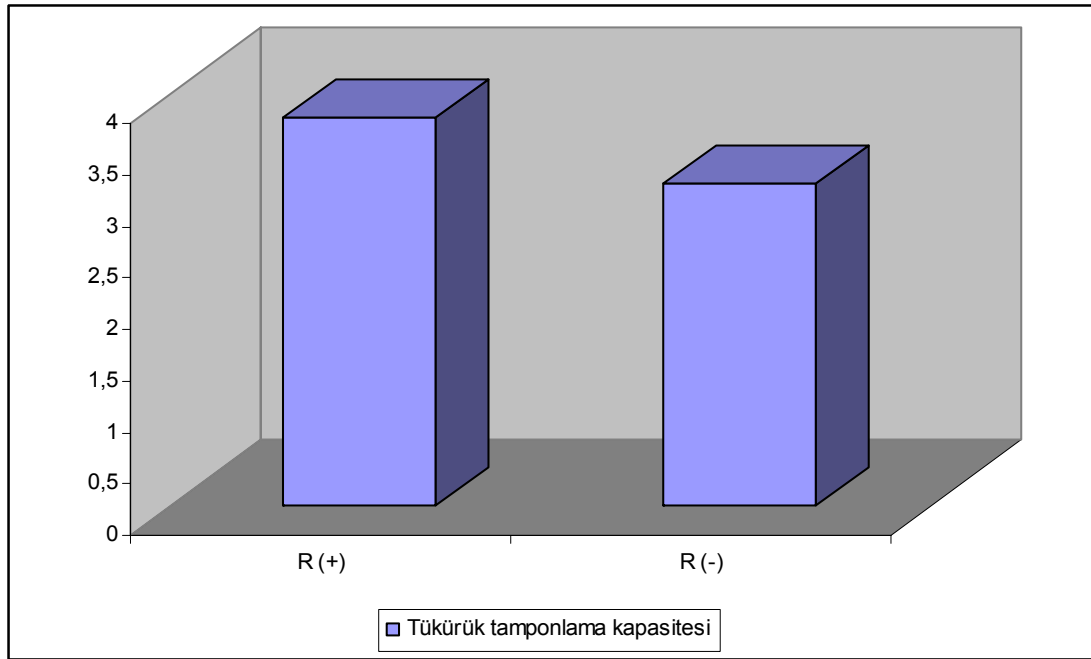
Gruplara göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

R(+) çocukların tükürük tamponlama kapasitesi, R(-) çocukların tükürük tamponlama kapasitesinden ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).

Gruplara göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 15:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların gruplara göre tamponlama kapasitesi dağılımı

**Tablo11:** R(-) gruptaki çocukların çürük durumuna göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| ng/ml  | 1-5 çürük (n=8) | 6-10 çürük (n=10) | P            |
|--|-----------------|-------------------|--------------|
|  | Ort±SS          | Ort±SS            |              |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 4,62±1,98       | 7,00±4,24         | <b>0,222</b> |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 46,2±17,47      | 36,18±15,29       | <b>0,211</b> |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1726,9±207,19   | 1843,3±297,77     | <b>0,398</b> |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 18,69±6,56      | 15,66±6,10        | <b>0,565</b> |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 404,59±202,03   | 235,27±144,07     | <b>0,178</b> |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 6683,13±2608,83 | 8617,80±3064,30   | <b>0,091</b> |
| <b>P</b>                                     | 13676,6±4039,35 | 13762,9±4863,38   | <b>0,929</b> |
| <b>Tükürük akış hızı<br/>(ml/dak)</b>        | 0,58±0,30       | 0,52±0,15         | <b>0,721</b> |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,06±0,62       | 3,2±0,42          | <b>0,672</b> |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,70±0,10       | 7,66±0,13         | <b>0,549</b> |

*Student t test kullanıldı* \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Fe değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Mn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük tamponlama kapasitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 12:** Cinsiyete göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| ng/ml  | Erkek (n=19)     | Kız (n=26)       | P             |
|--|------------------|------------------|---------------|
|  | Ort±SS (Medyan)  | Ort±SS (Medyan)  |               |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 7,23±4,97        | 6,31±3,70        | <b>0,552</b>  |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 31,77±17,68      | 26,18±14,85      | <b>0,263</b>  |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1747,37±357,08   | 1767,38±232,40   | <b>0,821</b>  |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 14,09±8,05       | 13,63±6,50       | <b>0,852</b>  |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 350,85±208,69    | 233,14±130,16    | <b>0,026*</b> |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 7351,37±3748,11  | 9356,00±3895,69  | <b>0,090</b>  |
| <b>P</b>                                     | 13564,47±4232,02 | 12920,27±3911,20 | <b>0,601</b>  |
| <b>Tükürük akış hızı<br/>(ml/dak)</b>        | 0,53±0,17        | 0,50±0,18        | <b>0,569</b>  |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,29±0,63        | 3,69±0,53        | <b>0,025*</b> |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,69±0,12        | 7,73±0,09        | <b>0,396</b>  |

*Student t test*

*\* p<0.05*

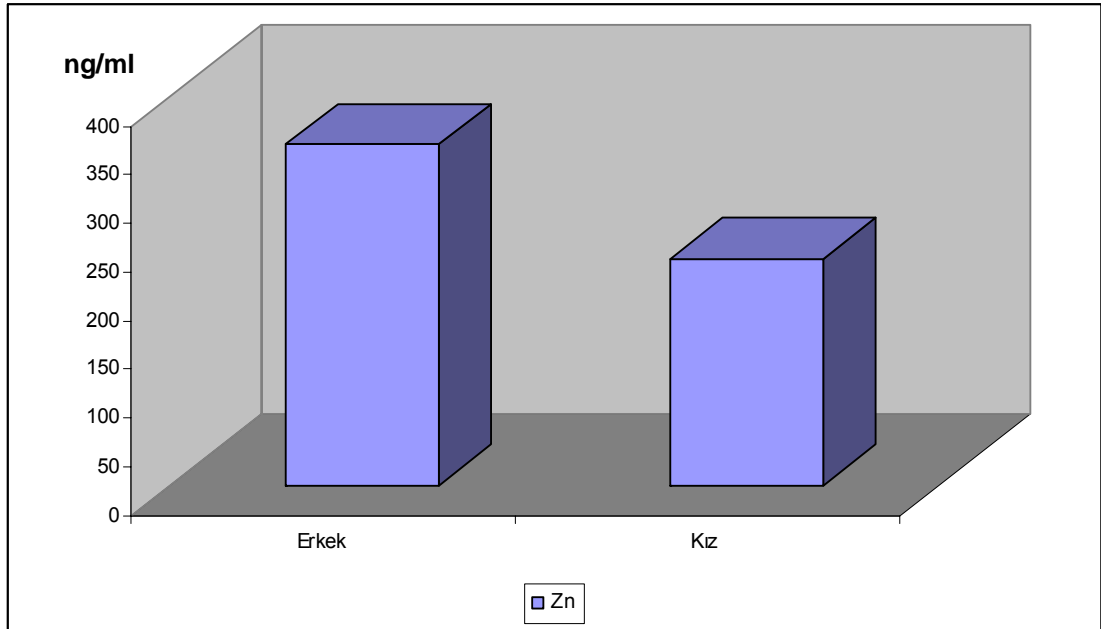
Cinsiyete göre çocukların tükürük Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük Fe değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük Mn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0.05$ ). Erkek çocukların tükürük Zn değeri, kız çocuklardan anlamlı derecede yüksektir.



**Şekil 16:** Cinsiyete göre tükürük Zn dağılımı

Cinsiyete göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

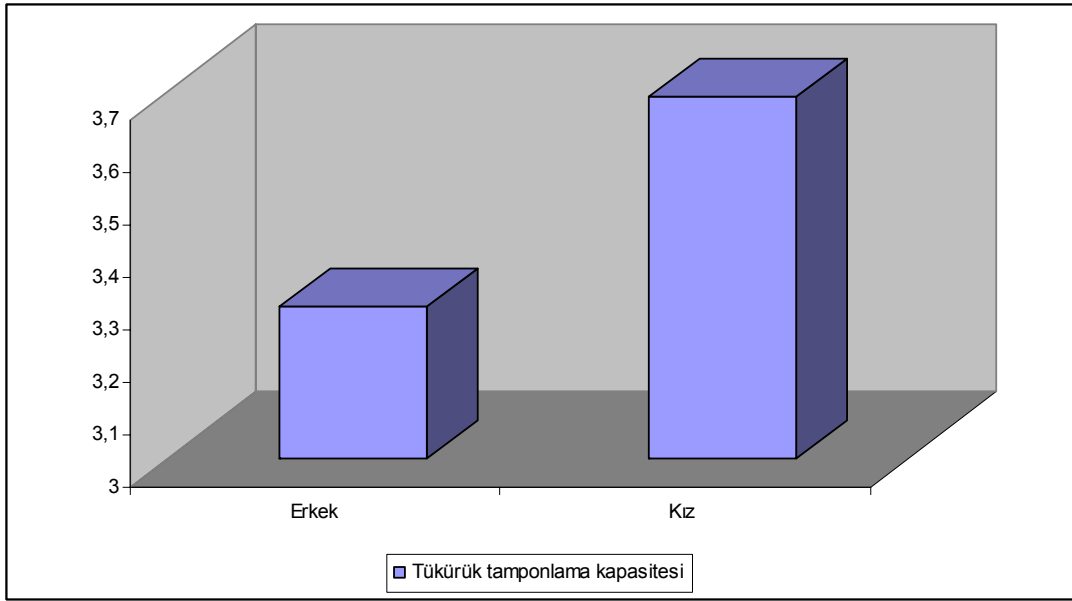
Cinsiyete göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



Cinsiyete göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların tükürük tamponlama kapasitesi değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0.05$ ). Kız çocukların tükürük tamponlama kapasitesi, erkek çocuklardan anlamlı derecede yüksektir.



**Şekil 17:** Cinsiyete göre tükürük tamponlama kapasitesi dağılımı

**Tablo 13:** Yaş gruplarına göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| ng/ml  | 6-9 yaş (n=21)   | 10-12 yaş (n=24) | P            |
|--|------------------|------------------|--------------|
|  | Ort±SS           | Ort±SS           |              |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 7,21±5,12        | 6,33±3,53        | <b>0,562</b> |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 28,73±13,34      | 28,25±18,38      | <b>0,923</b> |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1833,57±248,94   | 1693,62±308,64   | <b>0,105</b> |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 14,95±8,61       | 12,98±5,81       | <b>0,454</b> |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 298,83±162,72    | 266,68±186,15    | <b>0,550</b> |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 7370,09±3395,61  | 9506,66±4142,38  | <b>0,068</b> |
| <b>P</b>                                     | 12960,81±4376,80 | 13394,79±3754,05 | <b>0,722</b> |
| <b>Tükürük akış hızı<br/>(ml/dak)</b>        | 0,54±0,20        | 0,48±0,14        | <b>0,243</b> |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,45±0,61        | 3,58±0,60        | <b>0,473</b> |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,71±0,12        | 7,71±0,10        | <b>0,858</b> |

*Student t test kullanıldı*

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Fe değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Mn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Yaş gruplarına göre çocukların tükürük akış hızı değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük tamponlama kapasitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 14:** Renklenme derecesine göre tükürük parametrelerinin değerlendirilmesi

| ng/ml  | Renklenme Derecesi         |                            |                             | P            |
|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------|
|  | 1. Derece (n=7)            | 2. Derece (n=14)           | 3. Derece (n=6)             |              |
|  | Ort±SS<br>(Medyan)         | Ort±SS<br>(Medyan)         | Ort±SS<br>(Medyan)          |              |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>                       | 6,99±3,63<br>(7,36)        | 7,10±4,58<br>(6,56)        | 7,39±6,57<br>(4,31)         | <b>0,973</b> |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>                       | 26,37±14,35<br>(25,45)     | 17,48±6,69<br>(18,57)      | 21,32±7,12<br>(21,82)       | <b>0,143</b> |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>                       | 1790,28±202,52<br>(1745)   | 1705,21±314,99<br>(1708)   | 1749,83±421,46<br>(1817,5)  | <b>0,958</b> |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>                       | 16,11±10,56<br>(12,65)     | 10,52±5,77<br>(7,23)       | 9,42±2,21<br>(10,23)        | <b>0,416</b> |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>                       | 247,72±106,80<br>(301,25)  | 284,28±186,64<br>(322,64)  | 218,13±182,01<br>(148,12)   | <b>0,699</b> |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>                       | 7888,14±4566,55<br>(7389)  | 9083,21±4464,61<br>(8737)  | 10151,17±4684,3<br>(8440)   | <b>0,820</b> |
| <b>P</b>                                     | 12585,85±3560,4<br>(10465) | 12980,14±3977,5<br>(12047) | 12798,16±4272,7<br>(11,240) | <b>0,957</b> |
| <b>Tükürük akış<br/>hızı(ml/dak)</b>         | 0,55±0,16<br>(0,5)         | 0,50±0,09<br>(0,5)         | 0,37±0,12<br>(0,4)          | <b>0,101</b> |
| <b>Tükürük<br/>tamponlama<br/>kapasitesi</b> | 3,86±0,47<br>(4)           | 3,60±0,49<br>(3,5)         | 4,08±0,58<br>(4,2)          | <b>0,128</b> |
| <b>Tükürük pH</b>                            | 7,71±0,11<br>(7,8)         | 7,71±0,10<br>(7,8)         | 7,80±0,00<br>(7,8)          | <b>0,156</b> |

*Kruskal Wallis testi kullanıldı*

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Cu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Fe değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Mg değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Mn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Zn değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük Ca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük P değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük akış hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük tamponlama kapasitesi değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Renklenme derecelerine göre çocukların tükürük pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

## 6.2. Çürük indeksi ve dental plak bulguları

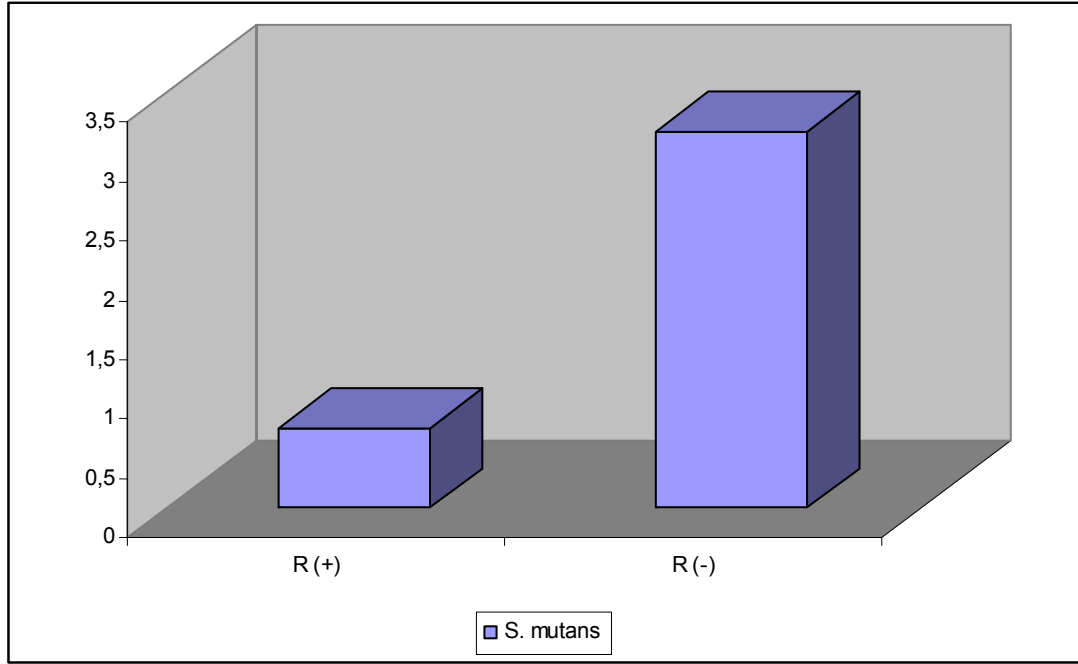
**Tablo 15:** Gruplara göre dental plak parametrelerinin değerlendirilmesi

|                    | <b>R (+) n:27</b>         | <b>R (-) n:18</b>          | <b>P</b>       |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|
|                    | <b>Ort±SS</b>             | <b>Ort±SS</b>              |                |
| <i>S. mutans</i>   | 1,48±1,39<br>(0,68)       | 2052,72±8080,88<br>(3,18)  | <b>0,039*</b>  |
| <i>A. viscosus</i> | 1612,70±1247,10<br>(1310) | 9762,28±10947,52<br>(4298) | <b>0,001**</b> |

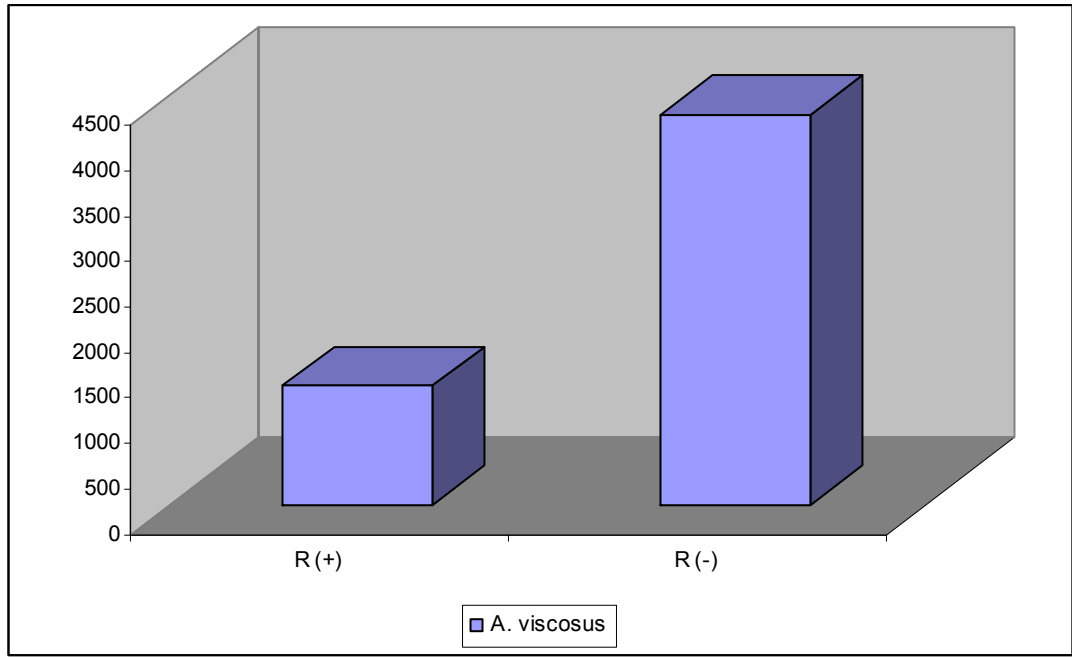
*Mann Whitney U test kullanıldı* \*\*  $p<0.01$

R(-) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarı, R (+) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarından anlamlı derecede yüksektir ( $p<0.05$ ).

R(-) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarı, R(+) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarından ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).



**Şekil 18:** Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans*'ın gruplara göre dağılımı



**Şekil 19:** Dental plak örneklerinde saptanan *A. viscosus*'un gruplara göre dağılımı

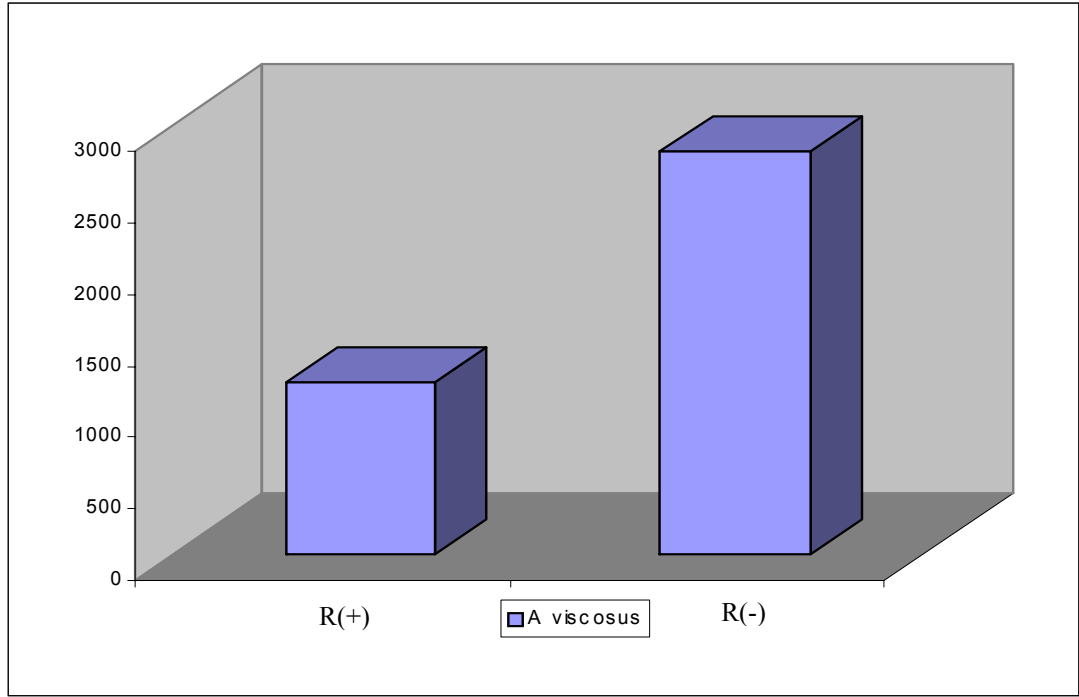
**Tablo 16:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların, dental plak parametrelerinin gruplara göre değerlendirilmesi

|                    | <b>R (+) n:24</b>         | <b>R (-) n:8</b>         | <b>P</b>     |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|--------------|
|                    | <b>Ort±SS</b>             | <b>Ort±SS</b>            |              |
| <i>S. mutans</i>   | 1,12±1,20<br>(0,63)       | 51,58±133,7<br>(1,08)    | <b>0,689</b> |
| <i>A. viscosus</i> | 1608,87±1315,91<br>(1310) | 7400,62±9271,3<br>(2820) | <b>0,04*</b> |

*Mann Whitney U test kullanıldı* *p*<0,05

Çürük sayısı 1-5 olan R(+) ve R(-) gruplarının dental plak örneklerinde saptanan *S. mutans* miktarları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ( $p>0,05$ ).

R(-) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A. viscosus* miktarı, R(+) çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A. viscosus* miktarından anlamlı derecede yüksektir ( $p<0,05$ )



**Şekil 20:** Çürük sayısı 1-5 olan çocukların *A. viscosus* dağılımı

**Tablo 17:** R(-) gruptaki çocukların dental plak parametrelerinin çürük sayısına göre değerlendirilmesi

|                    | 1-5 çürük (n: 8)<br>Ort±SS | 6-10 çürük (n: 10)<br>Ort±SS | P      |
|--------------------|----------------------------|------------------------------|--------|
| <i>S. mutans</i>   | 51,58±133,7<br>(1,08)      | 3831,5±11091,5<br>(5,49)     | 0,034* |
| <i>A. viscosus</i> | 7400,62±9271,3<br>(2820)   | 11651,6±12271,9<br>(5703)    | 0,286  |

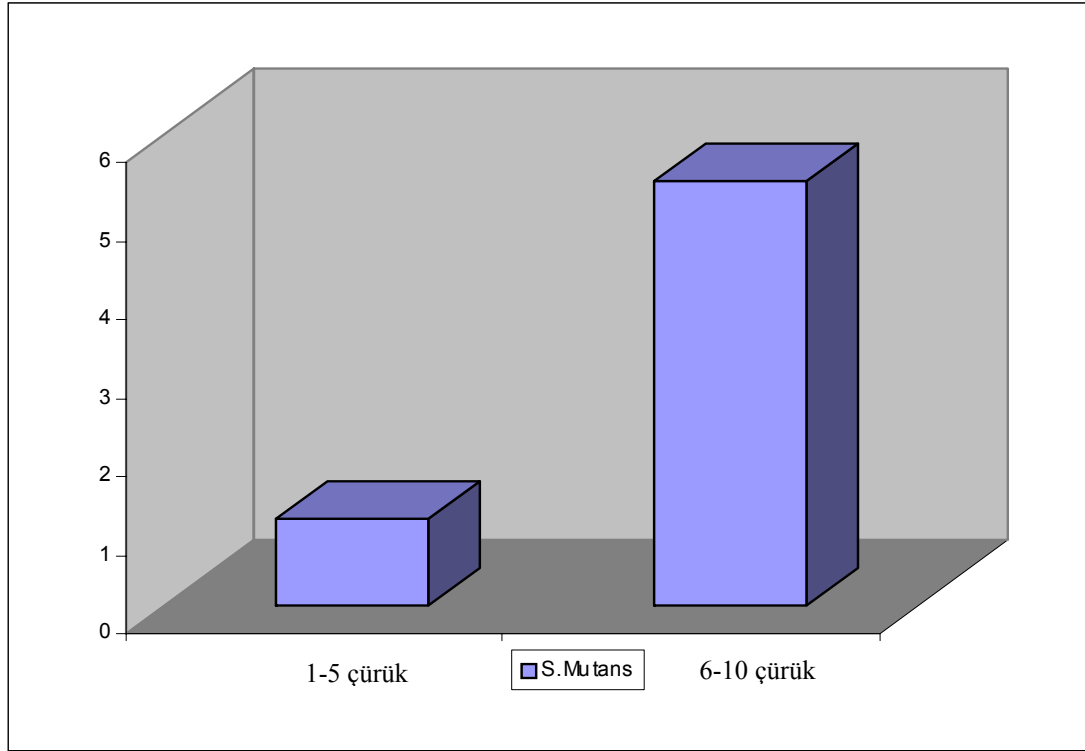
Mann Whitney U test kullanıldı

$p < 0,05$



R(-) grupta çürük sayısı 1-5 olan çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarı, çürük sayısı 6-10 olan çocuklardan anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ).

Çürük durumuna göre çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 21:** R(-) gruptaki çocukların çürük durumuna göre *S.mutans* dağılımı

**Tablo 18:** Dental plakta saptanan bakteri miktarının yaş gruplarına göre değerlendirilmesi

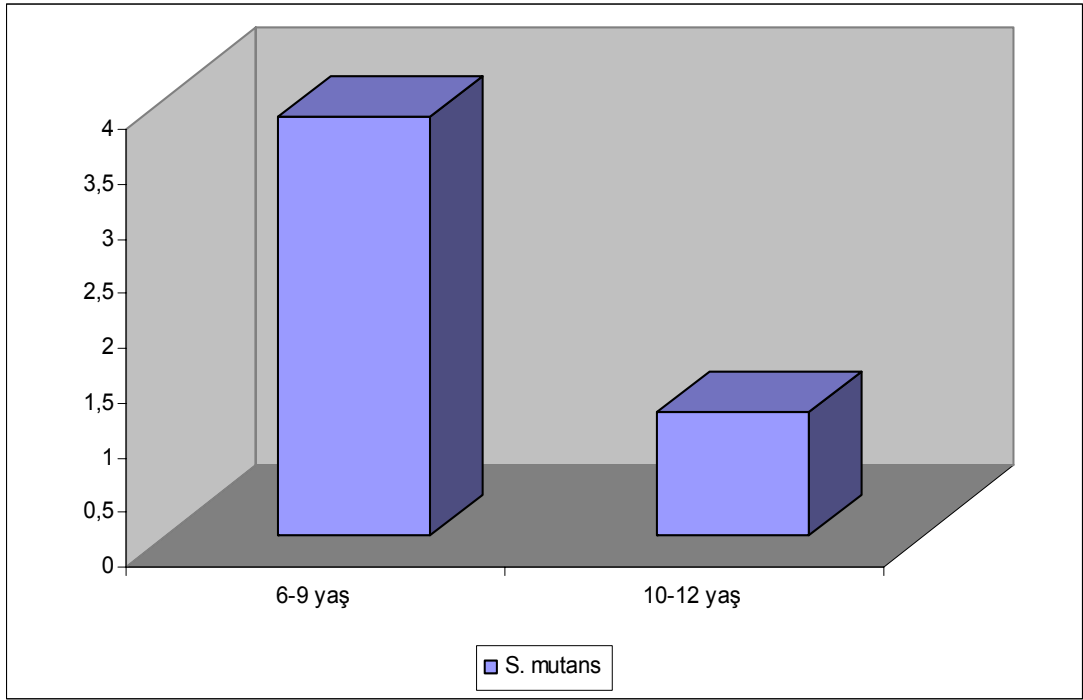
|                    | 6-9 yaş (n=21)         | 10-12 yaş (n=24)       | P             |
|--------------------|------------------------|------------------------|---------------|
|                    | Ort±SS (Medyan)        | Ort±SS (Medyan)        |               |
| <b>S. mutans</b>   | 2683,52±9232,31(3,84)  | 1,76±1,70(1,13)        | <b>0,024*</b> |
| <b>A. viscosus</b> | 4921,76±6719,87 (2780) | 4829,46±9069,57 (1520) | <b>0,211</b>  |

Mann Whitney U testi kullanıldı

\*  $p<0.05$

6-9 yaş grubu çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarı, 10-12 yaş grubundaki çocuklardan anlamlı derecede yüksektir ( $p<0.05$ ).

Yaş gruplarına göre çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 22:** Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarının yaşa göre dağılımı

**Tablo 19:** Çürük indekslerinin yaş gruplarına göre değerlendirilmesi

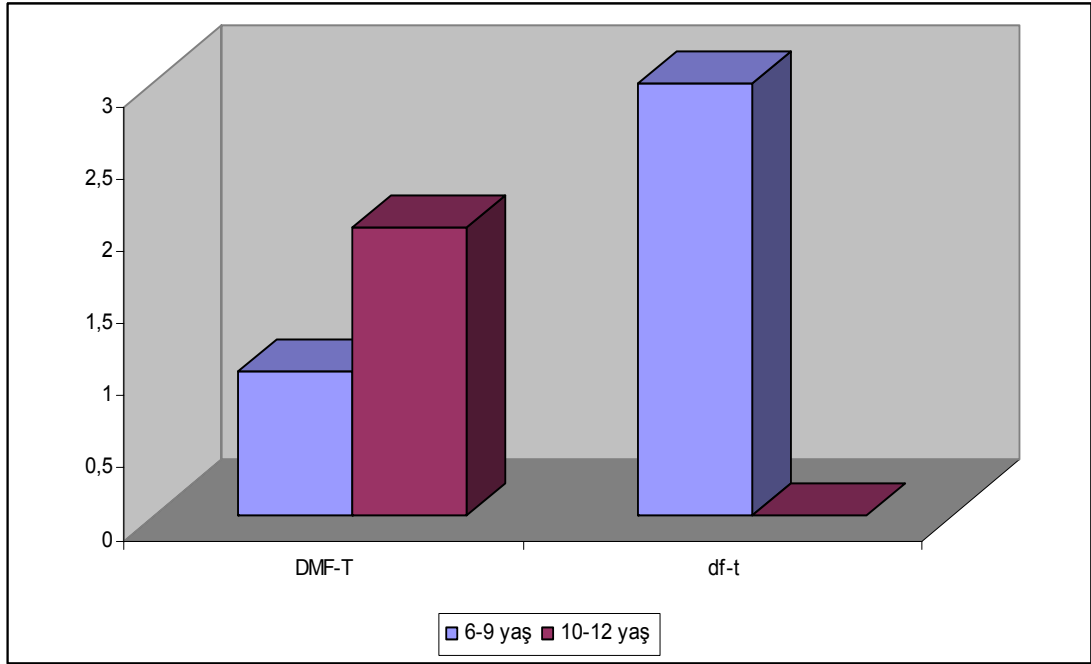
|              | 6-9 yaş (n=21)  | 10-12 yaş (n=24) | P              |
|--------------|-----------------|------------------|----------------|
|              | Ort±SS (Medyan) | Ort±SS (Medyan)  |                |
| <b>DMF-T</b> | 1,14±1,01 (1)   | 2,54±1,28 (2)    | <b>0,001**</b> |
| <b>df-t</b>  | 4,00±3,00 (3)   | 1,04±1,63 (0)    | <b>0,001**</b> |

Mann Whitney U testi kullanıldı

\*\*  $p<0.01$

10-12 yaş grubu çocukların DMF-T sayıları, 6-9 yaş grubu çocuklardan ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).

6-9 yaş grubu çocukların df-t sayıları, 10-12 yaş grubu çocuklardan ileri derecede yüksektir ( $p<0.01$ ).



Şekil 23: Yaş gruplarına göre DMF-T ve df-t dağılımı

Tablo 20: Dental plakta saptanan bakteri miktarının cinsiyete göre değerlendirilmesi

|                    | Erkek (n=19)<br>Ort±SS (Medyan) | Kız (n=26)<br>Ort±SS (Medyan) | P            |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------|
| <i>S. mutans</i>   | 2652,21±9241,45 (1,54)          | 104,59±241,82 (2,83)          | <b>0,412</b> |
| <i>A. viscosus</i> | 6165,95±9488,99<br>(2780)       | 3927,35±6691,47<br>(1845)     | <b>0,251</b> |

Mann Whitney U testi kullanıldı

Cinsiyete göre çocukların dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 21:** Çürük indekslerinin cinsiyete göre değerlendirilmesi

|              | <b>Erkek (n=19)</b>    | <b>Kız (n=26)</b>      | <b><i>p</i></b> |
|--------------|------------------------|------------------------|-----------------|
|              | <b>Ort±SS (Medyan)</b> | <b>Ort±SS (Medyan)</b> |                 |
| <b>DMF-T</b> | 1,79±1,22 (2)          | 1,96±1,45 (2)          | <b>0,750</b>    |
| <b>df-t</b>  | 2,79±3,12 (1)          | 2,16±2,52 (1)          | <b>0,486</b>    |

*Mann Whitney U testi kullanıldı*

Cinsiyete göre çocukların DMF-T sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

Cinsiyete göre çocukların df-t sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

**Tablo22:** R(+) grubunda dental plakta saptanan bakteri miktarı ile tükürük parametrelerinin korelasyonu

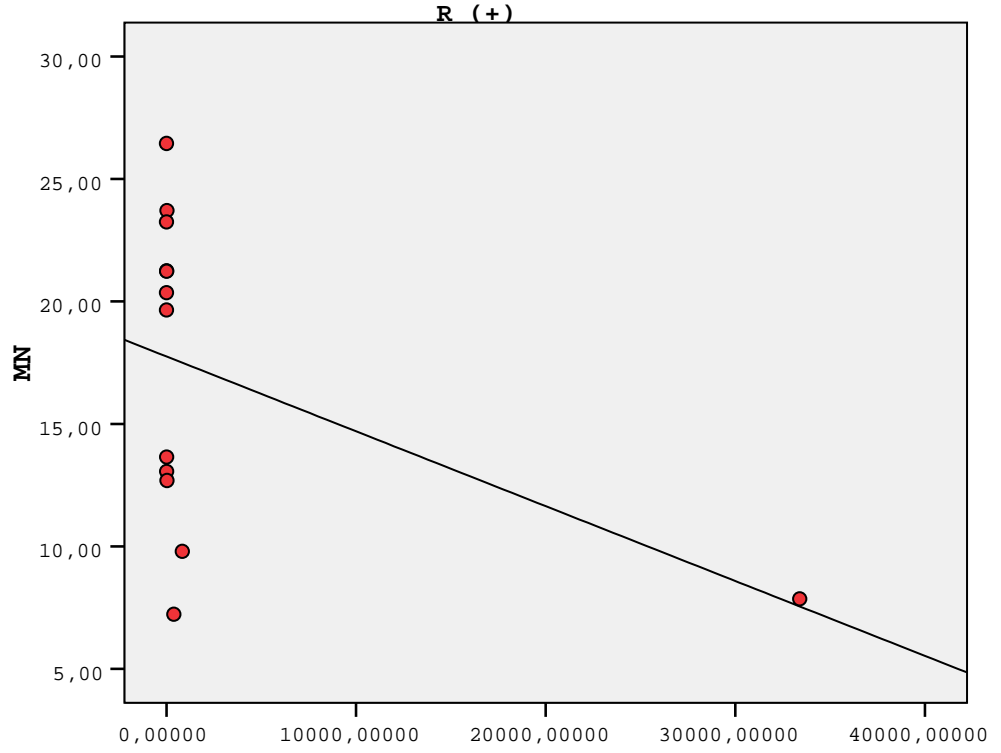
| ng/ml                                | <i>S. mutans</i> |               | <i>A. viscosus</i> |       |
|--------------------------------------|------------------|---------------|--------------------|-------|
|                                      | r                | p             | R                  | p     |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>               | -0,437           | 0,179         | -0,191             | 0,407 |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>               | -0,277           | 0,337         | 0,034              | 0,867 |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>               | 0,123            | 0,675         | 0,148              | 0,462 |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>               | <b>-0,598</b>    | <b>0,049*</b> | -0,039             | 0,867 |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>               | 0,055            | 0,852         | 0,205              | 0,304 |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>               | 0,207            | 0,478         | -0,177             | 0,376 |
| <b>P</b>                             | -0,348           | 0,223         | 0,024              | 0,907 |
| <b>Tükürük akış hızı (ml/dak)</b>    | -0,255           | 0,380         | -0,041             | 0,839 |
| <b>Tükürük tamponlama kapasitesi</b> | 0,199            | 0,496         | -0,277             | 0,161 |
| <b>Tükürük pH</b>                    | 0,430            | 0,125         | 0,272              | 0,169 |

*Spearman's rho test kullanıldı*

**R(+) grubunda;**

Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* ile tükürük Mn değeri arasında negatif yönde, %59.8 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ( $p<0.05$ ).

*S.mutans* ile diğer tükürük parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 24:** R (+) grubunda *S.mutans* ile Mn değeri ilişki grafiği

Dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarı ile tükürük parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 23:** R(-) grubunda dental plakta saptanan bakteri miktarı ile tükürük parametrelerinin korelasyonu

| R (-)<br>ng/ml                       | <i>S. mutans</i> |               | <i>A. viscosus</i> |       |
|--------------------------------------|------------------|---------------|--------------------|-------|
|                                      | r                | p             | r                  | p     |
| <b>Cu<sup>+2</sup></b>               | 0,082            | 0,811         | 0,245              | 0,442 |
| <b>Fe<sup>+2+2</sup></b>             | <b>-0,591</b>    | <b>0,016*</b> | -0,066             | 0,801 |
| <b>Mg<sup>+2</sup></b>               | 0,305            | 0,233         | 0,012              | 0,961 |
| <b>Mn<sup>+2</sup></b>               | <b>-0,648</b>    | <b>0,017*</b> | 0,090              | 0,759 |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>               | 0,191            | 0,478         | 0,265              | 0,305 |
| <b>Ca</b>                            | -0,169           | 0,516         | -0,055             | 0,829 |
| <b>P</b>                             | 0,007            | 0,978         | 0,003              | 0,990 |
| <b>Tükürük akış hızı(ml/dak)</b>     | -0,391           | 0,121         | -0,272             | 0,275 |
| <b>Tükürük tamponlama kapasitesi</b> | 0,080            | 0,760         | 0,282              | 0,257 |
| <b>Tükürük pH</b>                    | -0,097           | 0,712         | 0,295              | 0,235 |

*Spearman's rho test kullanıldı*

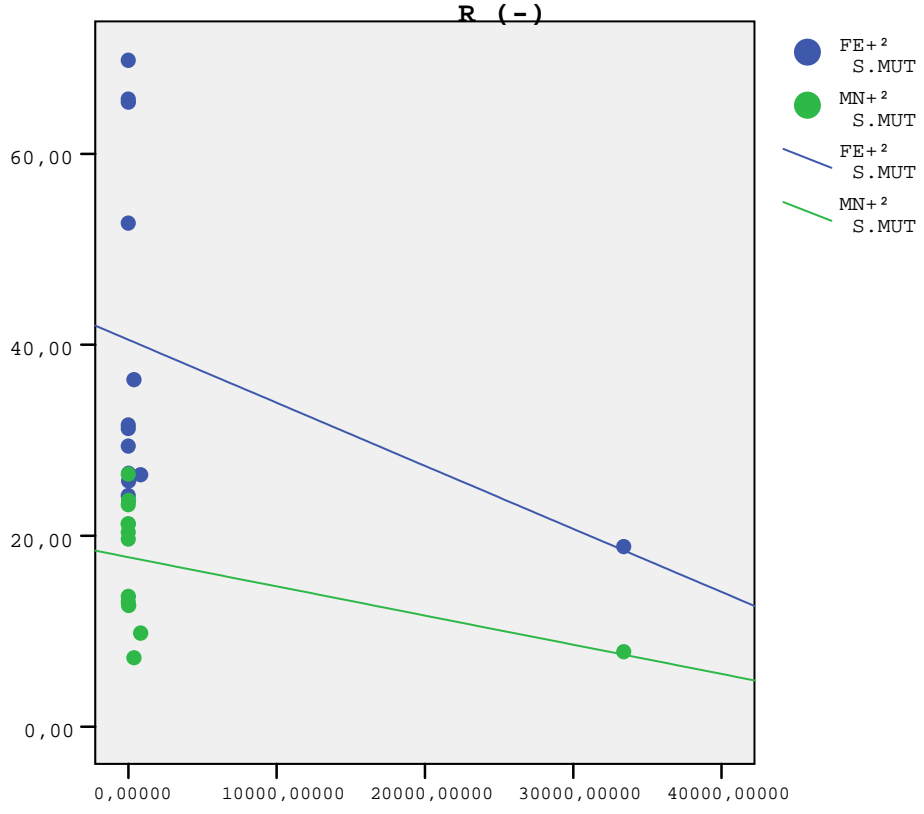
\*  $p < 0.05$

### **R (-) grubunda;**

Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarı ile tükürük Fe düzeyi arasında negatif yönde, %59.1 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ( $p < 0.05$ ).

Dental plak örneklerinde saptanan *S.mutans* miktarı ile tükürük Mn düzeyi arasında negatif yönde, %64.8 düzeyinde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ( $p < 0.05$ ). *S.mutans* miktarı ile diğer tükürük parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).

Dental plak örneklerinde saptanan *A.viscosus* miktarı ile tükürük parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 25: R (-) grubunda plak *S. mutans* miktarı ile Fe ve Mn değerleri ilişki grafiği



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Siyah dışsal renklenme, süt ve sürekli dişlerde görülen diş eti kenarına paralel seyreden noktasal, ince çizgi ya da geniş bant şeklinde görünümle karakterize renklenme tipidir. SDR görülme sıklığı, İtalya, Almanya, Brezilya, Finlandiya gibi pek çok ülkede araştırılmasına rağmen; ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Tezimizin ön çalışmasında SDR görülme sıklığı, incelediğimiz grupta %18 olarak bulundu, bu sonuç literatürde bildirilen değerler arasındadır (Tablo 1) (52).

Estetik açıdan kötü bir görünüme neden olan SDR, hem çocuğu hem de ebeveynini psikolojik olarak olumsuz etkilemektedir. Son yıllarda ailelerin ağız-diş sağlığı konusunda daha bilinçli hareket etmeleri, SDR-estetik ile ilgili kaygıların kliniğe daha yoğun olarak yansımaya neden olmaktadır. Ancak dışsal renklenme içerikli kaynaklar incelendiğinde çalışmaların büyük çoğunluğunu antiseptiklere bağlı (klorheksidin) renklenmelerin oluşturduğu; SDR ile ilgili çalışmaların ise sınırlı sayıda olduğunu gözledik (41,45,46,96,120,121,156).

SDR ile ilgili yapılan çalışmaları 2 başlık altında toplamak mümkündür. Birincisi SDR'si olan çocukların dental plak veya tükürüklerinin biyokimyasal analizi (tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, pH, kalsiyum, fosfor, glikoz, total protein, bakır, demir), ikincisi ise SDR'si olan çocukların tükürük veya dental plak örneklerinin mikrobiyolojik analizidir. Ancak yaptığımız kaynak taramasında, bu 2 başlığın birlikte incelendiği çalışmalara rastlayamadık. Ebeveynlerin SDR ile ilgili artan klinik kaygılarının yanı sıra ülkemizde bu konuyla ilgili yayınlanmış herhangi bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle, 6-12 yaşları arasındaki çocuklarda kromojen bakterilere bağlı SDR'yi biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelemeyi amaçladık.

## 7.1. Gereç ve yöntemin tartışması

SDR'nin mikrobiyolojik olarak incelendiği çalışmalarda (11,96,130,139,151,55, 171) dental plak örnekleri, biyokimyasal incelemelerde ise toplam 3 çalışmanın ikisinde tükürük (161,162), birinde ise dental plak (131) örneği kullanıldığı saptandı. Bu nedenle çalışmamızın biyokimyasal analizlerinde tükürük; mikrobiyolojik analizlerinde ise dental plak örnekleri kullanıldı.

SDR çalışmaları incelediğinde renklenme durumunun var/yok olarak kaydedildiği renklenme derecesinin ise göz ardı edildiği belirlendi (11,53,68,82,124,160). Sadece Koch (83) İtalya'da 2001 yılında yapmış olduğu prevalans çalışmasında kendi oluşturduğu indeksi kullandığı görüldü. Biz de çalışmamızda 'Koch indeksi'ni kullanarak renklenmesi olan çocukları renklenme yoğunluğuna göre karşılaştırmayı amaçladık (Resim1,2,3).

SDR'nin incelendiği in vivo çalışmalarda, çalışma grupları renklenmesi olan ve olmayan çocuklar olarak 2'ye ayrılmıştır (11,68,130,139,155,161,162). Bu nedenle çalışmamız, literatüre uygun olarak renklenmesi olan (R+) ve olmayan R(-) iki grupta düzenlendi.

SDR ile ilgili çalışmalarda çoğunlukla 6-12 yaş grubu çocuklar (68,82,83), bazı çalışmalarda ise 3-5 , 4-16, 6-10 gibi farklı yaş gruplarındaki çocukların da dahil edildiği gözlemlendi. Biz de çalışmamıza 6-12 yaşları arasındaki çocukları dahil ettik (11,68,130,139,155,161,162).

Çocuklardan tükürük örnekleri toplanarak gerçekleştirilen çalışmalarda, tükürük örnekleri sirkadyen ritm etkisini en aza indirmek amacıyla 08:00-12:00 saatleri arasında (18,22,32,37,146) ve tercihen yemekten 1-2 saat sonra alınmıştır (4,78,128,187). Çalışmamızda kullandığımız tükürük örnekleri, tükürük kalsiyum düzeyinin etkilenmemesi amacıyla standart kahvaltıdan (kalsiyumdan yoksun) 2 saat sonra, 09:00-12:00 saatleri arasında toplandı.

Son dönemde sirkadyen ritm dışında antibiyotik kullanımı da tükürük toplama işlemi öncesinde dikkate alınan önemli bir nokta olmuştur. Tükürük toplama öncesi kullanılan antibiyotik süresinin tükürük içeriğine etkisiyle ilgili farklı (2 hafta, 1 ay, 3 ay, 6 ay öncesi) görüşler bildirilmiştir (61,97,99,106,152,129).

Çalışmamızda çoğu ebeveynin, çocuğunun ilaç kullanımını tam olarak hatırlayamaması nedeniyle bu süre Siqueira(152) Malekipour ve ark.nın (106) çalışmalarına benzer şekilde 15 gün olarak standardize edildi.

Çocuklardan tükürük toplama işlemi uyarımlı ve uyarımsız olmak üzere 2 şekilde olmaktadır. Ancak tükürükle birlikte dental plak örneğinin de alınacağı durumlarda uyarımsız tükürüğün tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Özellikle parafin/sakız ile stimülasyon sonucu dental plakta bulunan mikroorganizmaların bir kısmının kaybı söz konusu olacağından, dental plak ile ilgili sonuçların hassasiyetinin azalacağı rapor edilmiştir (136,115).

Navazesh ve ark. da (117) tükürük akış hızındaki bireysel farklılıkların saptanmasında, standardizasyonun daha kolay sağlanması (ölçümler daha az değişken) açısından uyarımsız tükürüğün daha anlamlı sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda çocuklardan uyarımsız karışık tükürük, kliniğimizde geliştirilen suction esaslı yöntem ile toplandı (88).

Tükürük örnekleri toplandıktan hemen sonra pH ve tamponlanma kapasiteleri ölçüldü. Tükürük pH'sı tayininde bazı araştırmacılar daha hassas sonuçlar vermesi nedeniyle pH metreyi (32,113,146,152,187); bazısı pH indikatörlerini (24,79) bazısı da aynı çalışmada her ikisini birlikte kullanmışlardır (114,161).

Çalışmamızda çocuklarda daha kolay uygulanabilir olması nedeniyle tükürük pH tayini pH indikatörleri ile gerçekleştirildi.

Tükürüğün kimyasal yapısının incelendiği çalışmalarda çürükle ilişkisi nedeniyle araştırılan başlıca elementler kalsiyum ve fosfordur. Sonra sırasıyla sodyum , potasyum, magnezyum ve klor gibi inorganik elementler gelmektedir (4,78,79,114,146,152,162,187).

Sözü edilen bu elementlerin tayininde farklı yöntemler kullanılmıştır. Can ve ark.(22) ile Kargül ve ark.(78) kolorimetrik metodla, Akyüz ve ark.(4) amonyumfosfomolibdat metodu ve kit yardımıyla, Brookes ve ark. (20) kalsiyum iyon selektif elektrodu ile, Kavanagh (79) AAS ile, Nobre ve ark. (118) kolorimetrik yöntem ve AAS ile analiz ederken; Shahrabi ve ark.(146) ve Siqueria ve ark. (152,153) ICP-AES'yi tercih etmiştir.

Çalışmamıza, çürük ile ilişkili olduğu düşünülen bu elementlerin yanısıra sülfidlerinin dişlerde koyu kahve-siyah renklenmeye neden olduğu düşünülen Fe, Cu, Mn, Zn gibi eser elementler de dahil edildi (73,162).

Diş hekimliğinde eser elementlerle ilgili çalışmalarda tükürük, diş ve dental plak örneklerinin kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda, çocuklardan güçlükle toplanabilen dental plak örneklerinin hem mikrobiyolojik hem de biyokimyasal analiz için yeterli olamayacağı düşüncesiyle eser element tayini açısından dental plak yerine tükürük seçildi.

Tükürük eser elementlerinin incelendiği çalışmalarda sıklıkla AAS daha az olarak ICP-AES'nin kullanıldığı gözlemlendi (10,14,21,28,31,39,176,181,192). Çalışmamızda daha hassas bir teknik olması nedeniyle maliyeti oldukça yüksek olmasına rağmen aynı anda birçok elementin, kontaminasyon riski olmaksızın, kısa sürede kantitasyonuna olanak sağlayan ICP-AES kullanımı tercih edildi.

Ağız mikrobiyolojisinin incelendiği araştırmalarda ise tükürük ve dental plağın yanı sıra diş eti oluk sıvısı, kanal içi-dışı eksuda kullanılmaktadır. Tükürük ve dental plağın birlikte kullanılacağı durumlarda öncelikle tükürük (uyarımsız) daha sonra dental plak örneklerinin alınmasının, sonuçların hassasiyeti açısından önem taşıdığı belirtilmiştir. Dental plağın toplanması sırasında ağız içine dolayısıyla tükürüğe plak kalıntısı geçişi söz konusu olabileceğinden; plak örneğini takiben alınan tükürükte yanlış pozitif sonuçlara ya da var olan mikroorganizmaların sayısında artışa neden olduğu ifade edilmektedir (115). Bu nedenle çalışmamızda önce uyarımsız karışık tükürük, daha sonra dental plak örnekleri toplandı.

Gerek çocuk gerekse yetişkinlerde in vivo olarak yapılan bazı mikrobiyolojik çalışmalarda yeterli miktarda dental plak toplayabilmek amacıyla bireylere diş fırçalama işleminin 24-48 saat gibi değişkenlik gösteren aralıklarda bırakıldığı rapor edilmiştir (118,166). Çalışmamızda, düşük miktarda örnekle bile kantitatif sonuç alınabilen yöntem olan RT-PCR kullanıldığından; 24 saat süreyle diş fırçalama işlemine ara verilmesinin yeterli olacağı düşünüldü.

Dental plak örnekleri 2 yöntemle (kazıma, sürüntü) toplanabilmektedir. Literatürde kazıma ve sürüntü örnekleri ile gerçekleştirilen çok sayıda çalışma mevcuttur (5,11,30,60,97,115,130,131,139,155,167,171,173). Kazıma yönteminde steril olmak koşuluyla ekskavator, küret, bistüri ve kürdan kullanılırken; sürüntü örneği adından da anlaşılacağı üzere diş ipi, kağıt kon veya sünger -pamuk içerikli malzemenin ilgili alana sürülerek emdirilmesiyle gerçekleştirilmektedir.

SDR ile ilgili mikrobiyolojik çalışmalarda, plak örneklerinin kazıma yöntemiyle toplandığı gözlemlendi (11,130,139,151,155,171). Bu nedenle çalışmamızın mikrobiyolojik kısmı için gerekli dental plak örnekleri kazınarak toplandı. Çalışma grubumuzun kooperasyonun kolaylıkla bozulabileceği çocuklardan oluşması nedeniyle plak örnekleri, diş etine zarar vermeyen ve kanama durumunun en aza indirildiği steril ekskavatorlar ile alındı.

Mikrobiyolojik çalışmalarda örneğin tipi, alınma şekli kadar hangi bölgeye ait olduğu ve transportu da önemlidir. Diş çürüğüyle ilgili yapılan çoğu çalışmada dental plak örneklerinin çürüğe yatkın azılar bölgesinden ya da kavite alanından toplandığı görülmektedir(1,30,38,64,118,129,145,163,173). Ancak RT-PCR ile çalışmanın maliyetli olması, hem azılar hem de keserler bölgesinden plak örneği almamıza imkan vermediğinden plak örnekleri *S.mutans* sayılarının azalacağı sonucu da göz önünde tutularak SDR'nin yoğun olarak gözlemlendiği alt keser dişlerin dil yüzeyinden toplandı.

Mikrobiyolojik çalışmalarda alınan örneklerin çalışmanın yapılacağı birime transportu da doğru sonuçların elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Kaynak taramasında örneklerin transportunu sağlamak amacıyla farklı solüsyonların kullanıldığı görüldü. Bunlar SF-serum fizyolojik (115,139), PBS-phosphate buffered solution (118,163,168), RTF- riched transport fluid (38,173), VMGA (1,34,129), PPB-potassium phosphate buffered (128) dir. Çalışmamızda Nobre ve ark.(118) Suzuki ve ark.(163), Tang ve ark. (167) tercih ettikleri şekilde dental plak örneklerinin transportu, içerisinde PBS bulunan seramik boncuklu tüpler ile sağlandı.

SDR'nin mikrobiyolojik olarak incelendiği çalışmaların sayısı çok az da olsa ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutması açısından bu konuda yapılacak olan her çalışma ayrı bir önem taşımaktadır. İlk olarak Slots (155) SDR'li çocukların florasını incelemiş ve etken bakterilerin Gr(+) çomaklar(%89) olduğunu;

*Streptococcus* ise sadece 5% oranında bulunduğunu belirtmiştir. Theilade ve ark (171) da, SDR'li süt dişlerini elektron mikroskopuyla incelemiş ve Slots'un sonucunu doğrularcasına bu yapının içerdiği bakteri grubu nedeniyle dental plağa benzediğini rapor etmişlerdir. Süt dişlerinde yapılan çalışmada *Actinomyces spp.*lerin (67% katalaz negatif, 15% katalaz pozitif) SDR oluşumundan sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Reid ve ark.(130) SDR ile ilgili çalışmalarında *Bacteroides melaninogenicus'un* (*P.melaninogenicus*) SDR oluşumunda etkili olduğunu ve renklenmenin ise bakteriler tarafından üretilen hidrojen sülfür ile demir'in birleşmesiyle oluşan ferrik sülfidden kaynaklandığını belirtmiştir. Saba ve ark.(139) 2006 yılında yaptıkları PCR çalışmasında ise, *P. gingivalis* ve *P.melaninogenicus'un* SDR'li örneklerde saptanmadığını bunun yanında SDR'si olan grupta 50% oranında *Actinomyces spp.* bulunduğunu rapor etmişlerdir.

2006 yılına kadar ara verilen mikrobiyolojik çalışmalar, Saba ve ark.nın (139) 2006 da yaptıkları çalışmayla ivmelenmiş görünse de günümüze kadar sadece poster niteliğinde 3 çalışma bulunmaktadır (11,96,151). Bu çalışmalarda da etken mikroorganizma üzerinde yoğunlaşmış ancak bakteri türü ile ilgili net bir sonuç elde edilememiştir. Günümüzde kabul edilen en önemli görüş, SDR'ye bakteriler tarafından üretilen hidrojen sülfür ile demir'in birleşerek oluşturdukları ferrik sülfid'in neden olduğudur (130). Bu bilgileden yola çıkarak hidrojen sülfid üretmesi ve tüm dışsal renklenmelerde etkili olan pelikül ile yakın ilişkisi (primer bakteri kolonileri) nedeniyle toplanan dental plak örneklerinde *A.naeslundii* ve *A.viscosus'u*; diş çürüğü ile ilişki açısından da *S.mutans* incelemeyi uygun gördük.

Bahsedilen bu bakterilerin mikrobiyolojik analizinde, altın standart olma özelliğini sürdüren 'kültür yöntemi' yerine RT-PCR'yi tercih etmemizin nedeni: kültür gibi geleneksel yöntemlerin sıra dışı atmosfer ve besiyeri gereksinimleri olan mikroorganizmaların izolasyonunda başarısızlığa yol açabiliyor olması ve SDR ile ilgili RT-PCR kullanılarak gerçekleştirilen yayınlanmış çalışma olmayışıdır. Yüksek maliyetli olmasına rağmen az miktarda örneklerle bile minimum kontaminasyon riski ve maksimum hassasiyette, kantitatif sonuçlar vermesi RT-PCR'nin popülaritesini hızla arttırmaktadır. Geçmişte yapılmış çalışmaların 'sağlaması olması' amacıyla RT-PCR ile tekrarlanması bu durumun en iyi kanıtıdır. Bu nedenle çalışmamızın mikrobiyolojik kısmında Roche firmasının üretimi olan '*Light cycler 2.0*' isimli RT-PCR cihazı kullanıldı.

PCR bazlı çalışmalarda kullanılan bakteri suşları farklı ülkelerde (Amerika, İngiltere, Fransa, İsveç, Almanya) yer alan merkezlerden temin edilmektedir. Bunlar, **ATCC** (*American Type of Culture Collection*), **NTCC** (*National Collection of Type Cultures, UK*), **CCUG** (*Cultuer Collection of University Goteborg*), **DSMZ** (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), **CIP** (*Collection de l'Institut Pasteur*)dir. Ülkemizdeyse bu hizmeti veren **RSHE** (*Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü*)dir. Çalışmamızda kullandığımız *A.viscosus* ve *A.naeslundii* suşlarının ülkemizde bulunmaması nedeniyle suşlarımız (*A.viscosus*, *A.naeslundii*, *S.mutans*) ATCC'den temin edildi.

Çalışmamızın son aşaması olan RT-PCR analizinde, tüm örnek ve standartlar öngörülen prosedüre uygun olarak hazırlanıp, *S.mutans*'ın RT-PCR ile kantitasyonunun yapıldığı birçok çalışmayla benzer olarak hidroliz probu olan *TaqMan* kullanıldı (64,163,164).

## 7.2. Bulguların tartışması

Dışsal renklenmede, bireylerin pelikül ve tükürük özelliklerinin etkili olduğu düşünülmektedir (44,97,149,150).

Araştırmacılar bireylerin tükürük özelliklerini incelerken, cinsiyet ve yaş faktörünün tükürük -renklenme ilişkisini de değerlendirmişlerdir. Cinsiyet ve renklenme ile ilgili farklı görüşler bildirilmiştir (6,82,83,149)

SDR ile cinsiyet arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur (82,83). Koch 1996 Almanya, 2001 İtalya çalışmasında erkeklerde SDR görülme sıklığının kızlardan daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmiştir.

Sheen ve ark.(150) renklenme görülme sıklığını, kızlarda erkeklere oranla daha yüksek bulmuş ve bunu kızlarda saptanan düşük TAH'nin sonucu olarak yorumlamıştır. Çalışmamızda cinsiyete göre yaptığımız değerlendirmede SDR'nin anlamlı olmamakla birlikte kızlarda daha yüksek , TAH'nin ise düşük olduğunu saptadık. Bu sonuç Sheen ve ark.nın sonuçlarını destekler niteliktedir.

SDR ve çürük durumunun değerlendirildiği çalışmalarda, SDR'si olan çocuklarda çürüğün az bulunması bu konuda yapılmış çalışmaların ortak sonucudur (53,69,83,96,130,131,155,160).

Biz de çalışmamızda literatüre uyumlu olarak R(+) olan çocukların daha az sayıda çürüğe sahip olduğunu ve iki grup arasında df-t indeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu saptadık. Bu sonuçla renklenmenin oluşumunda bireylerin tükürük ve pelikül özelliklerinin etkili olduğu görüşü desteklenmektedir.

### 7.2.1.Tükürük parametrelerinin yaş, cinsiyet, renklenme ve çürük durumuna göre değerlendirilmesi

Çalışmamızda tükürük parametrelerinden pH, akış hızı, tamponlama kapasitesi, Ca, P, Fe, Cu, Mg, Mn, Zn değerlerinin yaş, cinsiyet , çürük ve renklenme durumuna göre dağılımı incelendi (Tablo 9,12,13,14).

Gruplar (R+ ve R-) arasında çürük indeksleri açısından anlamlı farklılık olması nedeniyle çalışma parametrelerini renklenme durumuna göre değerlendirirken grupların çürük durumunu standardize etmenin (çürük sayısına göre 1-5 ve 6-10) daha doğru sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. Ancak çürük sayısı 6-10 olan



çocuklar, R(+) ve R(-) gruplarında normal dağılım göstermediğinden, istatistiksel değerlendirmede çürük sayısı 1-5 olan çocuklar alındı (Tablo 7,10,16). Benzer şekilde tükürük parametrelerinin çürük ile değişkenliğini saptamak amacıyla sadece R(-) gruptaki çocuklar, çürük sayısına göre değerlendirmeye katıldı (Tablo 11,17).

Tükürük parametrelerinin vazgeçilmez üçlüsü olan pH, TAH, TTK ile diş çürüğü arasındaki ilişki ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur (18,24,32,37,114,117,136,157,175,187).

Tükürük akış hızının incelendiği çalışmalarda yaş ve cinsiyete bağlı değişimler sıklıkla incelenmiştir. Bu çalışmalarda bazı araştırmacılar, yaş ile birlikte TAH'nin azaldığını rapor ederken (69,71,136,187), bazı araştırmacılar ise çocukluk dönemi boyunca TAH'nin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle TAH'de 15 yaşın baz alınmasının uygun olacağı savunulmaktadır (37,114,181).

Cinsiyet ile TAH arasındaki ilişki araştırıldığında kızların erkeklere oranla daha düşük TAH'ye sahip oldukları görülmüştür. Bu durum kızların daha küçük boyutta tükürük bezlerine sahip olmaları ile açıklanmaktadır(18,37,69,72,113,127,136,175).

Surdacka (161) TAH'nin renklenme ile ilişkisini incelediği çalışmasında renklenme grubunda, renklenmesi olmayan gruba göre TAH'nin daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda TAH'nin kızlarda daha düşük olduğu ve yaş ile azalma gösterdiği saptandı (Tablo 12). Bu sonuç Heintze (69), Humprey(71), Rottevel(136) ve Wu(187)'nin sonuçları ile uyumludur.

SDR ve TAH ilişkisinde ise R(+) grubundaki çocukların diğer gruba oranla daha düşük akış hızına sahip olduğu ancak istatistiksel anlamlılığın bulunmadığı saptandı (Tablo 10). Bu sonuç, günümüze kadar sadece Surdacka(161) tarafından 1989 yılında yapılan çalışmanın sonucuyla uyumlu değildir. Sonuçlarımızı literatürle tartışabilmemiz için konuyla ilgili daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Tükürük pH'sı incelendiğinde, değişikliklerin yaşa ve cinsiyete bağlı olmadığı; asıl olarak tükürük toplama yöntemi, diyet ve çürük durumunun tükürük pH'sını etkilediği belirtilmiştir (187). Ayrıca TAH ile tükürük pH'sı arasında pozitif korelasyondan söz edilmektedir (113,187).

Tükürük pH'sını incelendiği çalışmalarda yaş ve cinsiyetin etkili olmadığı sonucu bildirilmiştir. Çalışmamızda da tükürük pH'sının yaş, cinsiyet ve renklenme durumuna göre değişiklik göstermediği görüldü (Tablo 10,11,12,13).

Tükürük, tamponlama özelliği ile ağız içi pH değişikliklerini nötralize etmede önemli rol oynamaktadır. Ancak TTK'nın bireyler arası değişkenlik göstermesi, çürük aktivitesinin ölçümünde tek başına güvenilir sonuçlar vermediğini bu nedenle tükürük pH, akış hızı, viskozitesi ile birlikte değerlendirme yapılmasının gerektiği bildirilmiştir (95).

Larsen ve ark.(92) ile Tulunoğlu ve ark.(177) yaptıkları çalışmalarda TAH, TTK, tükürük pH ile çürük oluşumu arasında negatif korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir.

Casthillo ve ark.(24) ise Down sendromlu çocuklardaki çürük görülme sıklığını inceledikleri çalışmalarında TAH, TTK ve pH'nın çürük oluşumu ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamıştır. Araştırmacı bu sonucu multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilen diş çürüklerinde oral hijyenin, beslenmenin de etkili olabileceği şeklinde yorumlamıştır.

Down sendromlu çocuklar ile yapılmış diğer çalışmalarda, sağlıklı çocuklarla yakın TAH, TTK, pH değerlerine sahip olmalarına rağmen çürük insidanslarının farklı olduğu; bu nedenle çürük oluşumunda tükürüğün farklı özelliklerinin de etkili olabileceği savunulmuştur (32,190).

Çalışmamızda TTK ile yaş-cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Kızlarda daha yüksek olan TTK'nın yaş ile artma eğiliminde olduğu görüldü.

Renklenme ile tükürük tamponlama kapasitesi arasındaki ilişki incelendiğinde R(+) gruptaki çocukların ortalama TTK değerinin R(-) gruptaki çocuklardan anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ( $p<0,05$ ) (Tablo 10). Bu sonuç TTK'nın hem renklenme hem de çürük ile yakın ilişkisini göstermektedir. Sonucumuz Reid (131) ve Surdacka'nın (162) çalışmaları ile uyumlu olup, R(+) çocukların sahip olduğu düşük çürük insidansını açıklar niteliktedir.

Yaptığımız literatür taramasında renklenme ile ilgili yapılan çalışmalarda tükürük elementlerinden Na, Cl, K, Ca, P, Cu, Fe, Zn, Mg, Mn'nin incelendiği görüldü. Biz de çalışmamızda Ca,P'yi renklenme ve çürük ilişkisini açıklamada, diğer

elementleri ise renklenmede etkili olabileceği düşüncesiyle inceledik. Ayrıca çalışmamızda bu elementlerin yaş, cinsiyet, çürük ve renklenme durumuna göre değişimlerine baktık (Tablo 10,11,12,13).

Ca ve P mine maturasyonu ve remineralizasyonda, diş taşı ve çürük oluşumunda direkt etkiye sahip olan elementlerdir (4,21,22,78,79,123,146,147,152, 153,177,187).

Tulunoğlu ve ark.(177) tükürük Ca değerinin erkeklerde daha yüksek olup yaş ile artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Siqueira (152,153) ve Borella (14) da benzer şekilde erkeklerde daha yüksek oranda Ca düzeyi saptarken; Akyüz ve ark.(4) çocuklarda yaptıkları çalışmada kızların daha yüksek Ca düzeyine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kargül ve ark.(78) ve Wu(187) ise karışık dişlenme dönemindeki Ca düzeyinin sürekli ve süt dişlenme dönemine göre daha yüksek olduğunu bu nedenle dişlenme döneminin Ca düzeyinde yaş faktörüne kıyasla daha etkili olduğunu savunmuşlardır.

Kalsiyum ile çürük oluşumu arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve günümüzde de bu konuda çalışmalar devam etmektedir (4,21,22,79,123,147,177,187). Bu çalışmalarda tükürük Ca seviyesi arttıkça diş çürüklerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu durum demineralizasyon ile diş yüzeyinden ayrılıp tükürüğe geçen Ca iyonlarının tükürük Ca düzeyini arttırdığı şeklinde yorumlanmaktadır (4,22,123,146).

Ancak Tulunoğlu ve ark.(177) ile Shannon ve ark.nın (147) yaptıkları çalışmalarda tam tersi sonuç bildirmişlerdir. Burgueira ve ark (21) ise dişteki Ca düzeyinin çürük ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında tükürük çalışmalarıyla benzer sonucu elde etmişlerdir.

Tükürük inorganik elementlerinden fosfor, tükürük tamponlama kapasitesi ile ilişkisi nedeniyle önem taşımaktadır. Fosfat (PO<sub>4</sub>) veya inorganik fosfor (P) ile ilgili çalışmalarda da şu sonuçlar elde edilmiştir (4,22,78,113,123,177).

Can ve ark.(22) ile Pandey ve ark. (123) tükürük alkalen fosfataz (ALP) ve P düzeyi ile çürük arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında çürüğe eğilimli bireylerin tükürüklerindeki P ve ALP seviyelerinin çürüksüz bireylere oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum, demineralizasyon sırasında açığa çıkan ALP'nin fosforu serbestleştirilmesi olarak açıklanmıştır.

Akyüz ve ark. da(4) süt dişlenme dönemindeki çocuklarda yaptıkları çalışmada çürüksüz çocukların tükürük P düzeyinin çürükleri olanlara göre yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Fosfor ile çürük aktivitesi arasındaki ilişkiyle ilgili kabul gören ikinci görüş ise: tükürük PO<sub>4</sub> düzeyinin artmasıyla TTK'nın artacağı böylece çürük gelişiminin azalacağıdır (181).

Tulunoğlu ve ark.(177), Shahrabi ve ark. (146) ile Kargül ve ark.nın (78) yapmış oldukları çalışmaların sonuçları bu görüşü destekler niteliktedir.

Siyah dişsal renklenme ile kalsiyum- fosfat ilişkisinin değerlendirildiği Reid ve ark.(131) ile Surdacka (162) tarafından yapılan 2 çalışma vardır. Reid ve ark. (131) R(+)çocuklardan kazıma yöntemiyle topladıkları dental plak örneklerinin , sadece çürükleri bulunan çocukların plak örneklerine oranla daha yüksek düzeyde kalsiyum-fosfat ancak daha düşük oranda protein ve karbonhidrat içerdiğini saptamışlardır. Yüksek oranda Ca içeriğinin, SDR ile dental plak benzerliğini de ortaya koyan önemli bir bulgu olduğu belirtilmiştir.

Surdacka (162) ise R(+)çocukların tükürük örneklerini incelemiştir. Çalışmanın sonunda R(+)çocukların daha yüksek oranda tükürük Ca, P, Na, K, Cl, Cu, total protein, daha düşük oranda glikoza sahip oldukları rapor edilmiştir. Gerek Reid ve ark, gerekse Surdacka yaptıkları çalışma ile R(+) bireylerdeki düşük çürük insidansını bu şekilde açıklamışlardır.

Çalışmamızda Akyüz ve ark.(4) sonucuna benzer şekilde kızlardaki Ca düzeyi erkeklere oranla daha yüksek bulunurken; Ca düzeyinin yaş ile artış gösterdiği saptandı.

R(+) çocukların Ca düzeyi Surdacka (162) 'nın sonuçlarıyla örtüşmekte olup istatistiksel olarak anlamlı olmasa da diğer gruba göre yüksek bulundu. Elde ettiğimiz bu sonuç, tükürük Ca düzeyinin R(+) ile ilişkili olabileceği görüşünü desteklemektedir

Çalışmamızda tükürük fosfor düzeyi Can ark. (22), Pandey ve ark.(123) ile Akyüz ark.(4) ve ark. nın sonuçlarına paralel olarak çürük insidansıyla birlikte artış göstermiştir. R(+) çocukların tükürük fosfor değeri R(-) gruptaki çocuklardan daha düşük bulundu. Surdacka'nın yapmış olduğu çalışma ile uyum gösteren bu sonucun, R(+) çocukların sahip oldukları yüksek TTK ve düşük çürük indeksi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Kaynak taramasında tükürük yapısında bulunan eser elementlerin çürük oluşumu ile ilişkisine ait birçok çalışma bulunmaktadır (14,20,21,39,56,57,78,181,192). Ancak demir dışındaki eser elementler ile siyah dışsal renklenme arasındaki ilişkiyi inceleyen sadece bir çalışma mevcuttur (Surdacka) Bulgularımızın literatür ışığında sağlıklı tartışabilmek için bu konuda daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç vardır.

Tükürük eser elementlerinden bakır, birçok hücre içi enzimin fonksiyonunda yer almaktadır. Watanabe ve ark. (181) tükürük Cu ve Mn düzeyinin yaş, cinsiyet ve çürük durumuna bağlı değişimini incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda Cu düzeyinin ise anlamlı olmamakla birlikte yine erkeklerde yüksek olduğu ve diş çürüğü ile Cu arasında pozitif korelasyon saptandığı rapor edilmiştir. Borella ve ark. (14) da erkeklerdeki Cu düzeyinin daha yüksek olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.

Bakır ile çürük arasındaki ilişki hem tükürük hem de dışta incelenmiş; bazı araştırmacılar tükürükteki, bazıları dışteki eser element seviyesine göre değerlendirme yapmıştır (20,56).

Brookes (20) bakır'ın sahip olduğu kariyostatik etkiyi, bakteri büyümesini inhibe ederek ya da mine yüzeyinde bakır fosfat tabakası oluşturup minenin asit atağı karşısında çözünmesini engelleyerek sağladığını düşünmektedir.

Duggal ve ark.(39) tükürük Cu miktarı ile çürük arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmiştir

Zahir ve ark (192) çürükleri olan ve olmayan çocuklardaki tükürük eser elementlerinin kariyojenik ve kariyostatik etkilerini inceledikleri çalışmada bakırın çürük ile birlikte artış gösterdiğini ancak sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmiştir.

Tükürükte bulunan bakırın renklenme oluşum mekanizmasındaki etkisi tartışmaya açık bir konudur. Klorheksidin ve diğer denature edici ajanlara bağlı olarak ortaya çıkan dışsal renklenmeler ile ilgili yapılmış çalışmada, dişlere uygulanan 'Bakır klorid' (0,2%) solüsyonunun dışsal renklenmeden sorumlu tutulan 'Ferrik sülfid'in oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu elementin sülfid formundaki çözünmeyen bileşiği sülfat formuna dönüştürerek çözünmesini sağladığı böylece renklenmeyi önlediği bildirilmiştir (41).

Surdacka (162) R(+) çocuklarda yaptığı çalışmada renklenmesi olan çocukların, olmayan çocuklara göre anlamlı derecede yüksek tükürük Cu seviyesine sahip olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızın bakır ile ilgili sonuçları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da erkeklerde daha yüksek tükürük Cu değeri saptandı.

Bakırın çürük ile ilişkisi incelendiğinde, Zahir ve ark.(192) nın sonuçlarına benzer şekilde tükürük Cu düzeyinin çürük ile artış gösterdiği saptandı (Tablo 11).

SDR ile ilişkisinde ise R(-) çocukların tükürük Cu değerinin, R(+) çocuklardan düşük saptanması çelişkili bir sonuç gibi görünse de Ellingsen ve ark.nın(42) teorisi ile açıklanabilir. Ancak konu ile ilgili kesin sonuç verebilmek için R(+) çocukların **dişlerindeki** Cu düzeyinin de saptanmasının yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

İnsan sağlığı için oldukça önemli olan magnezyum (Mg) üzerinde yoğun olarak çalışılıp farklı sonuçlar elde edilen bir eser elementtir.

Tükürük Mg miktarının yaş ve cinsiyet ile ilişkisi değerlendirildiğinde erkeklerin daha fazla Mg oranına sahip olduğu ve Mg düzeyinin yaş ile azalma gösterdiği bildirilmiştir(10,14,31).

Diş çürüğü ile ilişkisinde ise tükürük Mg miktarının artmasıyla diş çürüğünde de artış olduğu belirtilmiştir (78).

Çalışmamızda Mg miktarının anlamlı olmamakla beraber kızlarda daha fazla olduğu ve yaş ile azalma gösterdiği gözlemlendi. Bu sonuç Cieslak ve ark.(31), Bales ve ark. (10) ve Borella ve ark.nın (14) sonuçlarıyla uyumlu değildir.

Mg' nin çürük durumuna bağlı değişiminin, Kargül ve ark.nın (78) sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği ve çürük ile orantılı olarak arttığı saptandı (Tablo 11).

SDR ile ilişkisi ise yine sadece Surdacka (162) tarafından incelenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da tükürük Mg miktarı R(+) çocuklarda daha yüksek bulunmuştur (Tablo10). Çalışmamızda Surdacka'nın (162) sonucunun aksine R(+) çocukların tükürük Mg miktarı, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da R(-) gruptaki çocuklardan düşük bulundu. Bu sonuç, magnezyumun renklenme ile ilgili olmadığını ancak çürük ile ilişkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Çinko (Zn), başta protein sentezi olmak üzere birçok enzim ve hormonun yapısında bulunan bir eser elementtir. Zn ayrıca mineralize dokuların oluşumunda da

önemlidir. Ağız-diş sağlığı açısından değerlendirildiğinde Zn eksikliğinin diş çürüklerine, periodontal hastalıklara, tad almada bozukluğa yol açtığı görülmektedir (176).

Gerek tükürük gerekse dişteki Zn miktarının kızlarda daha düşük olduğu belirtilmiştir (14). Bales ve ark.(10) ise Zn düzeyinin yaş ile artış gösterdiğini bildirmiştir.

Diş çürüğü ile Zn miktarının araştırıldığı çalışmalar ise diğer eser element çalışmalarında olduğu gibi elementin tükürük ve diş yapısındaki miktarı göz önünde bulundurularak ilişkilendirilmiştir. Tükürük Zn düzeyi azaldığında çürük sayısında artış olduğu gözlenmiştir (192).

Beslenmenin tükürük ve ağız sağlığı ile ilişkisinin incelendiği çalışmada Zn eksikliğinin tükürük PRP miktarında azalmaya yol açtığı vurgulanmıştır (101).

Çalışmamızda kızların tükürük Zn düzeyi erkeklere oranla düşük bulundu ( $p<0,05$ ) (Tablo 12). Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olup; Borella (14) nın sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Tükürük Zn düzeyinin çürük ile ilişkisini incelediğimizde Zahir ve ark.nın sonucuna benzer şekilde çürük ile Zn arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif korelasyon saptandı.

Renklenmeye göre değerlendirme yaptığımızda ise tükürükteki Zn'nin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da R(+) çocuklarda daha düşük düzeyde olduğu ve bu sonucun Surdacka'nın çalışmasına paralellik göstermediği bulundu. Ancak dışsal renklenmelerde etkili olduğu düşünülen PRP'nin Zn ile ilişkisinin, çalışmamızdaki sonuçla paralellik gösterdiğini bu nedenle de Zn'nin dolaylı olarak SDR'de etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamıza çürük ile ilişkisinden çok renklenmeye neden olabileceği düşüncesiyle dahil ettiğimiz Manganez (Mn) ile yapılmış fazla çalışma bulunmamaktadır.

Watanabe ve ark.(181) tükürükte Mn düzeyini inceledikleri çalışmada erkeklerde kızlara göre daha yüksek Mn değerine sahip olduğu ve tükürük Mn değerinin yaş ile artış gösterdiğini , tükürük Mn düzeyi ile çürük aktivitesi arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Green (57) ise çocuklardaki tükürük Mn

düzeyinin diş çürüğü ile ilişkisini incelediği çalışmada tükürük Mn düzeyinin diş çürüğünden bağımsız olduğunu rapor etmiştir.

Renklenmeyle ilgili olarak gerçekleştirilen arkeolojik çalışmada, insan iskeleti ve dişlerde iyon kütle spektrometresi ve AAS ile eser element analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın sonunda topraktaki Mn'nin dişlerde siyah renklenmeye neden olduğu savunulmuştur (158).

Çalışmamızda diğer tükürük eser element sonuçlarındaki gibi Mn değerinin de erkeklerde daha yüksek olduğunu ve yaş ile azaldığını gözledik. Ayrıca Watanabe ve ark.nın (181) çalışmasıyla uyumlu olarak gerek R(+) gerekse R(-) grubunda *S.mutans* ile tükürük Mn arasında negatif korelasyon saptadık ( $p<0,05$ ).

Çalışmamıza Stermer ve ark.nın(158) çalışmasını dikkate alarak dahil ettiğimiz Mn'nin, R(+) çocuklarda tükürük düzeyi R(-) çocuklardan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu( $p<0,05$ ) (Tablo 9,10). Konuya açıklık getirmesi açısından renklenmesi olan çocukların dental plak örneklerinde de Mn düzeyinin araştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz

Dışsal renklenmelerin oluşum mekanizmasında en etkili olduğu düşünülen demir, bu konuyla ilgilenen araştırmacılar tarafından üzerinde yoğun olarak çalışılan ve ayrı öneme sahip bir eser elementtir

Tükürüğün içerdiği laktoferin nedeniyle Fe ile ayrı bir ilişkisi vardır. Tükürük glikoproteinlerinden olan laktoferin, demiri bağlayarak tükürüğün antibakteriyel özellik kazanmasını sağlayan bir glikoproteindir. Demir bağlama özelliğine sahip olmayan laktoferin (apolaktoferin ) ise, bazı bakteri (özellikle *S.mutans*) hücrelerinin yüzeyine bağlanarak o bakterinin aglutinasyonuna (çökme, kümeleşme) neden olduğu ve çoğalmasını engellediği belirtilmiştir (42).

Çürük oluşumunda etkili bakterilerin, Fe'yi kullanarak çoğaldığı bilinen bir gerçektir. Tükürükte bulunan laktoferin miktarının az yada laktoferin'in Fe'ye doymun olması, ortamdaki Fe iyonlarının artmasına neden olmaktadır. Böylece çürük oluşumunun tetiklendiği düşünülmektedir (90).

Çalışmamızda Lagerlöf ve ark.(90) nın sonucunu destekleyecek şekilde, *S.mutans* ile tükürük Fe arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı ( $r:-0,591$ ) (Tablo 22,23) .



SDR ve Fe ilişkisine geçmeden önce Fe'nin pelikül ve diğer dışsal renklenmelerdeki etkisine değinmenin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Dışsal renklenme, pelikülda bulunan tükürük glikoproteinlerinin denature olması sonucu açığa çıkan sülfür gruplarının, ortamdaki demir (Fe) ile birleşerek oluşturdukları çözülemeyen (insolubl) sülfid tuzlarının dış yüzeyine çökmesi ile meydana gelmektedir (62).

Peliküldaki protein tabakasının tannik asit, klorheksidin veya 70 °C'de ısıtma ile denature olduğu, bu durumun Fe'nin mineye adsorpsiyonunu arttırdığı düşünülmektedir (119).

Dışsal renklenmelerin bireyler arası farklılık göstermesinin tükürük özelliklerine bağlı olduğu tam olarak kesinlik kazanmasa da, Eriksen ve ark.(44) renklenmesi olan ve olmayan bireylerin tükürük protein özelliklerini incelemişler, sonuçta her ikisinin benzer aminoasit yapısına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Lee ve ark.(94) ise renklenmeye eğilimdeki farklılığın değişik fiziko-kimyasal yapıdaki pelikül ile ilişkisi olabileceğini savunmaktadır.

Sheen ve ark.(149,150) çalışmalarında pelikül ve tükürük proteinlerinin dışsal renklenmede etkili olduğunu belirtmişlerdir. Pelikül kalınlığının artması durumunda renklenmenin de artış gösterdiğini , fırçalamanın yeterli yapılmadığı bölgeler ile interproksimal alanlarda renklenme yoğunluğunun fazla olmasının bu sonucu doğruladığını bildirmişlerdir.

Pelikül oluşumu ve kalınlığının araştırıldığı başka bir çalışmada ise tükürük bezlerinin açıldığı bölgelerin pelikül oluşumu ile doğrudan ilişkili olduğu savunulmaktadır. Buna göre en az pelikül kalınlığına sahip bölge üst çene keser dişlerin damak yüzeyi iken; alt çene azı ve keser dişlerin dil yüzeyinde pelikül oluşumunun yoğun olarak gözlemlendiği rapor edilmiştir (62).

Çalışmamızda da, SDR'nin tükürük bezlerinin ağız içinde açıldığı yerlerde daha yoğun oluştuğunu gözledik. Bu sonuç Hannig ve ark.nın (62) çalışması ile uyumludur.

Renklenmesi olan ve olmayan bireylerin peliküldaki demir dağılımları ve tükürük laktoferrin düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda renklenmesi olanlarda (pelikülda) Fe ve tükürük laktoferin düzeyinde anlamlı artış saptanmıştır (119-121).

Conrad ve Holtan (32) porselen kuron protezlerin yapımında kullanılan diş eti retraksiyon iplerinin dişte oluşturduğu internalised renklenmeyi incelemişlerdir.

Araştırmacılar alüminyum klorid, ferrik sülfat ve epinefrin içeren diş eti retraksiyon ipleri kullanılmış ve çalışmanın sonunda ferrik sülfat içerikli retraksiyon ipinin dişte ferrik sülfid oluşumuna bağlı olarak siyah renklenmeye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmamızda R(+) çocukların tükürük Fe düzeylerinin R(-) çocuklara oranla düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ) (Tablo 9,10). İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olan bu bulgumuz, tükürükteki Fe'nin SDR oluşumundan sorumlu tutulan *ferrik sülfid* çökeltisini oluşturmak için kullanıldığının kanıtıdır. Sonucumuz, SDR ile ilgili kabul edilen en önemli görüşü ortaya atan Reid ve ark.nın (130,131) çalışmalarını desteklemektedir. Bu konuyla ilgili kesin yargıya varabilmek için plak Fe düzeyinin de araştırılmasının da yararlı olacağını düşünmekteyiz.

### **7.2.2. Dental plak bulgularının yaş, cinsiyet, renklenme ve çürük durumuna göre değerlendirilmesi**

Primer bakteri kolonizasyonunda yer alan 3 bakteri türünün (*S.mutans*, *A.viscosus*, *A.naeslundii*) mikrobiyolojik inceleme sonuçlarının değerlendirildiği bu bölümde, bakterilerden *A.naeslundii*, çoğu örnekte saptanmaması nedeniyle istatistiksel incelemeye dahil edilmedi.

Araştırmalarda, *S.mutans* enfeksiyonunun doğumdan sonra 19-33 aylar arasında geliştiği, yaş ve diş sayısındaki artış ile birlikte *S.mutans* sayısının arttığı belirtilmiştir (17,25,61).

Hameş-Kocabaş ve ark.(61) yaş ortalaması 33 ay olan 56 çocuktaki *S.mutans* kolonizasyonu ve ailesel dikey geçişi araştırdıkları çalışmada erkek çocukların kızlardan daha fazla *S.mutans*' a sahip olduğu ve yoğunluğun yaş ile orantılı olarak artış gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da dental plak örneklerindeki *S.mutans* sayısının yaş ile arttığını; bu sayının kız çocuklarında daha fazla olduğunu saptadık. DMF-T ve df-t değerlerinin *S.mutans* sayısı ile orantılı dağılım göstermesinin, kızlardaki tükürük Mg seviyesinin fazla, Cu seviyesinin ise az olması ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Dental plak örneklerinde incelenen *A.viscosus* miktarının yaş ve cinsiyete göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği saptandı.

Thenisch ve ark.(172) 2006 yılında yaptıkları derlemede mutans streptokok ile ilgili 981 çalışmayı incelemişler ve çalışmanın sonunda çürüksüz çocukların gerek plak gerekse tükürüklerindeki mutans streptokok varlığının çürük riski açısından önemli olduğunun altını çizmişlerdir.

*S.mutans*'ın RT-PCR ile kantitasyonunun yapıldığı çalışmada, RT-PCR'nin kültür yöntemine göre çok daha kısa sürede daha güvenilir sonuçlar verdiği ortaya konmuştur. Ayrıca çürük aktivitesinden sorumlu olduğu bilinen *S.sobrinus* ve *S.mutans*'ın birbirinden ayırdılmasındaki sürecin RT-PCR ile kolaylaştığı belirtilerek; çocuklardan elde edilen tükürük örneklerinde bu yöntemin tercih edilebileceği vurgulanmıştır (189).

Hata ve ark.(64) yaşları 3-6 arasında değişen 107 çocuğun üst keser dişlerinden topladıkları plak örneklerinde RT-PCR ile *S.mutans*'ın kantitasyonu yaparak çürük insidansı ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Kantitasyon sonuçları, *S.mutans* sayısının toplam bakteri sayısına oranı şeklinde belirtilmiştir. Buna göre sağlıklı dişlerdeki oran 0,011 iken çürük dişlerde 0,039 bulunmuştur. Bu sonuç ile *S.mutans*'ın çürük aktivitesiyle yakın ilişkide olduğu bir kez daha ortaya konmuştur.

Seki ve ark.(145) çalışmalarında okul öncesi çocuklarda çürük ile mutans streptokoklar arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Yaşları 1-5 arasında değişen 129 çocuğun uyarımsız tükürük ve plak örneklerindeki mutans streptokok değerleri belirlenerek çürük insidansları saptanmıştır. Çalışmanın sonunda ara yüzdeki plak mutans streptokok değerinin, çürük insidansını belirlemede tükürük mutans streptokok değerinden daha etkili bulunmuştur. Ayrıca mutans streptokok değeri ile çürük insidansı arasında pozitif korelasyon olduğu vurgulanmıştır.

Boue ve ark.nın (16) rampant (yaygın) çürüklü çocuklarda yaptığı çalışmasında, çürüklü dişlerin siyah renklenme gösteren ve göstermeyen yüzeyleri ile sağlıklı dişlerin yüzeylerinden alınan plak örnekleri incelenmiştir. Çürüklü dişlerin her iki yüzeyinden alınan örneklerdeki *S.mutans* ve *Actinomyces spp.* dağılımı sağlam diş örneklerinden fazla bulunurken, siyah renkli çürük yüzeylerdeki plak örneklerinin daha fazla oranda *Lactobacillus* ve *Actinomyces spp.* içerdiği saptanmıştır.

Kahverengi çürük lezyonlu süt azılarında yapılmış benzer bir çalışmada ise çürüklü ve sağlıklı dişlerden alınan plak örnekleri klasik kültür yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonucunda çürük lezyonlarından alınan örneklerdeki toplam anaerob (özellikle Gr+ anaerob çomak: *Lactobacillus*, *Actinomyces spp*) ve *S.mutans* sayısının sağlıklı diş yüzeyinden elde edilen örneklere oranla daha yüksek miktarda olduğu bildirilerek; Boue ve ark.nın(16) sonucu desteklenmiştir (8).

Her iki çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde dental plak örneklerinde artan *Actinomyces spp* sayısının, çürük lezyonundaki koyu renklenme ile ilişkili olmayıp, bu sonucun çürükten kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Suzuki ve ark. (163) yılında yaptıkları çalışmada 5 bireyin üst birinci büyük azı dişlerinin yanak yüzeyinden topladıkları plak örneklerinde *S.mutans*, *S. sobrinus*, *S.mitis*, *S.gordonii*, *A.naeslundii*, *A.viscosus*'un RT-PCR ile kantitasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlar dental plağın 1.0 mg yaş ağırlığının içerdiği bakteri sayısı olarak kaydedilmiştir. Buna göre bakteri sayıları *S.mutans* için 2.02 ile  $1.08 \times 10^5$ , *A.naeslundii* için 0.0 ile  $5.27 \times 10^5$  olarak saptanırken; *A.viscosus* sadece bir örnek dışında hiçbir plak örneğinde saptanamamıştır.

Aktif çürüklü ve çürüksüz 53 okul öncesi çocuğun ara yüz plak örneklerindeki *Actinomyces spp* dağılımı incelendiği PCR çalışmasında *A.viscosus*'un çürükleri olan çocuklardaki yüzdesi çürüksüz çocuklara oranla daha yüksek iken; *A.naeslundii* her iki grupta eşit yüzdelerde bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda *A. gerencseriae*'nin aktif çürüklü grupta daha fazla oranda saptandığı ve *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* ve *A. naeslundii*'nin süt dişlerindeki supragingival plak oluşumunda önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (167).

Liljemark ve ark.(99) ağız içine yerleştirdikleri mine çiplerinin üzerinde 2-72 saatte oluşan plaktaki primer bakteri kolonilerinin (*S.sanguis*, *A.viscosus*, *A.naeslundii*, *A.odontolyticus*) dağılımlarını incelenmiş ve sonuçlar  $mm^2$ 'deki bakteri sayısı olarak belirtmiştir. Buna göre en yüksek bakteri sayısı *S.sanguis*'te saptanırken; en düşük sayıda dağılım gösteren bakterinin *A.naeslundii* olduğu gözlenmiştir.

Japon bilim adamlarının yaptığı PCR çalışmasında dil yüzeyinde hidrojen sülfür üreten bakteriler belirlenerek, bunların ağız kokusuyla ilişkisi incelenmiştir. 21-56 yaş arası on olgunun dahil edildiği çalışmada, hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üreten bakterilerin *Actinomyces*, *Veillonella* ve *Prevotella* türleri olduğu saptanmıştır. Bu bakterilerin siyah-gri koloniler oluşturduğu ve toplam bakteri sayısının ağız kokusu olan grupta anlamlı düzeyde yüksek olduğu vurgulanmıştır (180).

Siyah renklenmesi olan süt dişlerinin incelediği çalışmada, siyah renklenme yapısında % 89 oranında Gr(+) çomak, % 5 oranında streptokok bulunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle siyah renklenmenin bir tür bakteri plağı olduğu savunulmuştur. Ancak aynı yıl Thealide ve ark.(171) siyah renklenme içeriğiyle ilgili ile hemfikir olmakla birlikte kronik çürük lezyonlarından da yüksek oranda Gr(+) çomak izole edildiğini dolayısıyla siyah rengin böyle açıklanamayacağını vurgulamışlardır.

Slots (155), 1974 yılında yaşları 3-5 arasında değişen 11 çocuk üzerinde yaptığı çalışmada siyah renklenmedeki mikroflorayı incelemiştir. Sonuçta mikrofloranın %67'sini katalaz negatif *Actinomyces spp*, %15'ini katalaz pozitif *Actinomyces spp*, % 8 'ini *Corynebacterium*'un oluşturduğunu belirtmiştir. *Actinomyces spp*'lerin H<sub>2</sub>S ürettiğini renklenmenin de bundan kaynaklandığını açıklamıştır. Bununla beraber *Streptococcus* oranının ise sadece % 5 ile sınırlı kaldığını dolayısıyla siyah renklenmedeki düşük çürük insidansının bu şekilde açıklanabileceğini belirtmiştir.

Saba ve ark.(139) karışık dişlenme dönemindeki çocuklarda yapmış oldukları çalışmada, siyah renklenmeden sorumlu olduğu düşünülen *P.melaninogenica*, *P.gingivalis* ve *Actinomyces* türlerini PCR de incelemişlerdir. Sonuçta gerek renklenmesi olan gerekse olmayan grubun *Porhyromonas* ve *Prevotella* türlerini içermediğini ancak *Actinomyces* türünün renklenmesi olan grupta %50 kontrol grubunda %20 oranında gözlendiğini vurgulamıştır.

Barsch ve ark.(11) R(+) olan ve olmayan 6-10 yaş çocukların plak örneklerini RT-PCR ile incelemiş ve Saba ve ark.nın çalışmasından farklı sonuçlar

bildirmişlerdir. Çalışmada, R(+) olan plak örneklerinde daha fazla sayıda *A.naeslundii* ve *P.gingivalis*, daha az sayıda *S.mutans* ve *Fusobacterium nucleatum* saptamışlardır. Bu nedenle renklenmeden *A.naeslundii* ve *P.gingivalis*'in sorumlu olabileceği ve bu bireylerin düşük çürük insidansına sahip oldukları vurgulanmıştır.

Bir başka çalışmada R(+) olan süt dişlenme dönemindeki 4 çocuktan alınan dental plak örneklerinde R(+)’den sorumlu olduğu düşünülen *Actinomyces spp.*lerin, *S.mutans* üzerindeki antibiyotik aktivitesi araştırılmıştır. 16 farklı *Actinomyces* türünün incelendiği çalışmada *A.viscosus*'un *S.mutans* üzerinde antibiyotik etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (151).

Leyton ve ark.(96) ise kültür yöntemiyle yaptıkları mikrobiyolojik çalışmada,siyah dışsal renklenmesi olan ve olmayan çocukların tükürük *S.mutans* ve *Lactobacillus* sayılarını karşılaştırmıştır. Çalışmanın sonunda R(+) çocukların düşük çürük indeksi değerlerine rağmen daha yüksek tükürük *S.mutans* düzeyi ne sahip oldukları bildirilmiştir. Ancak gerek *S.mutans* gerekse *Lactobacillus* düzeyi arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızda RT-PCR ile incelemesini yaptığımız bakterilerin çürük ile doğru orantılı olarak arttığı ancak SDR oluşumu ile ilişkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Çürük ile ilgili sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunurken, renklenme ile ilgili sonuçlarımız özellikle son dönemde yapılan çalışmalar ile uyum göstermemektedir.

Ayrıca çalışma sonuçlarında belirtilen bakteri sayılarının birbirleriyle örtüşmemesini, farklı çalışma sonuçlarında yer alan bakteri sayılarının, **ml, mg, mm<sup>2</sup>** yada **total bakteri sayısına oranı** olarak belirtilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

### **7.2.3. Tükürük ve dental plak bulgularının renklenme yoğunluğuna göre değerlendirilmesi**

Çalışmamıza katılan çocuklar renklenme yoğunluklarına göre 3 gruba ayrılmış ve renklenmesi olan 27 çocuktan 14'ünün 2. grupta yer aldığı görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte R(+) yoğunluğunun artması ile DMF-T, TAH, tükürük Cu, Fe, Mn değerlerinde azalma; TTK düzeyinde ise artış saptandı.

Dental plak parametrelerinin istatistiksel incelemesinde 1. ve 3. Derece renklenmesi olan çocuklara ait verilerin yeterli olmaması nedeniyle değerlendirmeye katılmadı.

Gerek alışmamızdaki R(+)ocukların renklenme yoğunluğuna göre eşit dağılım göstermemeleri gerekse literatürde tükürük ve dental plak parametrelerinin renklenme yoğunluğu ile ilişkilendirildiği çalışmanın olmaması nedeniyle konuyla ilgili daha çok sayıda çalışmaya gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki tükürük ve dental plak ile ilgili bulguların, tekrar popüler hale gelmiş siyah dışsal renklenme çalışmalarında önemli bir kaynak olacağı ve SDR'nin mikrobiyolojik olarak incelenmesinde daha net sonuçların elde edilmesi açısından, *Actinomyces* türü dışındaki bakterilerin de çalışmalara dahil edilmesinin yararlı olacağı kanısındaız.

## SONUÇLAR

6-12 yaşları arasındaki çocuklarda kromojen bakterilere bağlı siyah dışsal renklenmenin, biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak 2 aşamada incelendiği çalışmamızın sonuçları aşağıdaki gibidir:

### 1.Bölüm sonuçları

- R(+) çocukların çürük indeks değerleri R(-) çocuklardan daha düşük bulundu.
- R(+) çocukların tükürük tamponlama kapasitesi R(-) çocuklardan anlamlı derecede yüksek saptandı.
- Tükürük Ca, P, Cu, Mg, Zn değerleri gruplar arasında farklılık göstermedi.
- R(+) çocukların tükürük Fe ve Mn değerleri R(-) çocuklardan anlamlı derecede düşük bulundu.
- Tükürük eser elementlerinin (Zn dışında) cinsiyete bağlı dağılımında farklılık gözlenmedi.
- Kızların tükürük Zn değeri erkeklerden anlamlı derecede düşük bulundu.
- Tükürük parametrelerinden Fe ve Mn ile *S.mutans* arasında negatif korelasyon saptandı.
- R(+) çocukların çoğunda 2.derece renklenme saptandı.



## 2. Bölüm sonuçları

- R(+) çocukların dental plaklarında saptanan *S.mutans* miktarı, R(-) çocuklardan daha düşük bulundu.
- R(+) çocukların dental plaklarında saptanan *A.viscosus* miktarının, R(-) çocuklardan daha düşük olduğu saptandı.
- Dental plakta saptanan *S.mutans* ve *A.viscosus* miktarının çürük ile artış gösterdiği gözlemlendi.
- Tükürük ve dental plak parametrelerinin hiçbirinde renklenme yoğunluğuna göre anlamlı değişiklik saptanmadı.

Bu çalışmayla SDR ile ilgili kabul edilen 2 görüş desteklenmiştir. Bunlardan birincisi R(+) çocukların çürük insidansının düşük ve SDR oluşumundan ferrik sülfid bileşiğinin sorumlu olduğudur.

Konuyla ilgili çalışmaların sınırlı sayıda olması, çalışmada elde edilen diğer bulguların ilişkilendirilmesini güçleştirmiştir. Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda da SDR etkeni olabilecek bakteri türüyle ilgili ortak bir görüş bulunmamaktadır. Çalışmamızda *Actinomyces spp.*ler ile ilgili anlamlı sonuçların elde edilmemesi nedeniyle H<sub>2</sub>S üreten farklı bakteri türlerinin de SDR ile ilişkisinin bundan sonra yapılacak araştırmalarda incelenmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Bunun yanısıra pelikıldaki tükürük proteinlerinin ve tükürükte incelediğimiz eser elementlerin dental plaktaki dağılımlarının da incelendikten sonra elde edilecek bulguların karşılaştırılması ile daha net sonuçlara varılacağı; bu bağlamda eser elementlerle ilgili sonuçlarımızın gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutacağı kanısındayız.

## 8. KAYNAKLAR

1. Aamdal-Scheie A, Luan WM, Dahlen G, Fejerskov O.(1996). Plaque pH and microflora of dental plaque on sound and carious root surfaces. *J Dent Res*, 75(11): 1901-1908.
2. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ,Paster BJ. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*. 46: 1407-17.
3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43: 5721-32.
4. Akyüz S, Yarat A, Tanboğa İ, Emekli N. (1991). Comparison of salivary calcium, phosphorus and protein concentration with df-t index levels in children 4-6 years of age. *J M U Dent Fac*, 1: 67-74.
5. Al Nowaiser A, Roberts GJ, Trompeter RS, Wilson M, Lucas VS. (2003). Oral health in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*, 18: 39-45.
6. Alkhatib MN, Holt R, Bedi R. (2004). Prevalans of self-assessed tooth discolouration in the United Kingdom. *J Dent*, 32: 561-566.
7. Ang Ö. (1990). Ağız Mikrobiyolojisi. 3. Baskı,Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.332-259.
8. Arif N, Beighton D, Sheehy EC. (2006). Microbiological assessment of occlusal brown-spot lesions in primary molars. *Caries Res*, 40: 398-402.
9. Arif N, Sheehy EC, Do T, Beighton D.(2008). Diversity of Veillonella spp. from sound and carious sites in children. *J Dent Res*, 87(3): 278-282.
10. Bales CW, Freeland-Graves JH, Askey S. (1990). Zinc, magnesium, copper and protein concentrations in human saliva: age and sex related differences. *Am J Clin Nutr*. 51: 462-9.
11. Bartschi B, Eick S, Heinrich-Weltzien R. (2009). Black stain: a PCR microbiological study of cariogenic and periodontopathogenic microflora. *Int J Paediatr Dent* (abstract book), 19(Supp 1): p.69.
12. Bayırlı G, Şirin Ş. (1982). Konservatif Dis Tedavisi. İstanbul: Dünya Tıp Kitabevi Ltd., s.269-337.

13. Bernimoulin JP. (2003). Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*, 30 (Suppl 5), 7-9.
14. Borella P, Fantuzzi G, Aggazzotti G. (1994). Trace elements in saliva and dental caries in young adults. *Sci Total Environ*, 153(3): 219-24.
15. Borgstrom M.K., Edwardsson S., Sullivan A., Svensater G. (2000). Dental plaque mass and acid production activity of the microbiota on teeth. *Eur. J Oral Sci*, 108: 412-417.
16. Boue D, Armau E, Tiraby G. (1987). A bacteriological study of rampant caries in children. *J Dent Res*, 66(1) : 23-28.
17. Brambilla E, Twetman S, Felloni A, Cagetti MG, Canegallo L, Garcia-Godoy F, Strohmenger L. (1999). Salivary *mutans streptococci* and *lactobacilli* in 9 and 13 year old Italian schoolchildren and the relation to oral health. *Clin Oral Investig*, 3: 7-10.
18. Bretz WA, do Valle EV, Jacobson JJ, Marchi F, Mendes S, Nor JE (2001). Unstimulated salivary rates of young children. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*, 91(5): 541-45.
19. Brook AH, Smith RN. (2007). The clinical measurement of tooth colour and stain. *Int Dent J*, 57: 324:330.
20. Brookes SJ, Shore RC, Robinson C (2003). Copper ions inhibit the demineralization of human enamel. *Arch Oral Biol*, 48: 25-30.
21. Burguera Pascu M, Rodriguez Archilla A, Burguera JL, Burguera M, Rondon C, Carrero P. (2007). Flow injection on-line dilution for Zinc determination in human saliva with electrothermal atomic absorption spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 600: 214-220.
22. Can M, Erten Can H, Ayhan H, Ömürlü H. (1997). Çürüğe eğilimli ve çürüğe dirençli bireylerin tükürük alkale fosfataz aktiviteleri ile kalsiyum ve fosfor seviyelerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Klin, Dişhek. Bil. Derg.* 3: 38-40
23. Carlen A, Brat P, Stenudd C, Olsson J, Strömberg J. (1998). Agglutinin and acidic proline rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surface. *J Dent Res*, 77(1): 81-90.
24. Casthillo ARF, Pardi V, Pereira CV. (2007). Caries prevalence, level of *mutans streptococci*, salivary flow rate and buffering capacity in subjects with Down syndrome. *Braz J Oral Sci*, 6 (21): 1331-1336.

25. Caufield PM, Walker TM.(1989). Genetic Diversity Within *Streptococcus mutans* Evident from Chromosomal DNA Restriction fragment Length Polymorphisms. *J Clin Microbiol*; 27: 274-278.
26. Cengiz AT, Mısırlıgil A, Aydın M. (2004). Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, s.148-152.
27. Chalmers NI, Palmer RJ, Cisar JO, Kolenbrander PE. (2008). Characterization of a *Streptococcus spp.-Veillonella spp.* community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol*, 190(24): 8145-8154.
28. Chiccaro JL. (1999). Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. *Br J Sports Med*, 33(3): 204-7.
29. Childs WC, Gibbons RJ. (1990). Selective modulation of bacterial attachment to oral epithelial cells by enzyme activities associated with poor oral hygiene. *J Periodontol Res*, 25: 172-8.
30. Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. (2009). Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*, 19: 141-147.
31. Cieslak M, Jedrzejewska T, Zgirski A. (1990). Determinations of magnesium, iron and copper in the saliva of healthy subjects. *Czas Stomatol*, 43: 202-6.
32. Conrad HJ, Holtan JR. (2009). Internalized discoloration of dentin under porcelain crowns: a clinical report. *J Prosthet Dent*, 101: 153-157.
33. Çoğulu D, Sabah E, Kütükçüler N, Özkınay F. (2006). Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. *Arch Oral Biol*, 51: 23-28.
34. Dahlen GG, Johnson JR, and Gmur R. (1996). *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* serotypes, ribotypes and binding characteristics. *FEMS Microbiol Lett*, 138: 89-95.
35. Davey ME, O'toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4): 847-867.
36. Dayan D, Heifferman A, Gorski M, Begleiter A. (1983). Tooth discoloration- Extrinsic and intrinsic factors. *Quintessence Int*, 2: 195-199.

37. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. (2002). Flow rate, amylase activity and protein sialic acid concentrations of saliva from children aged 18,30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch Oral Biol*, 47: 423-427.
38. Diamanti- Kipiotti A, Gusberti FA, Lang NP. (1987). Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *J Clin Periodontol*, 14: 326-333.
39. Duggal MS, Chawla HS, Curzon ME. (1991). A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. *Arch Oral Biol*, 36(12): 881-4.
40. Edgar WM, O'Mullane DM. (1996). *Saliva and Oral Health*, 2<sup>nd</sup> ed, British Dental Association, UK, p.27-42.
41. Ellingsen JE, Rolla G, Eriksen HM. (1982). Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *J Clin Periodontol*, 9: 317-322
42. Emekli N, Yarat A. (2008). Tükürük- Histolojisi, Fizyolojisi, Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.207-345.
43. Erganiş, O, Öztürk, A. (2003). Oral Mikrobiyoloji& İmmünoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.125-135.
44. Eriksen HM, Kantanen H, Nordbo H, Eggen KH, Sletten K.(1985). Characterization of saliva proteins from 'stainers' and 'non-stainers' adsorbed to hydroxiapatite. *Acta Odontol Scand*, 43: 115-120.
45. Eriksen HM, Nordo H, Kantanen H, Elingsen JE. (1985). Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms. *J Clin Periodontol*, 12: 345-350.
46. Eriksen HM, Solheim H, Nordbo H. (1985). Chemical plaque control and prevention of extrinsic tooth discoloration in vivo. *Acta Odontol Scand*, 41: 87-91.
47. Erlich HA. (1989). *PCR Technology- Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, U.S. p.1-17.
48. Ertugrul F, Eltem R, Eronat C. (2004). A Comparative Study of Plaque *Mutans Streptococci* Levels in Children Receiving Glass ionomer cement and Amalgam Restorations. *J Dent Child*, 70: 10-14.
49. Escartin JL, Arnedo A, Pinto V, Vela MJ. (2000). A study of dental staining among competitive swimmers. *Community Dent Oral Epidemiol*, 28: 10-17.

50. Fifield FW, Kealey D. (2000). Principles and Practice of Analytical Chemistry Blackwell Science Ltd, Oxford, p.299-308.
51. Gadhia K, Shah R, Swaminathan D, Wetton S, Moran J. (2006). Development of a stain shade guide to aid the measurement of extrinsic dental stain. *Int J Dent Hygiene*, 4: 98-103.
52. Garan A, Akyüz S. (2006). Prevalence of black stains and dental caries in schoolchildren in İstanbul, Turkey. 8 th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry Amsterdam, 8-11 June 2006
53. Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM, Miyamoto EY, Chicarelli M, Zanata RL (2003). Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. *Braz Dent J*, 14(3): 157-161.
54. Gibbons RJ, Hay I. (1988). Human salivary acidic proline rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infection and Immunity*, 56(2): 439-445.
55. Gibbons RJ. (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. *J Dent Res*, 68(5): 750-760.
56. Gierat-Kucharzewska B, Karasinski A. (2006). Influence of chosen elements on the dynamics of the cariogenic process. *Biol Trace Elem Res*, 132: 1-8.
57. Green I. (1970). Copper and Manganese in saliva of children. *J Dent Res*, 49: 776-782.
58. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. (2008). Microbiol complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 23: 196-205.
59. Hakkı SS, Hakkı EE. (2005). Diş hekimliğinde moleküler biyoloji tekniklerinin önemi ve 21. Yüzyıla bakış. *HÜ Diş Hek Fak Derg*, 29(4): 68-81.
60. Hall V, Collins MD, Lawson PA, Falsen E, Duerden B. (2005). *Actinomyces dentalis* spp. nov., from human dental abscess. *IJSM*, 55: 427-31.
61. Hameş- Kocabaş EE, Uçar F, Kocataş Ersin N, Uzel A, Alpöz AR. (2008). Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. *Microbiol Res*, 163: 168-172.
62. Hannig M, Joiner A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*, 19: 29-64
63. Hardie JM. (1992). Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *Br Dent J*. 172: 271-278.

64. Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. (2006). Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 127-131.
65. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS. (1999). Dental discoloration: an overview. *J Esthet Dent*, 11: 291-310.
66. Hegde PP, Ashok Kumar BR, Ankola VA. (2005). Dental caries experience and salivary levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in 13-15 years old children of Belgaum City, Karnataka. *J Indian Soc Pedod. Prev Dent*, 23: 23-6.
67. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986-94.
68. Heinrich-Weltzien R, Monse B, Helderman W. (2009). Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol*, 37: 182-187.
69. Heintze U, Birkhed D, Bjorn H. (1983). Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J*, 7:227–38.
70. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. (2003). 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*, 28(1): 47-52.
71. Humphrey SP, Williamson RT. (2001). A review of saliva: normal composition, flow and function. *J Prosthet Dent*, 85: 162-9.
72. Inoue H, Ono K, Masuda V. (2006). Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol*, 51: 1055-1060.
73. Isaac S, Brudevold F. (1957). Discoloration of teeth by metallic ions. *J Dent Res*, 36: 753-58.
74. Joiner A. (2004). Tooth colour: a review of the literature. *J Dent*, 32: 3-12.
75. Joiner A, Hopkinson I. (2008). A review of tooth colour and whiteness. *J Dent*, 36: 2-6.
76. Jousimies-Somer HR, Bryk A, Asikainen S. (1999). Oral colonization of infants with Veillonella species. *Anaerob*, 5: 251-253.
77. Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Finegold SM.( 1999) *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other Anaerobic Gram-

- Negative Rods and Cocci. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C: American Society for Microbiology, 690-711.
78. Kargül B, Yarat A, Tanboğa İ, Emekli N. (1994). Salivary protein and some inorganic element level in healthy children and their relationship to caries. *J M U Dent Fac*, 2: 434-438.
79. Kavanagh DA, Svehla G. (1998). Variation of salivary calcium, phosphate and buffering capacity in adolescents. *Arch Oral Biol*, 43: 1023-1027.
80. Kenkel J. (1992). Analytical chemistry: refresher manual. CRC Press, LLC, Florida. p.289-320.
81. Kocagöz, T.(1997). Polimeraz Zincirleme Tepkimesi. *Med Biyotek Mol Tıp Derg*, 1: 112-118.
82. Koch MJ, Bove M, Niekusch U. (1996). Prävalenz schwarzer Zahnbeläge bei Schulkindern. *Dtsch Zahnärztl Z*, 51: 664-666.
83. Koch MJ, Bove M, Schroff J, Perlea P, Garcia-Godoy F, Staehle H.(2001). Black stain and dental caries in schoolchildren in Polenza, Italy. *J Dent Child*, 68: 353-355.
84. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV.(1993). Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J*, 7: 406-413.
85. Koray F (1981). Diş Çürükleri. Altın matbaacılık, İstanbul, s.12-57.
86. Koray F, Güven Y, Külekçi G, Çintan S.(2002). Ağız Biyolojisi ve Bireysel Profilaksi Uygulamalı Eğitim Programı. İstanbul Üni. Diş Hekimliği Fakültesi.
87. Könönen E, Kanervo A, Takala A, Asikainen S, Jousimies-Somer H. (1999). Establishment of oral anaerobes during the first year of life. *J Dent Res*, 78: 1634-1639
88. Kuşçu ÖÖ (2006). Çocuklarda farklı iki dental enjektör ile yapılan lıkal anestezi ve tedavi uygulamalarında psikometrik, fizyolojik ve gözleme dayalı yöntemlerle kaygı ve ağrının incelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. S.Akyüz).
89. Külekçi G.(1998). Diş çürüğü aktive testleri neden, ne zaman, nasıl? Tübitak Ağız biyolojisi uygulamalı eğitim programı.



90. Lagerlöf L, Oliveby A. (1994). Caries-protective factors in saliva. *Adv in Dent Res*, 8: 229-38.
91. Larmas M. (1992). Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int Dent J*, 42 : 199-208.
92. Larsen MJ, Jensen DM, Pearce EL. (1999). Individual variations of pH, buffer capacity and concentration of calcium and phosphate in unstimulated whole saliva. *Arch Oral Biol*, 44(2): 111-117.
93. Le Bell Y, Söderling E, Karjalainen S. (1991). Effect of repeated sampling and prestimulation on saliva buffer capacity and flow rate values in children. *Scand J Dent Res* , 99: 505-9.
94. Lee Y.K, Powers J.M.(2006). Influence of salivary organic substances on the discoloration of esthetic dental materials-A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 76(2):397-402.
95. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. (2000). Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*, 14: 40-47.
96. Leyton B, Cereceda M, Ormen A, Bittner M.(2009). Black stain: microbiological quantification and salivary buffer capacity *Int J Paediatr Dent* (abstract book), 19(Supp 1): p.7.
97. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW. (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J App Microbiol*, 97: 1311-1318.
98. Li Y, CaufieldPW, Emanuelsson EIR, Thornqvist E.(2001). Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Via Genotypic and Phenotypic Profiles from Three Different Populations. *Oral Microbiol Immunol* 16: 16–23.
99. Liljemark WF, Bloomquist CG, Bandt CL, Hinrichs JE, Wolff LF. (1993). Comparison of the distribution of *Actinomyces* in dental plaque on inserted enamel and natural tooth surfaces in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol*, 8: 5-15.
100. Lindquist, B., Emilson, C. G. (1990) Distrubution and Prevalance of *Mutans Streptococci* in the Human Dentition. *J Dent Res*; 69: 1160–1165.
101. Lingström P, Moynihan P. (2003). Nutrition, saliva and oral health. *Nutr*, 19: 567-569.
102. Lingström P, Eliasson L, Almstahl A, Wikström M, Carlen A. (2005). Minor gland saliva flow rate and proteins in subjects with hyposalivation

- due to Sjögren's syndrome and radiation therapy. *Arch Oral Biol*, 50: 293-299.
103. Listgarten MA. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontology* 2000, 5: 52-65.
104. Loesche WJ (1986). Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay, *Microbiol Rev*, 50 (4): 353-380.
105. Maenhaut W. (1990). Recent advances in nuclear and atomic spectrometric techniques for trace element analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 49: 518-532.
106. Malekipour MR, Messripour M, Shirani F. (2008). Buffering capacity of saliva in patients with active dental caries . *Asian J Biochem*, 3(5): 280-284.
107. Manning TJ, Grow WR. (1997). *The Chemical Educator*. Springer, Verlagen, New York.
108. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC. (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res*, 35: 397-406.
109. Marsh PD.(1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 8(2): 263-271.
110. Marsh PD.(1995). Dental plaque as a biofilm. *J Industrial Microbiol*, 15: 169-175.
111. Marsh PD, Martin MV. (1999). *Oral Microbiology*. 4th ed. Edinburgh: Elsevier Science Ltd, p.20-24.
112. Marsh PD (2006).Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6 (Suppl 1): S1-S14.
113. Menteş A, Kargül B, Tanboğa İ.(1995). Tükrük akış hızı, pH ve tamponlama kapasitesi ile çürük indeksi arasındaki ilişkinin bir grup erişkinde incelenmesi. *AÜ Diş Hek Fak Derg*, 22: 27-33.
114. Moreira AR, Passos IA, Sampaio FC, Soares MSM, Oliveira RJ. (2009). Flow rate, pH and calcium concentration of saliva and children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*, 42 (8): 707-711.

115. Motisuki C, Lima LM, Santos-Pinto L. (2005). Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity. *Arch Oral Biol*, 50: 341-345.
116. Nathoo SA. (1997). The chemistry and mechanism of extrinsic and intrinsic discoloration. *J Am Dent Assoc*, 128: 6S-10S.
117. Navazesh M, Christensen CM. (1982). A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res*, 61 (10): 1158-1162.
118. Nobre Dos Santos M, Melo Dos Santos L, Francisco S.B, Cury JA. (2002). Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*, 36: 347-352.
119. Nordbo H, Attramadal A, Eriksen HM. (1983). Adsorption of iron to saliva coated hydroxiapatite. *Eur J Oral Sci*, 91 (3): 182-185.
120. Nordbo H, Kolsto AB, Eriksen HM.(1987). Salivary lactoferrin in a selected group of subjects with exceptional extrinsic dental staining. *J Oral Pathol*, 16: 392-394.
121. Nordbo H, SkjorlandK, Eriksen HM (1984). Auger electron spectroscopy of iron in dental pellicle from strainers and non-stainers. *Acta Odontol Scand*, 42: 37-41.
122. Özel Y, Özel E, Attar N, Aksoy G. (2007). Dişhekimliğinde Beyazlatma. *EÜ Dişhek Fak Derg*, 28: 33-40
123. Pandey RK, Arvind T, Candras, Pandey A. (1990). Relation of salivary phosphorus and alkaline phosphatase to incidence of dental caries in children. *J Pedod*, 14: 144-149.
124. Paredes Gallardo V, Paredes Cencillo C. (2005). Black stain: A common problem in pediatrics. *An Pediatr (Barc)*, 62: 258-60.
125. Pearce EI, Dong YM, Yue L, Gao XJ, Purdie GL, Wang JD. (2002). Plaque minerals in the prediction of caries activity. *Community Dent Oral Epidemiol*, 30: 61-69.
126. Peker S.(2007). *Streptococcus mutans*'ın anne-çocuk geçişinin AP-PCR metoduyla saptanması ve diş çürüğü ile ilişkisi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. B.Kargül).

127. Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD.(1994). Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res*, 73:1416–20.
128. Price RR, Viscount HB, Stanley MC, Leung KP. (2007). Targetted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantative real-time PCR. *Biofouling*, 23: 203-213.
129. Redmo Emanuelsson I, Wang X. (1998). Demonstration of identical strains of *mutans streptococci* within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci*, 106: 788-794.
130. Reid JS, Beeley JA, MacDonald DG.(1977). Investigations into Black Extrinsic Tooth Stain. *J Dent Res*, 56(8): 895-899.
131. Reid JS, Beeley JA.(1976). Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain. *Caries Res*, 10: 363-369.
132. Reitznerova E, Amarasiriwardena D, Kopcakova M, Barnes RM. (2000). Determination of some trace elements in human tooth enamel. *Fresenius J Anal Chem*, 367(8): 748-54.
133. Reuters FJM, Van de Hoeven JS, Burgersdijk RCW, Schaeden MJM. (1995). *Lactobacilli, mutans streptococci* and dental caries. A longitudinal study in 2- year old children up to the age of 5 years. *Caries Res*, 29: 272-279.
134. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. (1996). Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in deslivated rats. *Arch Oral Biol*, 41(11): 1003-10.
135. Rosan B, Lamont RJ. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2: 1599-1607.
136. Rotteveel LJC, Jongerius PH, Limbeek J, Hoogen FJA. (2004). Salivation in healthy schoolchildren. *Int J Pediatr Otorhinolaryngology*, 68: 767-774.
137. Ruby JD, Li Y, Luo Y, Caufield PW. (2002). Genetic characterization of the oral *Actinomyces*. *Arch Oral Biol*, 47: 457-463.
138. Rodney JD. (2000). Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res*, 14: 29-39.

139. Saba C, Solidani M, Berlutti F.(2006). Black stains in the mixed dentition: A PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. *J Clin Pediatr Dent*, 30: 219-224.
140. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y.(2000). Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol*, 45(1): 39-44.
141. Santos CF. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci*, 12(1): 1-11.
142. Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Kanervo A, Takala A, Jousimies-Somer H. (2000). Oral colonization with *Actinomyces* species in infants by two years of age. *J Dent Res* 79 (3): 864-867.
143. Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Könönen M, Jousimies-Somer H.(2001). Phenotypic identification of *Actinomyces* and related species isolated from human sources. *J Clin Microbiol*, 39(11): 3955-3961.
144. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol*, 52: 1114-1135.
145. Seki M, Krakama F, Terajima T, Ichikawa Y, Ozaki T, Yoshida S. (2003). Evaluation of *mutans streptococci* in plaque and saliva: correlation with caries development in preschool children. *J Dent*, 31: 283-290.
146. Shahrabi M, Nikfarjam J, Alikhani A, Akhouni N, Ashtiani M, Seraj B. (2008). A comparison of salivary calcium, phosphate and alkaline phosphatase in children with severe, moderate caries and caries free in Tehran's kindergartens. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*, 98. 74-78.
147. Shannon IL, Feller RP. (1979). Parotid saliva flow rate, calcium, phosphorus and magnesium concentrations in relation to dental caries experience in children. *Pediatr Dent*, 1: 16-20.
148. Shaw L, Murray JJ. (1977). A new index for measuring extrinsic stain in clinical trials. *Community Dent Oral Epidemiol*, 5: 116-120.
149. Sheen S, Banfield N, Addy M.(2001). The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining in vitro- a developmental method. *J Dent*, 29: 99-102.

150. Sheen S, Banfield N, Addy M.(2002). The effect of unstimulated and stimulated whole saliva on extrinsic staining in vitro- a developmental method. *J Dent*, 30: 365-369.
151. Shin JH, Kim MJ, Lee SY, Kim HJ, Kim S. (2009). The antibiotic activity of *Actinomyces* isolated from black-stained primary teeth to *S.mutans*. *Int J Paediatr Dent* (abstract book), 19(Supp 1): p.66.
152. Siqueira WL, De Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau. (2004). Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98: 76-9.
153. Siqueira WL, Rodriguez Santos MT, De Oliveira E, Nicolau J.(2007). Comparison of electrolyte concentrations in whole saliva of individuals with and without cerebral palsy. *Quintessence Int*, 38(4): 301-6.
154. Siso Hergüner Ş. (2005). Çürük aktivite testleri. *CÜ Diş Hek Fak Derg*, 8(2): 113-119.
155. Slots J.(1974). The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand. J Dent Res*, 82: 484-490.
156. Solheim H, Eriksen HM, Nordbo H. (1980). Chemical plaque control and extrinsic discoloration of teeth. *Acta Odontol Scand*, 38: 303-309.
157. Stephen KW, Speirs CF. (1976). Methods for collecting individual components of mixed saliva: The relevance to clinical pharmacology. *Br. J Clin Pharmac*, 3: 315-319.
158. Stermer EM, Risnes S, Fischer PM. (1996). Trace element analysis of blackish staining on the crowns of human archaeological teeth. *Eur J Oral Sci*, 104 (3): 253-61.
159. Sulieman M. (2005). An overview of tooth discoloration: Extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent Update*, 32: 463-471.
160. Surdacka A.(1987). Black tartar deposits (black spot- black stain) in light of the most recent literature reports. *Czas Stomatol*. 37(8): 565-568.
161. Surdacka A.(1989). Amount and pH of the saliva in children and adolescents with black tartar. *Czas Stomatol*. 42(6): 381-386.
162. Surdacka A.(1989). Chemical composition of the saliva in children and adolescents with black tartar. *Czas Stomatol*. 42(10): 525-533.

163. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashida Y, Kiyoura Y. (2004). Real-Time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation. *J Clin Microbiol*, 42(8): 3827-3830.
164. Suzuki N, Yoshida A, Nakano A. (2005). Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR. *Clin Med Res*, 3 (3): 176-185.
165. Takashi N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 1284: 103-112.
166. Tanaka M, Margolis HC.(1999). Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol*, 44: 253-258.
167. Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, Lou G. (2003). *Actinomyces* spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries. *Caries Res*, 37(5): 381-390.
168. Tang G.(2004). Molecular and phenotypic characteristics of the genus *Actinomyces* with particular reference to the human oral cavity (Thesis).
169. Tedjosongkoo U., Kozai K. (2002) Initial acquisition and transmission of *mutans streptococci* in children at day nursery. *J Dent Child*, 21: 284-288.
170. Temizkan G. Arda N.(2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s.100-120.
171. Theilade J, Slots J, Fejerskov O.(1973). The ultrastructure of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*, 81: 528-532.
172. Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. (2006). Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res*, 40(5): 366-74.
173. Toi CS, Cleaton- Jones PE, Daya NP. (1999). *Mutans streptococci* and other caries-associated acidogenic bacteria in five year old children in South Africa. *Oral Microbiol Immunol*, 14: 238-243.
174. Topçuoğlu N.(2004). Süt ve Karışık Diş Dizili Çocukların Subgingival Mikroflorasında *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas* ve Pigmentli *Prevotella* Varlığının Araştırılması. İstanbul Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Mikrobiyoloji B. Dalı İstanbul, Tez (Danışman Prof Dr. G. Külekçi)

175. Torres SR, Nucci M, Milanos E. (2006). Variations of salivary flow rates in Brazilian schoolchildren. *Braz Oral Res*, 20(1): 8-12.
176. Tulga F, Erdemli E, Şimşek Ş. (1999). Bir olgu nedeniyle çinko'nun ağız ve diş sağlığı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *T Kim Diş Hek Bil*, 5: 191-198.
177. Tulunoğlu O, Demirtaş S, Tulunoğlu S.(2006). Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age and gender. *Int J Paediatr Dent*, 16(3): 186-91.
178. Ulu Eriş,OÖ.(2007). Süt dişlenme, karışık dişlenme ve sürekli dişlenme dönemindeki çocukların çürük risk faktörlerinin değerlendirilmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. L.Düzdar).
179. Van Loon, JC, Barefoot RR. (1992). Overview of analytical methods for elemental speciation. *Analyst*, 563-570.
180. Washio J, Sato T, Koseki T, Takahashi N. (2005). Hydrogen sulphide producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *JMM*, 54: 889-895.
181. Watanabe K, Tanaka T, Shigemi T, Hayashida Y, Maki K.(1990). Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary schoolchildren in relation to sex, age and dental caries. *J Trace Elem Med Biol*, 23: 93-99.
182. Watts A, Addy M. (2001). Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent Journal*, 190: 309-316.
183. Whiley RA, Beighton D. (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*, 13(4): 195-216.
184. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 50: 513-52.
185. Wittwer, CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS.(2001). Real Time multiplex PCR assays. *Methods*, 25: 430-42.
186. World Health Organization: Oral health surveys: Basic methods ed 3, Geneva, WHO 1987.
187. Wu KP, Ke JY, Chung CY, Chen CL, Hwang T. (2008). Relationship between unstimulated salivary flow rate and saliva composition of healthy children in Taiwan. *Chang Gung Med J*, 31: 281-286. (abs)



188. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Martin L, Tanner A, Macuch P, Socransky SS. (1999). Identification of oral Actinomyces species using DNA probes. *Oral Microbiol Immunol*, 14: 257-265.
189. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N.(2002). Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 217(1): 23-30.
190. Yarat A, Akyüz S, Koç L, Erdem H, Emekli N.(1999). Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffer capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. *J Dent*, 27(2): 115-8.
191. Yeung M.K.(1999). Molecular and genetic analyses of *Actinomyces spp.* *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(2): 120-138.
192. Zahir S, Sarkar S. (2006). Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 24(1): 27-9.

**EK 1:**

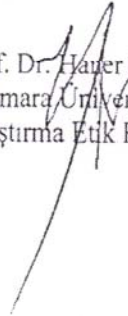
**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ARAŞTIRMA ETİK KURULU**

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-817  
Konu:

02.03.2007

Sayın : Prof. Dr. Serap AKYÜZ

MAR-YÇ-2007-0046 protokol nolu "6-12 yaş grubu çocuklarda kromojen bakterilere bağlı dışsal renklenmelerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Hauer DİRESKENELİ  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Araştırma Etik Kurul Başkanı

## **EK 2: BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU**

### **Araştırma projesinin adı:**

6-12 yaş grubu çocuklarda kromojen bakterilere bağlı siyah dışsal renklenmelerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi.

### **Araştırmanın yürütüleceği kuruluş:**

Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Biyokimya Bilim Dalı

Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji-İmmunoloji Anabilim Dalı

### **Sorumlu Araştırmacılar:**

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Dt. Aysun GARAN

### **Araştırmayı hazırlayan kuruluş:**

**Bu araştırma Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı'nda görevli olan Prof.Dr. Serap AKYÜZ ve Dt. Aysun GARAN tarafından hazırlanmıştır.**

### **Amaç:**

Diş renklenmeleri, diş hekimliğinde sıkça karşılaşılan, gerek diş hekimlerinin gerekse bireylerin bu konuda oldukça fazla zaman ve para harcadıkları klinik ve estetik problemlerden biridir. Diş renklenmesinin nedenleri çok çeşitli ve kompleks olmasıyla beraber temel olarak 2 tip renklenmeden bahsedilir. Bunlar; dışsal renklenmeler ve içsel renklenmelerdir. Ancak son yıllarda literatürlere geçen 'internalized renklenmeler' ile bu temel sınıflama biraz daha genişletilmiştir.

Dışsal renklenmeler, mine yüzeyini tutan metalik veya metalik kaynaklı olmayan (non-metalik) renklenmelerdir. Non-metalik renklenmelerin etiyolojisinde diet içeriği, çay-kahve tüketimi, tütün-sigara kullanımı, ağız gargaraları (klorheksidin) ve kromojen bakteriler rol oynamaktadır. Metalik dışsal renklenmelerde ise; demir, bakır, potasyum permanganat, gümüş nitrat gibi metal bileşikler etkili olmaktadır.

Dışsal renklenmeler her iki dentisyonu etkileyebilmektedir. Çocuklarda görülen dışsal renklenmelerin etiyolojisinde kötü oral hijyen, demir preparatlarının kullanımı ve kromojen bakteriler (*Actinomyces*, *Prevotella melaninogenicus*) ön plandadır.

İstanbul'daki 325 okul çocuğunda yaptığımız ön çalışmada, dışsal renklenme sıklığı % 18 olarak saptanmıştır. Renklenmesi olmayan çocuklarda ortalama df-t, DMF-T değerleri 3,84. ±3,30; 1,64± 1,91 iken renklenmesi olanlarda bu değerler 3,51 ± 2,96; 1,35 ±1,64 olarak bulunmuştur. Renklenme görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde Türk çocuklarındaki dışsal renklenme görülme oranının İtalya ve Brezilya'ya kıyasla daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

Bu sonuçtan hareketle çalışmamızda, renklenmesi olan ve olmayan gruptaki çocuklardan alınacak tükürük ve plak örneklerini mikrobiyolojik ve biyokimyasal olarak inceleyerek, çürük ile renklenme arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçladık.

Bu araştırma, insan üzerindeki araştırmalarda, insan haklarını ve sağlığını korumak amacı ile Dünya Tıp Birliğince ilan edilmiş olan Helsinki Deklerasyonunun son şekline uygun hazırlanmış ve Marmara Üniversitesi Etik Komitesinin onayına sunulmuştur.

### **Bu araştırmaya katılmak için niçin seçildiniz?**

Çocuğunuza yapılan klinik muayene sonucunda çocuğunuzun renklenmesinin olması ya da sadece çürüklerinin olması ya da çocuğunuzun tamamen sağlıklı bir ağız ortamına sahip olması nedeniyle çocuğunuzun bu çalışmaya katılması uygun görülmüştür.

### **Araştırmada kullanılacak yöntem:**

Araştırmada aşağıdaki basamaklar sırasıyla izlenecektir.

- 1) Çocuğunuzun, ağız içi durumunun belirlemek amacıyla klinik muayene yapılacaktır.
- 2) Mevcut çürük, dolgulu ve eksik dişler belirlenecek DMF skorları kaydedilecektir. Koch sınıflaması doğrultusunda renklenme düzeyi belirlenecektir.
- 3) Çalışmamıza son 2 haftada antibiyotik kullanmış olan, dışsal renklenmeye neden olabilecek preparatlar (klorheksidin, demir..) kullanan ve sistemik hastalığı olan çocuklar dahil edilmeyecektir..
- 4) Çalışmaya katılan çocuklardan alınan tükürük ve dental plak örnekleri, biyokimyasal ve mikrobiyolojik inceleme için özel tüplere aktarılarak uygun şartlarda saklanacaktır.
- 5) Biyokimyasal incelemede tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, tükürük pH'sının yanı sıra tükürükteki kalsiyum, fosfor, demir, bakır, çinko, magnezyum, mangan miktarları tayin edilecektir. Mikrobiyolojik incelemede ise RT-PCR ile tür tayini yapılacaktır.

Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

- 6) Çürüğü ve renklenmesi olan çocukların tedavileri klinik akışı içerisinde yapılacaktır.

**Araştırmaya katılmakla meydana gelebilecek yan etkiler ve olumsuzluklar:**

Araştırmada mikrobiyolojik ve biyokimyasal inceleme amacıyla renklenmesi olan veya olmayan gruba dahil çocuğunuzdan tükürük ve dental plak örnekleri alınacaktır. Bu nedenle çocuğunuz ve sizin açınızdan hiçbir yan etki ve olumsuzluk beklenmemektedir.

**Araştırma sürecinde dikkat edilmesi gereken konular:**

Araştırmada kullanılmak üzere çocuklardan alınacak tükürük ve dental plak örneklerinin standart kahvaltı sonrasında alınması planlanmaktadır.

Ayrıca randevulara belirtilen zamanlarda gelmeye özen göstermeniz yapılan işlemlerin çocuğunuza yarar sağlayabilmesi ve çalışmamızın başarısı açısından çok önemlidir.

Ayrıntılı bilgi çocuğunuza ve size Dt. Aysun GARAN tarafından, çocuğunuzun en iyi anlayabileceği tarzda verilecektir.

**Araştırmadan beklenen faydalar:**

Renklenmeden sorumlu olduğu düşünölen bakterilerin tür tayinleri yapılarak sonucun renklenmesi olmayan grupla kıyaslanması ve diş çürüğü ile renklenme arasındaki ilişkinin saptanması.

**Gizlilik**

Araştırmaya katılan bireylerin isimleri gizli tutulacak ve kendi rızası olmadan açıklanmayacaktır.

### EK 3: ONAM FORMU

**Proje adı:**

6-12 yaş grubu çocuklarda kromojen bakterilere bağlı siyah dışsal renklenmelerin biyokimyasal ve mikrobiyolojik olarak incelenmesi.

**Araştırmaya ait hasta / kişi numarası:** \_\_\_\_\_

**Üniversite hastanesi protokol numarası:** \_\_\_\_\_

**Araştırmacı adı:** \_\_\_\_\_

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı Araştırma Projesi Bilgilendirme yazısını okudum ve anladım. Sorularıma Dt Aysun GARAN tarafından beni tatmin eden cevaplar verildi. Adı geçen projeye kendi rızam ile hiçbir baskı altında kalmadan katılmayı kabul ediyorum. İstediğim anda çalışmadan çıkabileceğim ve bunun normal tedavi sürecini etkilemeyeceğini, çalışmadan kendi isteğimle çıkmam halinde tıbbi ve hukuki haklarımın saklı olduğunu biliyorum.

\_\_\_\_\_  
Hasta kişi Tarih İmza

\_\_\_\_\_  
Velayet yada vesayet altında Bulunanlar için veli veya vasi Tarih İmza

\_\_\_\_\_  
Onam ve Açıklama yapan Tarih İmza

\_\_\_\_\_  
Tanık Tarih İmza

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

|            |                      |              |             |
|------------|----------------------|--------------|-------------|
| Adı        | Aysun                | Soyadı       | GARAN       |
| Doğum Yeri | Diyarbakır           | Doğum Tarihi | 04.02.1975  |
| Uyruğu     | T.C                  | TC Kimlik No | 17500894992 |
| E-mail     | garanaysun@yahoo.com | Tel          | 02164991788 |

## Eğitim Düzeyi

|                  | Mezun Olduğu Kurumun Adı                      | Mezuniyet Yılı |
|------------------|---|----------------|
| Doktora/Uzmanlık |   |                |
| Yüksek Lisans    | İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi | 2000           |
| Lisans           |   |                |
| Lise             | Diyarbakır Anadolu Lisesi                     | 1993           |

## İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

|    | Görevi            | Kurum                       | Süre (Yıl - Yıl) |
|----|-------------------|-----------------------------|------------------|
| 1. | Doktora Öğrencisi | M.Ü Diş hekimliği Fakültesi | 2003-            |
| 2. |                   |                             | -                |
| 3. |                   |                             | -                |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
|                 | Çok iyi           | İyi      | İyi    |

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

| Yabancı Dil Sınav Notu # |       |       |           |           |           |     |     |     |
|--------------------------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| KPDS                     | ÜDS   | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
|                          | 74,50 |       |           |           |           |     |     |     |

# Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

# KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-

Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English

as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced

English; CPE: Certificate of Proficiency in English

|               | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|---------------|---------|--------------|-------|
| LES Puanı     | 74      | 70           | 64    |
| (Diğer) Puanı |         |              |       |

## Bilgisayar Bilgisi

| Program          | Kullanma becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | İyi               |
|                  |                   |
|                  |                   |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer