



T.C.

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**LİZOZİM, LAKTOFERRİN VE TAŞIYICI OLARAK
POLOKSAMER 407 İÇEREN YENİ
FORMÜLASYONLARIN, ORAL MUKOZA
ÜZERİNDEKİ İRİTASYON ETKİLERİNİN IN VIVO
KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ
ŞİLA SAATCIOĞLU

İstanbul-2020



T.C.

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI

**LİZOZİM, LAKTOFERRİN VE TAŞIYICI OLARAK
POLOKSAMER 407 İÇEREN YENİ
FORMÜLASYONLARIN, ORAL MUKOZA
ÜZERİNDEKİ İRİTASYON ETKİLERİNİN IN VIVO
KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

ŞİLA SAATCIOĞLU

DANIŞMAN

PROF. DR. SENEM SELVİ KUVVETLİ

İstanbul-2020

TEZ ONAYI FORMU

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü





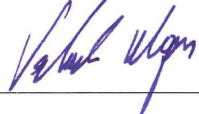
Program : Çocuk Diş Hekimliği

Tez Başlığı : Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonların, Oral Mukoza Üzerindeki Tahriş Etkilerinin *in vivo* Koşullarda Değerlendirilmesi.

Tez Sahibi : Şila Saatcıoğlu

Sınav Tarihi : 20.02.2020

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Senem SELVİ KUVVETLİ Yeditepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Didem ÖZDEMİR ÖZENEN Yeditepe Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Hande SİPAHI Yeditepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Gamze AREN İstanbul Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Necat Vakur OLGAC İstanbul Üniversitesi	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.03.2020 tarih ve 2020/03-031 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Tarih

İmza

Şila Saatçioğlu

TEŞEKKÜR

Lisans ve doktora eğitimim boyunca, bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan, sonsuz desteği ve sevgisi ile üzerimde büyük emeği olan, her yönü ile örnek aldığım, çok değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Senem SELVİ KUVVETLİ**'ye,

Hem mesleki hem de hayattaki duruşunu kendime örnek aldığım, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum Sayın **Prof. Dr. Nüket SANDALLI**'ya,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocamlarım **Prof. Dr. Didem ÖZDEMİR ÖZENEN** ve **Doç. Dr. Elif SUNGURTEKİN EKÇİ** ve **Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine**,

Tezimdeki formülasyonların hazırlanmasında yardımlarından ve katkılarından dolayı Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ve Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Yrd. Doç. Dr. Gülelgül DUMAN**'a,

Tezimin deney aşamasında görüş, öneri ve yardımlarını esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Rektör Yardımcısı Sayın **Prof. Dr. Ahmet AYDIN** ve Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Hande SİPAHİ**' ye,

YÜDETAM gibi bir olanağı bizlere sunduğu için YÜDETAM Başkan'ı ve Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın **Prof. Dr. Bayram YILMAZ**'a; deney hayvanların temininden, çalışmanın deney aşamasına kadar bana hep destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, Sayın **Vet. Hek. Engin SÜMER**'e ve Sayın **Selim DOĞAN**'a,

Çalışmamın histopatolojik değerlendirme kısmında bana destek olan değerli hocam İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Vakur OLGAÇ**'a,

Tez çalışmamın deney aşamasında bana yardımcı olan **Dt. Gökhan BUBER**'e,

Doktora eğitimim boyunca her adımda beraber olduğumuz, herbirini ailemden biri gibi hissettiğim çok sevdiğim dostlarım **Dr. İrem BİRİNCİ**, **Dr. Avşar ÖZTÜRK**, **Dr. Burcu TURAN**, **Dr. İdil AKMERİÇ**, **Dr. Pınar ÖZEKİCİ**, **Dr. Bengü DOYURAN**, **Dr. Dilara UYSAL**, **Dr. Gözde GÜMÜŞ'e**,

Sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bugünlere en iyi şekilde gelmemi sağlayan, bana benden fazla güvenen annem **Vartuhi KÖSEOĞLU**, canım ablam **İda BARLAS** ve eniştem **Murat BARLAS'a**,

Benim hayalimi gerçeğe çeviren, bu günlere gelebilmemde büyük katkısı olan, bana güvenen ve lisans döneminde eğitim bursumu üstlenen, çok kıymetli **Nazaret BİNATLI'ya**,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tükürüğün Koruyucu Fonksiyonları ve Antimikrobiyal Komponentleri	4
2.1.1. Nemlendirme ve Kayganlaştırma	5
2.1.2. Şeker Klirensi	5
2.1.3. Tükürüğün Tamponlama Etkisi	6
2.1.4. Dişlerin Bütünlüğünün Korunması	7
2.1.5. Tükürük Proteinlerinin Ağız Boşluğundaki Etkileri	9
2.2. Ağız Diş Sağlığı ve Antimikrobiyal Ajanlar	20
2.2.1. Fluorid	21
2.2.2. Klorheksidin	22
2.2.3. Esansiyel Yağ İçerikli Gargaralar	28
2.2.4. Povidon İyodün (PVP-I)	31
2.2.5. Kitosan	32
2.2.6. Lizozim, Laktoferrin, Laktoperoksidaz	32

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	35
2.3.1. Ağız Bölgesinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler	37
2.4. Tıbbi Cihazların Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi	42
2.4.1. İritasyon (Tahriş) Deneyleri.....	46
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	54
3.1. Çalışma Dizaynı	54
3.2. Deney Hayvanları	54
3.3. Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonun Hazırlanması	54
3.3.1. Poloksamer 407 Hidrojelin Hazırlanması.....	56
3.3.2. Lizozim ve Laktoferrin İçeren Formülasyonun Hazırlanması	56
3.4. Kontrol Grupları.....	58
3.5. Oral mukoza iritasyon deneyinin uygulanması.....	60
3.6. Histopatolojik İnceleme	66
4. BULGULAR	70
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇLAR	88
7. KAYNAKÇA	90
8. EK-1: DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	117
9. EK-2: ETİK KURUL ONAY BELGESİ	118
10. ÖZGEÇMİŞ.....	119

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Tükürük bezlerinden salgılanan antimikrobiyal proteinler.....	11
Tablo 2. Tıbbi cihazın kategorizasyonuna göre gerekli biyolojik değerlendirme testlerinin seçimi	45
Tablo 3. Formülasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları ve üretici firmaları	56
Tablo 4. Oral mukoza iritasyon etkisi değerlendirilecek formülasyonlar, içerikleri ve kodları	59
Tablo 5. Oral mukoza iritasyon deneylerinde makroskopik değerlendirme için derecelendirme sistemi	61
Tablo 6. Oral mukoza iritasyon deneylerinde mikroskopik değerlendirme için derecelendirme sistemi	67
Tablo 7. İritasyon indeksi.....	69
Tablo 8. Makroskopik değerlendirme skorları.....	70
Tablo 9. Steril distile su uygulanan grubun histopatolojik değerlendirme skorları	71
Tablo 10. Klorheksidin jel uygulanan grubun histopatolojik değerlendirme skorları ...	73
Tablo 11. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 uygulanan grubun histopatolojik incelemesi	74
Tablo 12. Steril distile su ve klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması	76
Tablo 13. Steril distile su ve lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 hidrojel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması	77
Tablo 14. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 hidrojel ve klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Tükürüğün fonksiyonları ve tükürük fonksiyonlarının tükürük bileşenleri ile ilişkisi.....	4
Şekil 2. Laktoferrinin bakterisidal etki mekanizması	20
Şekil 3. Klorheksidinin molekül formülü	22
Şekil 4. Uzamsal-zamansal kontrollü ilaç salımı: ilacın hedefe ulaşması, etkili kan konsantrasyonuna ulaşması ve bu konsantrasyonun istenilen süre boyunca korunması	37
Şekil 5. Poloksamer 407'nin kimyasal formülasyonu	41
Şekil 6. Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde sistematik yaklaşımın özeti ..	47
Şekil 7. Suriye Hamsteri	55
Şekil 8. Pluronic® F-127 (Sigma®-Aldrich, BASF Corp, USA)	57
Şekil 9. Tavuk yumurtasından elde edilmiş Lizozim (L6876-1g, Sigma®-Aldrich, USA) ve insan sütünden elde edilmiş Laktoferrin (L0520-100 mg, Sigma®-Aldrich, USA)...	57
Şekil 10. Çalışmada kullanılan yellowline TTS 2 vorteks cihazı	58
Şekil 11. Çalışmada kullanılan steril distile su ve klorheksidin jel	59
Şekil 12. Ağız içinin steril serum fizyolojik ile yıkayıp yemek artıklarının uzaklaştırılması	61
Şekil 13. Deney öncesi oral mukozanın makroskopik değerlendirmesi.....	62
Şekil 14. Hayvanların yanak kesesine numune emdirilmiş pamukların yerleştirilmesi.	62
Şekil 15. Hayvanlara tasma uygulaması.....	63
Şekil 16. Uygulama sonrası oral mukozanın makroskopik incelemesi.....	63
Şekil 17. Kullanılacak materyaller ve deney ortamının hazırlanması	64
Şekil 18. Cerrahi olarak çıkarılmış yanak dokuları;	68
Şekil 19. Örneklerin fosfat tamponlu nötral formaldehit içerisine fikse edilmesi.....	69
Şekil 20. Steril distile su uygulanan grubun histolojik görüntüsü	72
Şekil 21. Klorheksidin jel uygulanan grubun histolojik görüntüsü	73
Şekil 22. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 uygulanan grubun histolojik görüntüsü	75

KISALTMALAR

®	: Registered (Tescilli)
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µmol	: Mikromol
3D	: Three dimensional (Üç boyutlu)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
a/a	: Ağırlık/ağırlık
a/h	: Ağırlık/hacim
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADA	: American Dental Association (Amerikan Dişhekimleri Birliği)
ADS	: Ailesel disotonomi sendromu
APF	: Asidule fosfat fluorid
ark.	: Arkadaşları
c – lizozim	: Tavuk tipi lizoim
°C	: Santigrat derece
Ca	: Kalsiyum
CTFA	: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (Kozmetik Üreticileri Derneği)
DLD	: Dondurularak kurutulan lipozomal DOTAP

DMFT	: Çürük, çekilmiş, dolgulu diş sayısı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOTAP	: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
ECVAM	: European Center for Validation of Alternative Methods (Avrupa Alternatif Metotların Validasyonu Merkezi)
EÇÇ	: Erken çocukluk çağı çürükleri
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim bağlı immunosorbent test)
EP-GP	: Ekstraparotit glikoprotein
EPS	: Ekstrasellüler polisakkarid
ESAC	: Ecvam Scientific Advisory Committee (EVCAM'nin bilimsel danışma komitesi)
FDA	: American Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
Fe ⁺³	: Demir iyonu
g	: Gram
g – lizozim	: Kaz tipi lizozim
GRAS	: Generally recognised as safe (Genel olarak güvenilir, zararsız kabul edilen)
h – lizozim	: Bitkisel lizozim
H&E	: Hemotoksilen Eozin
<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. felis</i>	: <i>Helicobacter felis</i>

H ⁺	: Hidrojen iyonu
HET-CAM	: Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane
IgA	: İmmunoglobulin A
ISO	: International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Örgütü)
İPS	: İntrasellüler polisakkarid
İS	: İritasyon skoru
K	: Potasyum
l	: Litre
<i>L. acidophilus</i>	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. casei</i>	: <i>Lactobacillus casei</i>
LB	: Laktobasiller
LL-37	: 37 aminoasit
MİK	: Minimal İnhibitör Konsatrasyonları
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MS	: Mutans Streptokokları
MTT	: Metiltiazol difenil tetrazolyum
MUC5B	: Müsin-5, alt tür B
MUC7	: Müsin 7
NaF	: Sodyum florid
O	: Oksijen
OECD	: Organisation for Economic Cooperation & Development

(Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü)

OH ⁻	: Hidroksit iyonu
P	: Fosfor
PEO	: Poloksietilen oksit
pH	: Power of hydrogen
PO ₄ ⁻³	: Fosfat iyonu
PPO	: Poloksipropilen oksit
PVP-I	: Povidon-iyodin
RHE	: Reconstructed human epidermis (Yeniden yapılandırılmış insan epidermisi)
<i>S. mitis</i>	: <i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	: <i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. salivarius</i>	: <i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sobrinus</i>	: <i>Streptococcus sobrinus</i>
TM	: Trade Mark (Ticari Marka)
TS EN	: Türk Standartları Avrupa Normu
v – lizozim	: Viral lizozim
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
YÜDETAM	: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi

ÖZET

Saatcioğlu Ş. 2020. Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonların, Oral Mukoza Üzerindeki İritasyon Etkilerinin *in vivo* Koşullarda Değerlendirilmesi. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.

Bu çalışmanın amacı, küçük çocuklarda diş çürüklerinin önlenmesinde güvenli bir alternatif ajan olarak kullanılacak, daha önce *in vitro* koşullarda antibakteriyel etkileri ve biyouyumluluğu gösterilmiş olan, lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 polimeri içeren hidrojel formülasyonunun oral mukoza üzerindeki iritasyon etkilerinin %0,2' lik klorheksidin jel ile karşılaştırmalı olarak *in vivo* koşullarda değerlendirilmesidir.

Bu çalışmada deney grubu olarak, 1 mg/ml lizozim ve 0,5 mg/ml laktoferrinin %10 konsantrasyondaki poloksamer 407 ile birleştirilmesiyle hazırlanan formülasyonlar kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak steril apirojen distile su, referans ürün olarak ise %0,2'lik klorheksidin jel kullanılmıştır.

Deney ve kontrol gruplarının oral mukoza üzerindeki akut iritasyon etkileri, Suriye hamsterlarının yanak mukozaları üzerinde önce makroskopik olarak değerlendirilmiş, ardından histopatolojik inceleme ile akut oral mukoza iritasyon skorları belirlenmiştir.

Makroskopik değerlendirme sonucunda, uygulama yapılan her üç grupta da herhangi bir dönemde eritem ya da skar oluşumu izlenmemiştir. Histopatolojik inceleme sonucunda ise lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel uygulamalarının iritasyon düzeyinin steril distile su ile aynı olduğu görülmüştür. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel ile klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkileri karşılaştırıldığında ise klorheksidin jelin yeni geliştirilmiş hidrojele göre en az düzeyde iritan olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, değerlendirilen deney ve kontrol gruplarından hiçbirinde ciddi derecede mukozal iritasyon görülmemiştir. Ancak, lizozim ve laktoferrin içeren hidrojel formülasyonun daha uzun süreli etkilerinin anlaşılabilmesi için, kronik oral mukoza iritasyon testlerinin ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık (hipersensitivite) deneylerinin yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Lizozim, laktoferrin, poloksamer 407, oral mukoza iritasyon testi, hamster*



ABSTRACT

Saatcioğlu Ő. 2020. *In vivo* Evaluation of Oral Mucosal Irritation Effects of New Formulations Containing Lysozyme, Lactoferrin and Poloxamer 407 as Drug Delivery System. Yeditepe University Institute of Health Sciences, Doctorate Thesis, Istanbul.

The aim of this study was to evaluate the irritation effects on the oral mucosa of the hydrogel formulation (including lysozyme, lactoferrin and poloxamer 407 as carrier system), which has previously been shown to have antibacterial effects and biocompatibility *in vitro*, and to compare with 0.2% chlorhexidine gel *in vivo* conditions.

In this study, the formulation which were prepared by combining, 1 mg/ml lysozyme, 0.5 mg/ml lactoferrin and 10% concentration of poloxamer 407 was used as experimental group. Sterile apyrogenic distilled water was used as negative control group and 0.2% chlorhexidine gel was used as reference product.

The acute irritation effects of the experimental and control groups on the oral mucosa were evaluated macroscopically on the cheek mucosa of Syrian hamsters, and then the acute oral mucosa irritation scores were determined by histopathological examination.

As a result of macroscopic evaluation, erythema or scar formation was not observed in any of the three groups. Histopathological examination revealed that the irritation level of lysozyme, lactoferrin and poloxamer 407 containing hydrogel was the same as that of sterile distilled water. When the irritation effects of chlorhexidine gel applications were compared with hydrogel containing lysozyme, lactoferrin and poloxamer 407, chlorhexidine gel was found to be the least irritating to the newly developed hydrogel.

In this study, neither experimental group nor control groups showed severe mucosal irritation. However, it is believed that chronic oral mucosal irritation tests and delayed-type hypersensitivity tests w useful for understanding the longer-term effects of the hydrogel formulation containing lysozyme and lactoferrin.

Keywords: *Lysozyme, lactoferrin, poloxamer 407, oral mucosal irritation test, hamster*



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mikrobiyal dental plak, ağız boşluğunu oluşturan sert ve yumuşak dokular üzerinde birçok mikroorganizma tarafından meydana getirilmiş bir biyofilmdir. Çok sayıda bakteri içermesi nedeniyle karmaşık bir yapıya sahiptir (1). Mikroorganizma toplulukları bu yapı ile savunma mekanizmalarından, kuruluştan, antimikrobiyal ajanlardan korunmakta ve bu ortamda besin maddelerinin yoğunluğu artmaktadır. Supragingival ve subgingival olmak üzere iki tür mikrobiyal dental plak tanımlanmıştır (2). Bu yapıların, morfolojik ve bakteriyolojik olarak birbirlerinden farklı oldukları bildirilmiştir (3). İnsanlarda görülen en yaygın bakteriyel enfeksiyonlar arasında olan diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların oluşup, gelişmesinde karışık ve süregelen mikrobiyal bir sistem olan mikrobiyal dental plak önemli bir rol oynamaktadır (4,5).

Ağız hijyeninin ve buna bağlı olarak ağız sağlığının sürdürülebilmesinde temel yöntem mikrobiyal dental plağın etkin bir şekilde uzaklaştırılmasıdır. Diyetin düzenlenmesi, floridli diş macunu ve diş ipi kullanımı supragingival plağı uzaklaştırmada önerilen yöntemlerdir. Bunlara antibakteriyel gargaralar eklendiğinde ağız hijyeninin önemli derecede iyileştiği gösterilmiştir (6).

Son yıllarda diş hekimliği literatüründe mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasında yaygın olarak tercih edilen florid ve klorheksidin preparatlarına alternatif uygulamalar üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Remineralizasyon ajanları ile ilgili yapılmış son dönem çalışmalarda, kazein fosfopeptit amorföz kalsiyum fosfat, sodyum kalsiyumfosfosilikat (biyoaktif cam), ksilitol, nano hidroksiapatit gibi ajanların yanı sıra, antimikrobiyal etkisi ve biyoyumluluğu kanıtlanmış olan tükürük proteinlerinin ön plana çıkmaya başladığı görülmektedir (7-9).

Tonguc-Altin ve ark. (2015) lizozim ve laktoferrin içeren yeni formülasyonların antimikrobiyal etkilerini karşılaştırmış ve mikrobiyal dental plakta bulunan ve çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ve *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) suşları üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir (10).

Şenöz (2014), 'Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonların Biyoyumluluklarının *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi' başlıklı doktora tezinde; kontrol grubu olan klorheksidin sitotoksik etkisinin deney gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunduğunu bildirmiştir. Hücre canlılık oranı klorheksidin grubunda %25'den az, poloksamer 407 grubunda ise %50–75 arasında bulunmuştur (11).

Literatürde lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı olarak poloksamer 407 içeren formülasyonlar ile ilgili yayınlanmış başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu olumlu sonuçlar doğrultusunda lizozim ve laktoferrin içeren yeni formülasyonların ileri çalışmalar yapıldıktan sonra diş hekimliği pratiğinde antimikrobiyal/antiplak ajan olarak etkin bir şekilde kullanılabilmesi ve ilaç piyasasında yer alabileceği düşünülmüştür.

Antimikrobiyal ajanlar klinikte uygulanmaya başlanmadan önce bu materyallerin ağız dokuları üzerindeki olası yararlı ve/veya zararlı etkilerinin *in vitro* testler ile incelenmesi, ardından hayvan çalışmalarından elde edilecek bulgular göz önünde bulundurularak materyalin toksisite derecesi ve/veya iritasyon (tahriş) etkisi hakkında fikir sahibi olunması, bu çalışmaların sonuçlarına bağlı olarak klinik kullanımlarının önerilmesi ya da gerekli düzenlemelerin yapılması gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyoyumlulukları *in vitro* testlerin ardından, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile değerlendirilmektedir (12).

Tıbbî Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi için oluşturulmuş standartlarda (ISO 10993-1: 2018), materyalin temas yüzeyi ve temas süresine bağlı olarak yapılması gereken deneyler belirtilmiştir (12). Standartlar doğrultusunda mukoz membrana teması 24 saatten az olacak bu formülasyonların akut oral mukoza iritasyon deneylerinin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 polimeri içeren, *in vitro* koşullarda antibakteriyel etkileri ve biyoyumlulukları

gösterilmiş yeni formülasyonların oral mukoza üzerindeki iritasyon etkilerinin %0,2' lik klorheksidin jel ile karşılaştırmalı olarak *in vivo* koşullarda değerlendirilmesidir.

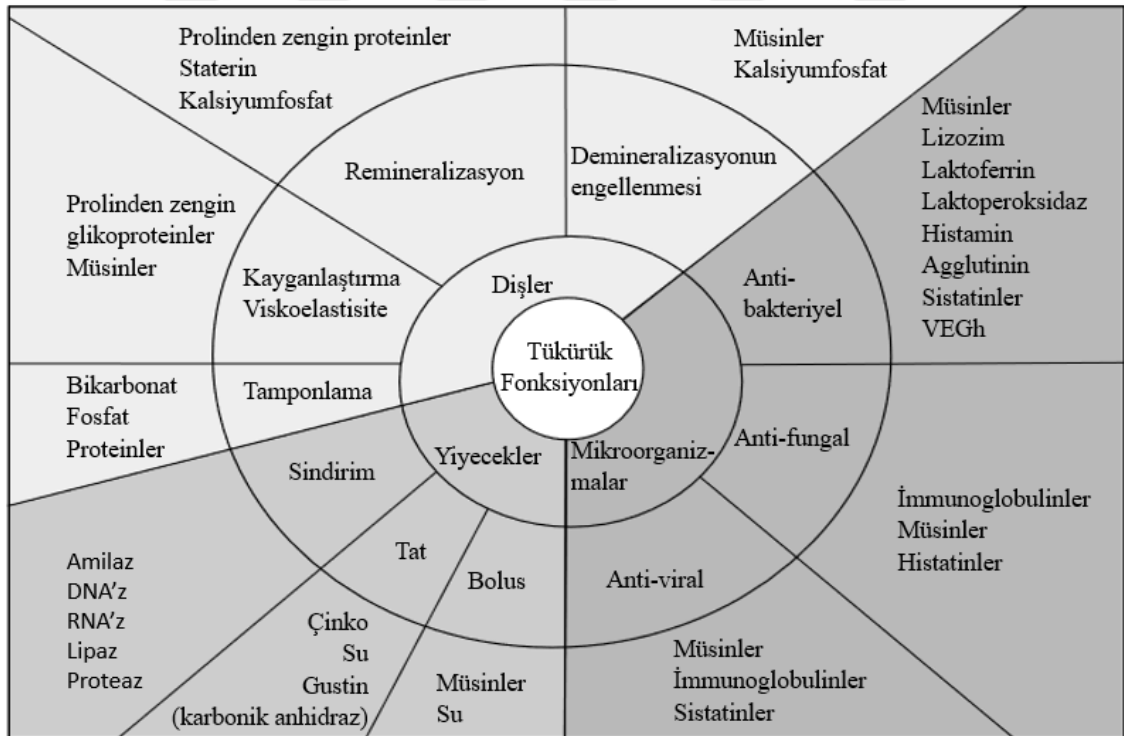


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürüğün Koruyucu Fonksiyonları ve Antimikrobiyal Komponentleri

Tükürüğün insan organizmasında birçok önemli görevi üstlendiği bilinmektedir (Şekil 1) (13,14).

Tükürüğün koruyucu fonksiyonları, ağız sağlığını korumaya ve uygun bir ekolojik denge oluşturmaya yarayan 5 ana kategoride listelenmektedir: (1) nemlendirme ve kayganlaştırma, (2) şeker klirensi, (3) tamponlama etkisi, (4) diş bütünlüğünün korunması, (5) tükürük proteinlerinin antibakteriyel, antiviral, antifungal ve diğer etkileri (15–17).



Şekil 1. Tükürüğün fonksiyonları ve tükürük fonksiyonlarının tükürük bileşenleri ile ilişkisi (13,14)

2.1.1. Nemlendirme ve Kayganlaştırma

Tükürük bezlerinin ana fonksiyonlarından biri, ağız mukozasını nemli tutmak için ağız boşluğuna sürekli bir tükürük akışı sağlamaktır; böylece yutkunma sırasında abrazyona ve mikroorganizmaları, deskuamatif epitel hücrelerini, lökositleri ve yiyecek artıklarını uzaklaştırmaya karşı daha az duyarlı bir hale getirildiği bilinmektedir. Aynı zamanda uyarılmamış tükürüğün sürekli akışı tükürük bezlerinin tükürük kanalları yoluyla retrograd enfeksiyonunu önlemeye yardımcı olmaktadır (18).

Tükürüğün bileşiminin yaklaşık %99'u su olmakla birlikte, su ve tükürük submandibular bezler, dil altı bezleri ve palatal, bukkal ve labiyal mukozada bulunan minör tükürük bezleri tarafından sentezlenen müsinler içermesi nedeniyle sudan oldukça farklı bir yapıdadır. Müsinler, glikozile edilmiş glikoproteinler olarak tanımlanmaktadır. Parotis ve von Ebner bezlerinin salgılarında ise müsin bulunmamaktadır (19).

Tükürük, müsin içermesi sayesinde, seromüköz bir katman oluşturarak tüm ağız boşluğunu kaplamakta ve çiğneme, yutma ve konuşma gibi işlemler sırasında karşılıklı yüzeyler arasında önemli bir kayganlaştırıcı olarak işlev görmektedir. Aynı zamanda ağız içi dokuları mikrobiyal dental plak içerisinde üretilen proteolitik ve hidrolitik enzimler, sigara ve eksojen kimyasallardan kaynaklanan potansiyel karsinogenik maddeler ve ağız kuruluğu gibi iritan etkenlerden korumaktadır (20).

2.1.2. Şeker Klirensi

Tükürüğün en önemli fonksiyonlarından biri, yiyecek, içecek ve yiyecek kalıntılarının ağızdan uzaklaştırılmasını kolaylaştırması olarak kabul edilmektedir. Yutkunma sonrasında ağız içerisinde bir miktar tükürük kalmaktadır (21,22). Yutkunma öncesi ve sonrası ağızdaki tükürük hacimleri sırasıyla 1,1 ve 0,8 ml'dir, dolayısıyla yemekler arasında her bir yutkunma ile ağızdaki tükürüğün sadece küçük bir kısmı yutulmaktadır (23). Ağız sağlığı açısından, ağıza alındıktan sonra en kısa sürede uzaklaştırılması gereken en önemli gıdalar sakkaroz ve glukoz gibi fermente edilebilir karbonhidratlar ile asitli yiyecekler veya içecekler olarak belirtilmektedir. Bilgisayar

modellemesi ve deneylerle, bu gıdaların temizlenmesinin düşük miktarda kalan tükürük hacmi ve yüksek tükürük akış hızı ile kolaylaştırıldığı gösterilmiştir (22).

Tükürüğün ayrıca her biri yaklaşık 100 mikroorganizma taşıyan eskuame epitel hücrelerinin temizlenmesi ve tükürükte serbest kalan mikroorganizmaların uzaklaştırılması için de önemli olduğu kabul edilmektedir (24).

2.1.3. Tükürüğün Tamponlama Etkisi

Normal tükürüğün pH değeri 6,5-7,5 arasında olduğu bilinmektedir. Diş yüzeyindeki sıvının, hidroksiapatite göre doymamış olduğu ve mineden kalsiyum (Ca) ve fosfatların (PO₄) ayrılmasına izin veren değer kritik pH değeri olarak ifade edildiği bilinmektedir ($\leq 5,5$). pH değeri kritik pH'nın altına indiğinde diş minesinden çözünme başlamaktadır ve bu da diş çürüğünü başlatan önemli bir süreç olarak kabul edilmektedir. Tükürüğün diş çürüklerini önlemede en önemli fonksiyonlarından birinin de ağız içerisinde oluşan organik asitleri nötralize edip tamponlaması olduğu bilinmektedir (25). Ortamdaki hidrojen (H⁺) ve hidroksit (OH⁻) iyonlarına bağlı olarak değişebilen pH değerlerine direnme gücü 'tamponlama kapasitesi' olarak tanımlanmaktadır (26). Tükürüğün ağızdaki tamponlama etkisi 3 farklı sistem ile sağlanmaktadır: karbonik asit – bikarbonat tamponlama sistemi, fosfat tamponlama sistemi, protein tamponlama sistemi (27).

Karbonik asit – bikarbonat tamponlama sistemi en önemli tampon sistemidir ve uyarılmış tükürükte aktiftir. Mikrobiyal dental plak içerisine diffüz olup ve asitleri nötralize ederek tampon görevi görmekte ve bu sayede çürük oluşumunu engellemektedir. Ayrıca, asitleri nötralize ederek bir tampon görevi gören aminleri meydana getirmek için, amonyak oluşumunda rol oynamaktadır (28). Tükürüğün bikarbonatla ilişkili olmayan tamponlama kabiliyetinin %90'ından fazlası düşük moleküler ağırlıklı, histidin bakımından zengin peptidlere dayanmaktadır (29). pH değeri 4-4,5'in altına düştüğünde tükürük proteinleri de tamponlama sistemine katkıda bulunmaya başlamaktadır (30).

Tükürükteki bir diğer tamponlayıcı bileşen olan üre mikrobiyal dental plak tarafından metabolize edilmekte ve bunun sonucunda amonyak açığa çıkmaktadır,

böylelikle plak içerisindeki pH değeri de yükselmektedir (31). Tükürüğün tamponlama etkisi, uyarılmış yüksek akış hızlarında daha verimli çalışmakta, ancak uyarılmamış tükürük ile düşük akış dönemlerinde neredeyse etkisiz hale gelmektedir (32,33). Fosfatın yalnızca uyarılmamış akış sırasında bir tampon olarak önemli olduğu belirtilmiştir (34).

Çürükler üzerindeki tamponlama etkisi açısından, tükürüğün pH değerinin, tükürüğün modifiye ettiği mikrobiyal dental plağın pH değeri kadar önemli bir ölçü olmayabileceği ileri sürülmüştür (33). Mikrobiyal dental plağın pH değeri bakteriyel enzimlerin çalışabileceği değerin altında olmadıkça, kalan fermente olabilen karbonhidratlardan ve tükürüğün tamponlama kapasitesinden etkilenmektedir. Dinlenme periyotlarında (eksojen karbonhidratların son alımından 2-2,5 saat sonra) mikrobiyal dental plağın pH değeri 6-7 arasındadır (32,35). pH değeri gıdanın çoğunun alımından sonraki ilk 5 dakika boyunca artmaktadır. Gıda alımından yaklaşık 15 dakika sonra pH değeri 6.1 veya altına inerek en düşük değerine ulaşmaktadır. Yeni bir fermente olabilen karbonhidrat alımı olmadıkça, mikrobiyal dental plağın pH değeri yavaş yavaş 6-7 arasında olan dinlenme pH değerine geri dönmektedir (36,37). Bu nedenle, tükürüğün tamponlama kapasitesi, temizleme etkisi ve akış hızı, ağız içi pH değerini etkilemek için uyum içinde çalışmaktadır (38).

Tükürük akışı, dudakların ve dilin kas aktivitesinin yanı sıra beyine giden çiğneme uyarısı ile de arttırılabilmektedir. Uyarılmış ilave tükürük akışı ile, fermente olabilen karbonhidrat içermeyen çiğneme ürünleri (örneğin sakız) plak pH'sının düzenlenmesine yardımcı olabilmektedir (16,28).

2.1.4. Dişlerin Bütünlüğünün Korunması

Tükürüğün bir diğer önemli görevinin demineralizasyon ve remineralizasyonu döngüsünü kolaylaştırarak diş sert dokularının bütünlüğünü korumak olduğu bilinmektedir (14).

Demineralizasyon, asit atakları sonucu pH değerinin kritik pH'nın altına düştüğü durumlarda, diş sert dokularını oluşturan hidroksiapatit kristallerinin çözünmesi ve kalsiyum ve fosfatın diş yüzeyinden uzaklaşması olarak tanımlanmıştır.

Demineralizasyon sürecinin, fermente olabilen karbonhidratların bakteriler tarafından metabolize edilmesi ile ortaya çıkan organik asitlerin (laktik asit, asetik asit, propionik asit) mikrobiyal dental plak ve pelikıldan geçerek mine kristalleri arasındaki sıvı içerisine yayılması ile başladığı bilinmektedir (39) .

Plak bakterilerinin ürettiği organik asitlerden H^+ iyonlarının ayrıldığı ve bu durumun mikrobiyal dental plağın pH değerini düşürerek ortamdaki OH^- konsantrasyonunu azalttığı bilinmektedir. Buna ek olarak H^+ iyonlarının, plaktaki fosfat iyonları (PO_4^{-3}) ile de reaksiyona girerek fosforik asit oluşturduğu ve ortamdaki PO_4^{-3} konsantrasyonunu düşürdüğü bildirilmiştir. Bu süreçte yüzeydeki iyon dengesini sağlayabilmek amacı ile diş yüzeyinden PO_4^{-3} ve OH^- iyonlarının çözündüğü bilinmektedir. Nötralizasyonun sağlanması amacıyla gerçekleşen bu sürecin, diş yüzeyinden minerallerin çözünmesi ve demineralizasyon ile sonuçlandığı bilinmektedir (40).

Remineralizasyon, kaybedilen minerallerin, minenin organik matriksi vasıtasıyla hidroksiapatit kristalleri ile değiştirilmesi işlemidir. Tükürük içindeki minerallerin doygunluğu, dişlerin remineralizasyon sürecinde, dolayısıyla çürüğün önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tükürükte Ca ve PO_4 konsantrasyonlarının yüksek olması minenin olgunlaşmasını ve remineralizasyonunu sağlayabilmektedir (14,25,33,41).

Tükürüğün florid konsantrasyonunun $1 \mu\text{mol/l}$ 'nin hemen üzerinde olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu konsantrasyonun, tükürüğü florid içeren yiyecek, içecek ya da ağız bakım ürünlerinin alımı ile dişte oluşan herhangi bir fluorapatite kıyasla aşırı doygun tutmak için yeterli olduğu belirtilmektedir. Tükürük normalde hidroksiapatit ve fluorapatite göre aşırı doygun olsa da, çok küçük hidroksiapatit ve fluorapatit kristallerinin yüzeylerine bağlanma ve büyümelerini büyük ölçüde geciktirme yeteneğine sahip olan statherin gibi bazı proteinler içerdiğinden bu mineraller tükürükte çökelmemektedirler (42).

Tükürük akışının artması ile Ca ve PO_4 konsantrasyonlarının, tükürüğü hidroksiapatite göre daha fazla doygun hale getirecek seviyede arttığı, dolayısıyla tükürük akışının uyarılmasının remineralizasyon için gerekli iyonları sağladığı bildirilmiştir (32).

2.1.5. Tükürük Proteinlerinin Ağız Boşluğundaki Etkileri

Ağız boşluğu, birçoğu hala tanımlanamamış olan çok sayıda farklı mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Buna ek olarak yine çok sayıda mikroorganizma da ağızda geçici olarak bulunmaktadır. Bu kadar çeşitli potansiyel patojene karşı ağız boşluğunda da farklı savunma mekanizmalarının hazır bulunması gerektiği bilinmektedir (43).

Tükürük akışı ağız boşluğunda mikroorganizma birikimini engellemekte, ayrıca tükürük birçok doğal veya edinilmiş (antikor) savunma mekanizmasını da içermektedir (43). Tükürükte bulunan antimikrobiyal proteinler, spesifik olmayan (doğuştan) immünolojik faktörlerdendir. Bunlar, lizozim, laktoferrin, laktoperoksidad, immüoglobulinler, müsin, aglütinin ve bakteriyel aglütininler olarak etki edebilen diğer tükürük bileşenleri olarak sıralanmaktadır (14,44,45).

Lizozim, laktoferrin ve peroksidad gibi doğuştan gelen insan tükürük savunma proteinlerinin, bir dizi bakteriyel, viral ve fungal patojene karşı *in vitro* olarak geniş bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinmektedir (43). Bu proteinlerin çoğu, karyojenik mikroorganizmaların metabolizmasını, yapışmasını veya yaşayabilirliğini inhibe edebilmektedir. Spesifik olmayan immünolojik faktörlerin çoğu, antikorlarla (spesifik faktörler) etkileşime girerek ilgili aktivitelerinin karşılıklı olarak çoğaltılmasını sağlamaktadır (13,45).

Mutans Streptokokları (MS) ve Laktobasiller (LB), karyojenik kapasiteye sahip oldukları bilinen mikroorganizmalardır (46,47). Çürük lezyonlarının etiyolojik bir ajanı olarak kabul edilmekte olan MS, yüksek miktarlarda laktik asit üretebilmekte (asidojenik) ve tolere edebilmektedirler (asidürük). LB'nin ise özellikle çürük lezyonlarının ilerlemesinde rol oynadıkları bilinmektedir (47,48). MS ve LB'nin, çürük prevalansı ve çürük artışı ile pozitif korelasyon gösterdiği ve tükürük ile çürük oluşumu arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (43,49,50).

Tükürük içerisinde ayrıca bakterisid etkiye sahip histatinler, defensinler ve tek insan katelisinini olan LL-37'ler gibi bazı peptidler tanımlanmıştır (Tablo 1). Tüm bu proteinler ve peptidler geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etkiye sahiptir ve birbiri ile uyum içinde çalışmaktadırlar. Bu durum da ağız hastalıklarına yatkınlığın tek bir

bileşenin konsantrasyonu ile ilişkili olmadığı gözlemini açıklamaktadır (51). Ağız boşluğunun yaklaşık 700 farklı tür mikroorganizma içerdiği göz önünde bulundurulduğunda, bu antimikrobiyal faktörlerin normal flora üyelerini ortadan kaldırmak için yeterli konsantrasyonda olmadığı bildirilmiştir (13). Bununla birlikte, tükürükte bulunan antimikrobiyal faktörlerin oral florayı, sistemik enfeksiyon oluşumunu en aza indirecek kadar düşük seviyelerde tutabildiği, aynı zamanda bazı patojenik mikroorganizmaların da ağız boşluğunda hiç kolonize olamamasını sağladığı bilinmektedir (17,52–54).



Tablo 1. Tükürük bezlerinden salgılanan antimikrobiyal proteinler (13)

Tükürük (gliko)proteinleri	Kaynak aldığı doku	Oran (%)	Etkisi
MUC5B (müsin MG1)	bütün muköz tükürük bezleri	5-20	pelikılda proton difüzyon bariyeri
MUC7 (müsin MG2)	bütün muköz tükürük bezleri	5-20	agregasyon
İmmunoglobulinler	B lenfositleri: bütün muköz tükürük bezleri	5-15	bakterilerin etkisiz hale getirlmesi ve agregasyonu
Prolinden zengin glikoprotein	parotis bezi	1-10	bilinmeyen: agregasyon?
Sistatinler	submandibular > sublingual	10	proteaz inhibitörü
Histatinler	parotis ve submandibular bezler	5	geniş spektrumlu bakteri öldürücü
EP-GP	Submandibular ve sublingual bezler	1-2	bilinmeyen
Agglutinin	Parotis > submandibular > sublingual	1-2	bakteri agregasyonu
Lizozim	Sublingual > submandibular, parotis	1-2	öldürücü
Laktoferrin	Tüm tükürük bezleri; muköz > seröz	1-2	büyüme inhibisyonu
Laktoperoksidaz	Parotis > submandibular	<1	büyüme inhibisyonu
Kathelisidin	Tükürük bezleri, nötrofiller	<1	geniş spektrumlu bakteri öldürücü
Defansinler	Tükürük bezleri, nötrofiller	<1	geniş spektrumlu bakteri öldürücü

2.1.5.1. Lizozim

Lizozim, hemen hemen tüm canlı organizmaların ve virüslerin hücrelerinden, salgılarından ve dokularından saflaştırılmış hidrolitik bir enzimdir. Bakteriyel büyümeyi engelleyen, bilinen en güçlü doğal faktörlerden biridir. Ayrıca, antifungal ve antiviral etki de gösterdiği bildirilmiştir (55). 1922 yılında Alexander Fleming tarafından tesadüfen keşfedilmiştir (56). Fleming laboratuvarında çalışırken burun akıntısı kazara bakteri kültürünün bulunduğu petri kabının içine düşmüş ve *Micrococcus lysodeikticus*'u öldürdüğünü görmüş, böylece antimikrobiyal etkisini araştırmaya başlamıştır. Daha sonra çeşitli bitki, hayvan, bakteri, virüs ve mantardan saflaştırılmıştır (57–59). 1965 yılında kristalografi ile yapısı çözümlenmiş olup yapısı çözümlenen ilk enzim niteliği taşımaktadır (60,61).

Lizozimler kaynak aldıkları yer ve lizozim moleküllerinin antijenik, kimyasal ve enzimatik özellikleri arasındaki farklılıklara bağlı olarak 6 alt gruba ayrılmıştır.

1. Geleneksel/tavuk tipi lizozim (c – lizozim): Birçok omurgalı ve böcekte mevcut olan ve üzerinde en çok çalışılan lizozim tipidir; prototip olarak evcil tavukların (*Gallus gallus*) yumurta beyazından elde edilmiştir (62,63). Her ne kadar, tipik olarak kuşların yumurta beyazında bulunsa da, süt, tükürük, gözyaşı, idrar, solunum ve servikal sekresyonlar dahil olmak üzere memelilerin çeşitli doku ve sekresyonlarından da elde edilmiştir (57,59,64).
2. Kaz tipi lizozim (g – lizozim): Memeliler, kuşlar ve balıklar dahil olmak üzere omurgalılarda bulunan lizozim tipidir. Prototip olarak evcil kazların (*Anser anser*) yumurta beyazından elde edilmiştir (65).
3. Omurgasız tipi lizozim (i – lizozim): Omurgasızlarda bulunan lizozim tipidir (58,66,67).
4. Bitkisel lizozim (h – lizozim): Bitkilerde bulunan lizozim tipidir (68).
5. Bakteriyel lizozim (b – lizozim): Bakterilerde bulunan lizozim tipidir (69).
6. Viral lizozim (v – lizozim): Virüslerde bulunan lizozim tipidir (70).

Mukopolisakkarit yapısında olan ve müramidaz olarak da bilinen lizozimin; tükürük, gözyaşı, ter, mukus, gastrointestinal kanal duvarındaki pek çok salgıda ve dişeti oluşu sıvısında bulunduğu, ancak idrar ve beyin omurilik sıvısında bulunmadığı

belirtilmiştir (71). Kaynağını tükürük bezlerinden, dişeti oluğu sıvısından ve tükürük lökositlerinden almaktadır (56). Ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim niteliğini taşımaktadır.

Lizozimin, hücre duvarı polisakaritlerinin hidrolizini katalize ederek bakteriler üzerinde litik etkisi olduğu belirtilmiştir. Kuvvetli bir şekilde katyonik olan lizozimin bakteri hücre duvarının peptidoglikan tabakasında N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin arasındaki $\beta(1-4)$ bağımlı hidrolize ederek bakteri hücre duvarlarına zarar verdiği bildirilmiştir (72). Bu şekilde bakterileri tükürükteki hipo-ozmotik koşullara veya diğer antimikrobiyal bileşenlere karşı daha savunmasız bir hale getirmektedir. Böylece gram pozitif bakteriler bir protoplast, gram negatif bakteriler ise steroplast haline dönüşmekte ve bakterilerin bu defektif formlarına L-formları adı verilmektedir. Lizozimler ile bakteriler ağız florasında daima birlikte bulduklarından, herhangi bir zamanda ağız florasından bakterilerin L-formlarını elde etmek mümkündür. Bakterilerin L-formları, özellikle mikrobiyal dental plağın tükürük ile temas eden dış yüzeyinde, çürük kavitelerinde bulunmaktadır. Ancak, L-formlar dişeti enfeksiyonu veya diş çürüğünün birincil etkeni değildir. Yapılan bir çalışmada insanların %83'ünün ağızda L-formunda bakterilerin bulunduğu gösterilmiştir. Çürük, çekilmiş, dolgulu diş (DMFT) indeksi azaldıkça ağız florasındaki bakterilerin L-formlarının sayısı artmaktadır. Bu durum tükürükteki lizozimlerin antibakteriyel etkisini doğrulasa da bunun pasif bir etki olduğu kabul edilmektedir (73).

Lizozimin sadece gram pozitif bakterilerin hücrelerine karşı etkili olduğu bilinmektedir. Gram negatif bakteriler ve mayalar ise bu enzime karşı direnç göstermektedir. *Veillonella* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) hedef bakterilerden olmakla birlikte, özellikle MS'ye karşı etkili olduğu bildirilmiştir. *Klebsiella*, *Micrococcus*'lar, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Sarcinia*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*'lara karşı da etkili olmasına rağmen *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenicus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Treponema microdentium*, *Veillonella alcalescens* ve *Vibrio sputorum*'lara karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir (73).

Lizozimin antimikrobiyal etkisinin müramidaz aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir. Gram negatif bakterilerin, dış lipopolisakkarit tabakasının koruyucu fonksiyonu sayesinde lizozime karşı daha dirençli olduğu kabul edilmektedir. *Costerton ve ark. (1974)*, gram pozitif bakterilerde, gram-negatif bakterilerin aksine hücre dış zarı bulunmadığını, lizozimin hücrenin peptidoglikan katmanına serbest erişime sahip olduğunu ve bu nedenle lizozimin gram-pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (74). *Masschalck ve Michiels (2003)*, gram pozitif bakterilerin hücre zarının %90'ı müramidaz sakkulus iken, bu oranın gram negatif bakteriler için %10 olduğunu ve hücre zar yapıları arasındaki bu farkın gram pozitif bakterilerin genel olarak lizozime karşı daha duyarlı olmalarına neden olduğunu bildirmiştir (57).

Gram-negatif bakterilerin dış zarının etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), antikorlar ya da ısı ile tahrip edilmesi ve peptidoglikan katmanın lizozime maruz bırakılması ile lizozimin litik etkisine karşı duyarlı hale getirilebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (75–78).

Lizozimin antibakteriyel aktivitesinin, bazı gram pozitif bakterileri etkileyen katyonik özellikleri ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu yönünde de görüşler bulunmaktadır (79–81). Bu özellik sayesinde bakteriyel otolizi aktive ederek bakteri hücre duvarlarının parçalanmasına neden olmaktadır. Muhtemelen katyonik özelliği aracılığı ile, lizozim ısıyla inaktif olsa bile, bakterisidal etki göstermeye devam etmektedir. Bu, hücre duvarının ilk enzimatik bölünmesi, ardından bakteri hücre zarının fiziksel-kimyasal yapısının kendi lizozimi ya da diğer antibakteriyel sistemler tarafından bozulmasından dolayı bakterinin öldürülmesini içeren iki aşamalı bir çalışma mekanizmasının göstergesidir (13).

Enzimlerin aktivitelerinin pH ve sıcaklık değişikliklerinden etkilendiği ve her enzimin kendi özel pH ve sıcaklık değerinde etki gösterdiği bilinmektedir (82).

Yeni doğanlarda tükürük lizozim seviyesinin yetişkinlerle benzer düzeyde olduğu ve bu sayede, antimikrobiyal etkilerinin dişler henüz sürmeden açığa çıkabileceği belirtilmiştir (83).

MS'lere karşı etkinliği bilinen lizozimin tükürükteki seviyesinin çürük risk grubunu belirlemede bir kriter olabileceği düşünülmüş ve bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Stuchell ve Mandel (1983); diş çürüğü olan ve olmayan gruplarda lizozim seviyelerini karşılaştırmış ve iki grubun lizozim seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ve tükürük lizozim konsantrasyonunun çürüğe karşı direnç veya duyarlılığın kritik bir belirleyicisi olamayacağını vurgulamıştır (84).

Bai ve ark. (2007), diş çürüğü olmayan 94 ve erken çocukluk çağı çürüğü (EÇÇ) olan 98 çocuğun uyarılmış ve uyarılmamış tükürüklerindeki, immunoglobulin A (IgA), laktat dehidrojenaz ve lizozim konsantrasyonlarını karşılaştırdıkları çalışmanın sonucunda, EÇÇ'li grupta IgA, laktat dehidrojenaz ve lizozim konsantrasyonlarının çürüğü olmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirmiştir. EÇÇ varlığının, uyarılmamış ve uyarılmış tükürükte IgA, laktat dehidrojenaz ve lizozim artışıyla ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür. (85).

Tandon ve ark. (2010), 50 çürüksüz, 50 EÇÇ'li çocuğun tükürük örneklerini değerlendirdikleri çalışmanın sonucunda, DMFT değerinin lizozim konsantrasyonu arttıkça azaldığını raporlamış, lizozimin koruyucu ve antimikrobiyal etki sağladığını ve ağız boşluğunda yüksek konsantrasyonda lizozim bulunmasının diş çürüğünün önlenmesinde önemli bir rolü olabileceğini ileri sürmüştür (86).

Lizozimin bakterilerin yanı sıra, hücre zarlarında peptidoglikanın bulunmamasına rağmen virüsleri (87,88) ve parazitler (89) ve mantarlar (90–92) dahil olmak üzere ökaryotik mikroorganizmaları da inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu durum hücre çeperinin önemli bir bileşeni olan kitin varlığı ile açıklanmış ve lizozimin ayrıca kitinaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (93,94).

Tükürük savunma sistemlerinin fizyolojik koşullar altında birlikte yarattıkları etki üzerine yapılan çalışmalar az olmakla birlikte, farklı etki mekanizmalarına sahip olan proteinlerin eşzamanlı etkisinin ağız savunmasının gücünü arttırdığı düşünülmektedir.

2.1.5.2. Laktoferrin

Laktotransferrin, sütün bileşiminde bulunan önemli bir demir bağlayıcı proteindir ve adını bu özelliğinden almıştır. Geçmişte laktotransferrin olarak da adlandırılan laktoferrin, ilk olarak 1939'da Sørensen ve Sørensen tarafından sığır sütünde (95) tanımlanmış, ardından 1960 yılında eş zamanlı olarak üç bağımsız laboratuvar tarafından insan sütünden izole edilmiştir (96–98). Geçmişte sadece sütte bakteriyostatik demir taşıyıcı bir protein olarak görülmüştür, ancak bu görüş devam eden araştırma bulguları ile değişmiştir. Laktoferrinin, safra, pankreas sıvısı ve ince bağırsak salgıları gibi diğer ekzokrin salgılarda ve bazı özel nötrofillerin granüllerinde bulunan ve enzimatik olmayan, antimikrobiyal, önemli bir demir bağlayıcı protein olduğu gösterilmiştir. Hem insanda hem de inek, domuz, kısırak, keçi, fare gibi birçok memeli türünün çeşitli dokularında saptanmıştır (99).

Laktotransferrinin büyüklüğü ve yapısı, diğer demir bağlayıcı proteinler ve transferrinler ile yakından ilişkilidir. Diğer sıvılarla karşılaştırıldığında sütte daha yüksek seviyede laktoferrin bulunduğu görülmektedir. Ancak laktoferrin seviyesi süt türleri arasında da büyük farklılıklar gösterebilmektedir. İnsan, domuz ve fare gibi memelilerin sütünde laktoferrin konsantrasyonu yüksek seviyede olduğu, inek ve diğer geniş getiren hayvanların sütünde ise daha düşük seviyede bulunduğu bildirilmiştir (100,101). Laktoferrinin endüstriyel üretiminde yağsız süt veya peyniraltı suyu tozu kullanılmaktadır (102). İnek ve insan sütünden elde edilen laktoferrinler farklı türlerde olmakla birlikte benzer özellikler göstermektedir. Bu laktoferrin türleri, demir bağlama kapasiteleri ve aminoasit bileşimi açısından büyük bir benzerlik gösterirler. Yapılan hayvan çalışmalarıyla biyoaktivitelerinin de oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir (103).

Transferrin ailesinin demir bağlayıcı glikoproteinlerinden biri olan laktoferrin, metal iyonu bağlayıcı ajan olarak görev yapmaktadır. Laktoferrin, ağırlıklı olarak majör ve minör tükürük bezlerinin seröz hücrelerinden salgılanan ve antibakteriyel, antimikotik, antiviral, antineoplastik ve antienflamatuvar etkiye sahip demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Granülasyon sonucu, nötrofiller kan plazmasında laktoferrinin temel kaynağı haline gelmektedir. Lökositler yüksek miktarda laktoferrin içermekte ve dişeti oluğu sıvısına da laktoferrin salmaktadırlar (104).

Laktoferrinin ağız diş sağlığının korunmasındaki rolü hala tartışılmaktadır. Bununla birlikte, tükürükte bulunan mevcut demirin bağlanması, bakteriyel yapışmanın önlenmesi ve bakteriyel metabolizmanın değiştirilmesiyle, kolonizasyonun ve *S. mutans* aglütinasyonunun engellenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Laktoferrinin tek başına veya lizozim ile kombinasyon halinde, mikroorganizmaların büyümesini tahrip eden veya inhibe eden çeşitli aktiviteler ortaya çıkardığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, çeşitli tükürük antimikrobiyal ajanlarının, özellikle laktoferrinin seviyelerinin çürük duyarlılığı ile ilişkili olup olmadığı yönünde farklı görüşler vardır (104,105).

Ben-Aryeh ve ark. (1993), insülin bağımlı ve insülin bağımsız diyabet hastaları ile sağlıklı bireylerin tükürük ve ağız sağlıklarını inceledikleri çalışmalarında, çürük sayıları ile tükürük protein (amilaz, laktoferrin ve lizozim) miktarları arasında bir korelasyon bulunmadığını rapor etmişlerdir (106).

Kirstilä ve ark. (1998), 12 yaşındaki bir grup çocuktan, iki yıl boyunca, altı ay aralıklarla uyarılmış tükürük örnekleri toplamış ve yaptıkları çalışmalar sonucunda, *S. mutans* ve LB'nin başlangıçtaki çürükler ve artan çürük miktarı ile pozitif korelasyon gösterdiğini, ancak laktoferrin ve lizozimin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Buna rağmen, laktoferrinin diş çürüğü yatıklılığının bir belirteci olacak güçte bir kriter olmadığını vurgulamışlardır (107).

Ailesel disotonomi sendromu bulunan (ADS) çocuklarda, artmış majör tükürük bezi aktivitesi ve buna bağlı düşük çürük riski bildirilmiştir. **Mass ve ark. (2002)**, ADS bulunan çocuklarda çürük riskinin düşük olmasının, artmış tükürük hızına ek olarak tükürük bileşenlerindeki değişikliklerle de açıklanabileceğini düşünmüş ve ADS, sistemik olarak sağlıklı ve diş çürüğü olmayan, sistemik olarak sağlıklı ve çürüğü olan çocukların tükürüklerini değerlendirmiştir. ADS grubunun tükürük akış hızının diğer gruplara oranla çok yüksek olduğu, MS, klorid ve IgA konsantrasyonlarının ise anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. ADS grubunda IgA ve lizozim oranı artmadığından, düşük MS seviyeleri antibakteriyel aktivite ile değil, yüksek tükürük akış hızı ile ilişkilendirilmiştir. Sistemik olarak sağlıklı ve çürüklü gruptan alınan örneklerin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük potasyum (K) ve Ca, yüksek MS, LB ve lizozim içerdiği rapor edilmiştir. Çürüklü grupta

lizozimin fazla görülmesi, çürük aktivitesine karşı koruma amacıyla ağız boşluğuna lizozim salınmasını sağlayan bir mekanizma olabileceği belirtilmiştir (108).

Hoa ve Lin (2009), ise 80 çocuk üzerinde yürüttükleri çalışmada çocukları diş çürüğü olan (DMFT \geq 5) ve olmayan (DMFT=0) olarak gruplandırmışlar, tükürük proteinlerinin konsantrasyonlarını belirlemişler ve laktoferrin oranının diş çürüğü olan çocuklarda, diş çürüğü olmayanlara göre daha yüksek olduğunu, ancak iki grup arasında lizozim için anlamlı bir fark olmadığını rapor etmiş, laktoferrinin çürük oluşum sürecinde önemli bir rolü olabileceğini bildirmişlerdir (109).

Felizardo ve ark. (2010), 80 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada çocukları diş çürüğü olan – olmayan ve aktif çürüklü (mevcut çürüğü ve restorasyonları olan) – inaktif çürüklü (mevcut çürüğü olmayıp restorasyonları olan) olarak gruplandırmışlardır. Çocuklardan alınan uyarılmış tükürük örneklerinde lizozim ve laktoferrin konsantrasyonları belirlenmiş ve lizozim konsantrasyonu ile DMFT arasında zayıf bir korelasyon izlenirken, laktoferrinin hem DMFT hem de restore edilmiş dişler ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (110).

Andrade ve ark. (2014), laktoferrin ve lizozimin antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri *in vitro* çalışmada, çürük oluşumunda etkili *S. mutans* ve *Lactobacillus casei*'nin (*L. casei*) sadece lizozim tarafından inhibe edildiğini, laktoferrin veya her iki proteinin sinerjik kullanımından etkilenmediğini göstermişlerdir (111).

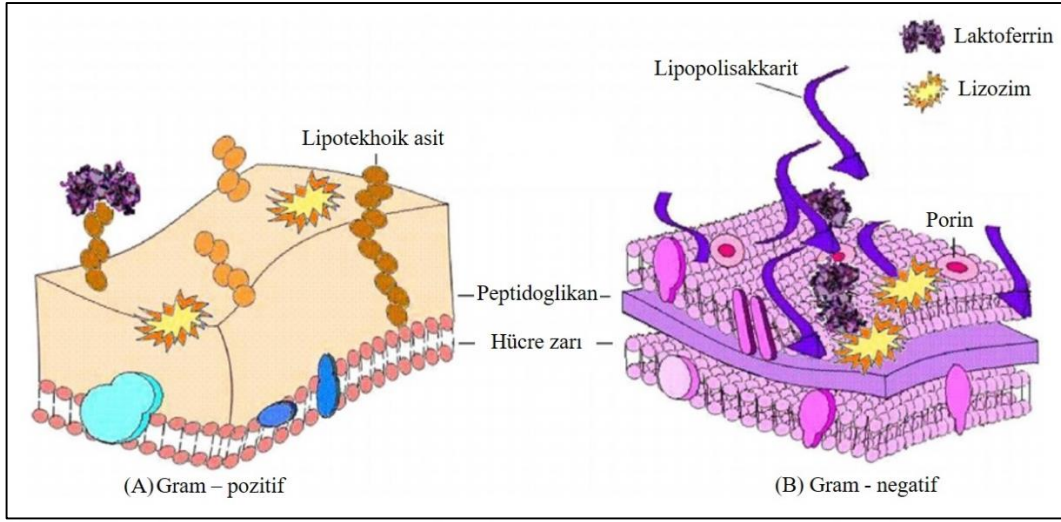
Moslemi ve ark (2015), tamamı sistemik olarak sağlıklı, 21 EÇÇ'li ve 21 çürüksüz çocuğun uyarılmamış tükürüklerinden alınan örneklerin lizozim ve laktoferrin konsantrasyonlarını, enzim bağlı immunosorbent test (ELISA) yöntemi ile belirlemiş, EÇÇ'li çocukların diş tedavileri tamamlandıktan sonra ölçümü tekrarlamıştır. Çürüksüz grubun lizozim miktarının EÇÇ'li gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. EÇÇ'li grupta laktoferrin miktarı daha fazla bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diş çürüklerinin tedavisinden sonra, ortalama lizozim ve laktoferrin konsantrasyonlarının, tedavi öncesine göre anlamlı bir değişiklik göstermediği raporlanmıştır (112).

Laktoferrinin bakteriyostatik etkisi demir bağlama özelliğine dayandırılmıştır. Molekül başına iki demir iyonu (Fe^{+3}) bağlayarak, karyojenik streptokoklar gibi bakterilerin canlı kalmaları için temel element olan demiri kullanmalarına engel olmaktadır. Laktoferrinin biyolojik fonksiyonu Fe^{+3} 'e yüksek affinite göstermesi ve bunun sonucu olarak, patojen mikroorganizmaları bu iyondan yoksun bırakması ile ortaya çıkmaktadır. Laktoferrinler bu şekilde geniş bir mikroorganizma grubunun büyümesini ve virülans faktörlerinin açığa çıkmasını inhibe ederek bakteriyostatik etki göstermektedir. Bakterilerin hayati besinler açısından yaşadıkları bu yoksunluk süreci beslenme bağımsızlığı olarak tanımlanmıştır (32).

Laktoferrinin bakterisidal etkisi demir bağlanma özelliğinden bağımsız olarak bakteriyel yüzeylerle doğrudan etkileşimi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2). Demirden bağımsız olduğu durum apo-laktoferrin olarak adlandırılmıştır. MS gibi bazı bakteri grupları üzerinde geri dönüşümsüz, bakterisidal etki göstermektedir. Apo-laktoferrin 47 amino asitten oluşan N-terminal bölgesinin kuyruk ucu boyunca etkileşimler yoluyla doğrudan bakterilere bağlanabilmektedir. Bakteri hücre zarı geçirgenliğini etkilemeden, DNA (Deoksiribonükleik asit) ve mitokondri gibi bazı hücre içi yapılarıyla etkileşime girerek, doğrudan bakterinin ölümüne sebep olmaktadır. Bu özellik sayesinde *S. mutans* ile aglütine olabildikleri ve böylece, tükürüğün de mekanik etkisiyle, aglütine edilmiş bakterilerin ağız boşluğundan uzaklaştırılmasına yardımcı oldukları belirtilmiştir (112,113).

Laktoferrinin hedef mikroorganizmalarından birinin de periopatojenik bakteri *A. actinomycetemcomitans* olduğu bilinmektedir. *A. actinomycetemcomitans* taşıyan periodontitis hastalarında, subgingival *A. actinomycetemcomitans* sayısı ile tükürükteki laktoferrin konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (114). Ek olarak, *in vitro* kültür sisteminde *Helicobacter pylori*'nin (*H. pylori*)ve *in vivo* fare modelinde *Helicobacter felis*'in (*H. felis*)büyümesini de önlediği gösterilmiştir (115).

İnsan tükürüğünde laktoferrinin demire doymuş ve demirden bağımsız formları eş zamanlı bulunabilmektedir. Laktoferrin geniş spektrumlu bakterisidal etki gösteren katyonik bir peptittir ve lizozim ile sinerjistik ve bakterisid etkileri olduğu bildirilmiştir (116).



Şekil 2. Laktoferrinin bakterisidal etki mekanizması.

(A) Gram-pozitif bakteri: Laktoferrin, hücre zarının lipotekhoik asit gibi negatif yüklü moleküllerine bağlanır, hücre zarını nötralize eder ve lizozim gibi diğer antibakteriyel bileşiklerin etkisine izin verir.

(B) Gram-negatif bakteri: Laktoferrin, lipopolisakkaritin A lipidine bağlanarak, bu lipitin serbest kalmasına neden olur ve bunun sonucunda hücre zarı zarar görür (113).

2.2. Ağız Diş Sağlığı ve Antimikrobiyal Ajanlar

Mikrobiyal dental plağın etkin bir şekilde uzaklaştırılmasının başlıca yolu, mekanik temizlik yani günde iki defa dişlerin fırçalanmasıdır. *Van der Weijden ve Slot (2015)*, yaptıkları meta derlemenin sonucunda, hem manuel hem de elektrikli diş fırçalarının mikrobiyal dental plağı uzaklaştırmada etkili olduğunu, ancak mekanik temizlik sonrasında plağın tamamen yok olmadığını, plak seviyesinin %42-46'ya düştüğünü bildirmişlerdir (117). Plak oluşumunu tamamen engelleyemediğinden tek başına mekanik temizliğin gingivitis oluşumunu önlemede yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu görüş çalışmalarla (118) ve bir sistemik derlemeyle (119) desteklenmektedir. Mekanik temizlikle plağı yeterince uzaklaştıramayan kişilerin ek olarak antimikrobiyal ajanlardan faydalanmaları önerilmektedir, bu şekilde biyofilmin hem miktarı azaltılmakta hem de yapısı bozulabilmektedir (120).

2.2.1. Fluorid

Fluorid, hem ekonomik hem de etkili bir antimikrobiyal ajan olması nedeniyle elli yıldan uzun bir süredir diş çürüğünün önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tükürük ve plakta florid varlığı minenin demineralizasyonunu önlemektedir. Kalsiyum (Ca) ve fosfat ile birlikte demineralize mine yapısına katılan florid, mine kristal yapısının bakteriyel asit ataklarına karşı daha dirençli olmasını sağlamaktadır (121). *Hamilton (1990)*, floridin biyokimyasal etkilerini araştırdığı çalışmasında, bakteriyel metabolizmayı inhibe ederek asit üretimini ve bakteriyel polisakkarid yapımını engellediğini göstermiştir (122).

Ortamda yüksek konsantrasyonda florid bulunması patojen plak bakterileri üzerinde bakterisid etki göstermektedir. Özellikle yerel florid uygulamalarının bu bakteriler üzerindeki spesifik etkileri ağız ve diş sağlığını da olumlu etkilemektedir (123).

Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine proteinlerin yapışmasının mikrobiyal dental plak oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Yüzeyde bulunan pozitif yüklü kalsiyum ve negatif yüklü fosfat grupları proteinlerle etkileşime girerek proteinleri tutmaktadır. Floridin kalsiyuma olan yüksek affinitesi bu bağlanmayı engellemektedir. Ayrıca, florid diş yüzeyinin nemliliğini etkileyerek serbest yüzey enerjisini azaltmaktadır. Yüzeyin nemlenmesi ile plağın yapışması da zorlaşmaktadır (124).

Ağız boşluğundaki mevcut bakteriler, diyet ile alından karbonhidrat miktarı fazla olduğunda intrasellüler polisakkarid (İPS) ve ekstrasellüler polisakkarid (EPS) sentezi yapmaktadırlar. İPS, glikojene benzer yapıdadır ve bakteriler tarafından dış kaynaklı enerji kaynağı bulunmadığı durumlarda kullanılmaktadır. Florid, glukoz-6-fosfat oluşumunu engelleyerek İPS yapımını inhibe etmektedir (122).

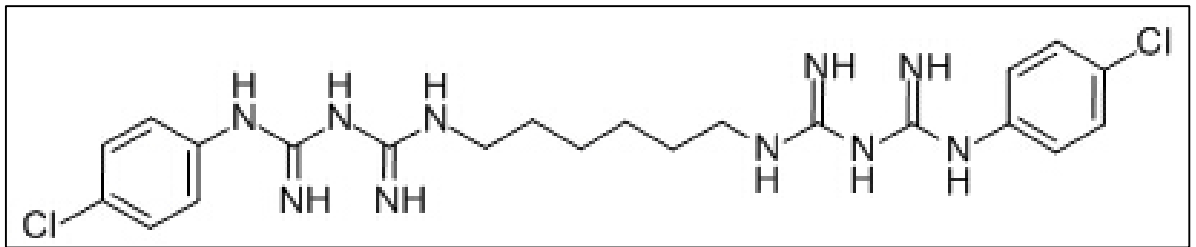
Floridin antimikrobiyal etkisini arttırmak için çeşitli florid tuzları ve bakır, kalay, alüminyum, titanyum gibi katyonlarla beraber kullanımı önerilmektedir. Metal iyonu içeren katyonik florid bileşikleri katyon sayesinde kısa dönemde plak oluşumunu azaltabilmektedir (123).

2.2.2. Klorheksidin

Klorheksidin çok sayıda uygulama alanına sahip, katyonik bisbiguanid grubu bir antibakteriyel ajandır. Düşük toksisiteli olup geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Temel sağlık hizmetlerinde ihtiyaç duyulan en önemli ilaçlar listesi olan ve 1977'den beri 2 yılda bir güncellenen 20. Dünya Sağlık Örgütü Temel İlaçlar Listesi'nde yer alan ilaçlardan biridir (125).

Klorheksidin ilk olarak, 1940'lı yıllarda İngiltere'de Imperial Chemical Industries firması tarafından geliştirilmiştir. 1950 yılında genel bir antiseptik olarak pazarlanmıştır. 1957 yılında Britanya'da insan kullanımına uygun cilt antiseptiği olarak piyasaya sunulmuştur. Daha sonra tıpta ve cerrahide yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Plak inhibisyonu ilk kez 1969'da Schroeder tarafından incelenmiştir (126). *Loe ve Schiott (1972)*, yaptıkları çalışma ile klorheksidin mikrobiyal dental plak oluşumunu engelleme etkisi ile çürük oluşumunu da inhibe edebildiğini göstermişlerdir (127).

Klorheksidin, çürük oluşumunu engellemesi ve antifungal - antibakteriyel etkilerinden dolayı uzun yıllardır diş hekimliği alanında çeşitli hastalıkların tedavisinde ya da profilaktik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ağız boşluğunda kullanımının en önemli etkilerinden biri mikrobiyal dental plak birikimini kontrol altına almak olan klorheksidin molekül formülü $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ 'dir (Şekil 3) (128).



Şekil 3. Klorheksidin molekül formülü (128)

Klorheksidin üzerinde en fazla çalışma yapılmış ve toksikolojisi üzerine en fazla bilgi sahibi olunan organik moleküldür. Klorheksidin antiplak ve antigingivitis ajanlar arasında altın standart olarak kabul edilmektedir. Molekülün özelliklerinin ve sınırlamalarının bilinmesi, ajanın etkinliğinin en üst düzeye çıkarılmasını ve yan etkilerin en aza indirilmesini sağlamıştır. Bu sayede uzun yıllardır altın standart olarak kalmaya devam etmiştir. Klorheksidin ilaç endüstrisi tarafından da, alternatif antiplak ajanların etkinliğinin ölçülmesinde pozitif kontrol olarak edilmiştir (129).

Klorheksidin suda az miktarda çözünebilirken organik çözücülerde çok miktarda çözünebilmektedir. Suda çözünmemesi nedeniyle bir glukuronik asit tuzu olan klorheksidin glukonat formu geliştirilmiştir ve bu formu yaygın olarak kullanılmaktadır (128).

Uzun yıllardır, antimikrobiyal etkisinin yüksek olması, deri ve mukozayla birleşebilmesi ve insan hücrelerine karşı toksik etkisinin az olması nedeniyle topikal antimikrobiyal ajanlar arasında en sık tercih edilenlerden biri olmuştur. 5,5-7 pH aralığı klorheksidin glukonatin en fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu aralıktır ve bu aralık, klorheksidin glukonatin sıklıkla kullanılacağı insan dokularının normal pH değerine karşılık gelmektedir (130).

2.2.2.1. Klorheksidinin stabilitesi

Klorheksidin solüsyonunun konsantrasyonu %1'den daha düşük olacak şekilde seyreltiği durumlarda ısıya oldukça dayanıklı olduğu bildirilmiştir. 123°C'lık otoklavda yapısı bozulmadan 15 dakika kadar sterilize edilebilmektedir. Konsantrasyonun %1'den fazla olduğu durumlarda ise çözünmemiş halde çökelmeler meydana geldiği gösterilmiştir (131).

Klorheksidinin sulu çözeltileri 5-8 pH aralığında en iyi etkiyi gösterirken, pH değerinin 8'den yüksek olduğu durumlarda klorheksidin çökelmekte, 5'ten düşük olduğu durumlarda ise kademeli olarak bakterilerin yıkımına ve bakteri sayısında azalmaya neden olarak antibakteriyel etkisi ortaya çıkmaktadır (131).

2.2.2.2. Klorheksidin antimikrobiyal etkisi

Klorheksidin bakteri, mantar, zarflı virüsler ve protozoalar gibi patojenlere karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Gram pozitif bakterilerin çoğuna karşı etkili olmakla birlikte, gram negatif bakterilere karşı daha az etki gösterdiği bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonda hücre zarı enzimlerini inhibe ederek ve hücre zarındaki yağ ve proteinler arasındaki bağlantının bozulmasına neden olarak bakteri hücrelerinin üremesini önlemekte, bakteristatik etki göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda ise bakteri sitoplazmasının çökmesini sağlayarak bakteri hücrelerini öldürmekte ve bakterisidal etki göstermektedir. Mantarlar üzerine de benzer şekilde etki göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda, virüslerin zarfı ile etkileşime girerek bu zarfın bozulmasına neden olmaktadır (131).

Mikrobiyal dental plak oluşumunun kontrol altına alınması ağız diş sağlığının temelini oluşturmaktadır. Klorheksidin moleküllerinin katyonik kısımları diş pelikülüne bağlanırken diğer uçları bakterilerin diş yüzeyinde kolonileşmesini engelleyecek biçimde serbest kalmaktadır. Bu sayede klorheksidin diş yüzeyine tutunarak bakterilerin bağlanmasını engellemekte ve mikrobiyal dental plak oluşumunu inhibe etmektedir (132).

Klorheksidin molekülleri aynı zamanda bakteri hücre duvarını bozup geçirgenliğini arttırmak ve hücrenin parçalanmasına neden olmak suretiyle antimikrobiyal etki göstermektedir (132). Bu özellikleri nedeniyle hem çürük oluşumunu engellemede profilaktik olarak hem de gingivitis tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (133).

Katyonik özelliği sayesinde diş minesine, pelikula, plak bakterisine, plaktaki ekstrasellüler matrikse ve müköz membrana bağlanabilen klorheksidin, 12-24 saat süreyle aktif formlar salgılamaya devam etmektedir (130). Klorheksidin ağız içerisinde yumuşak ve sert dokular tarafından emilmesi ve yavaş salınımının başlaması substantivite (etkileşime girme) olarak bilinmektedir ve bu özellik klorheksidin için ilk kez 1970 yılında tanımlanmıştır (134).

Substantivite, ilaç konsantrasyonundan, pH'dan, sıcaklıktan ve çözeltinin dokulara temas süresinden etkilenmektedir. Bu özellik ile klorheksidin moleküllerinin ağız dokuları tarafından emildikten sonra uzun bir süre daha etkin konsantrasyonda kaldığı ve antibakteriyel etkinlik göstermeye devam ettiği bildirilmiştir (134).

Klorheksidin etkisinin dişetinin üzerindeki bölgelerle sınırlı olduğu belirtilmiştir. Periodontal cep içerisine penetre olamadığından, düzenli klorheksidin kullanımı ya da cebin klorheksidin ile yıkanması buradaki floraya sadece kısa süreli bir etki gösterebilmektedir (135).

Klorheksidin çoğunlukla gargara formunda bulunmaktadır ve çeşitli yüzeylerden emilebilmesi ve geniş pH aralığında antibakteriyel etki gösterebilmesi nedeniyle mekanik temizliğe ek olarak kullanılması önerilmektedir (5).

Tüm bu olumlu etkilere rağmen, dişleri boyaması, tat alma bozuklukları ve diş taşı birikiminde artışa neden olması gibi dezavantajları bulunmaktadır ve bu nedenle klorheksidin uzun süreli kullanımı önerilmemektedir (129).

2.2.2.3. Klorheksidin etki mekanizması

Klorheksidin birincil etki mekanizması, hücre zarının bozulmasını içermektedir ve konsantrasyona bağlı olarak, bakteri hücre zarının büyümesini inhibe etmekte ya da ölümüne neden olmaktadır. Bakteri hücre zarı fosfat grupları içerir ve negatif yüke sahiptir. Pozitif yüklü klorheksidin molekülü, negatif yüklü bakteri yüzeylerine elektrostatik olarak çekilmektedir. Klorheksidin hücre dışı zarına çekilmesi, hücre zarının geçirgenliğini arttırmakta ve buna bağlı olarak potasyum gibi küçük moleküllerin sızmasına neden olmaktadır. Bu etkileşimin sonucunda ise bakteri hücre zarının fiziksel bütünlüğü zarar görmektedir. Bu aşamada, klorheksidin etkisi bakteriyostatiktir ve geri dönüşümlüdür. Bu etkinin düşük konsantrasyonlarda izlendiği bilinmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda, klorheksidin bakteri hücre zarı içindeki sitoplazmik proteinleri çökeltmekte ve etki, bakteriyosidal hale gelmektedir. Bu aşamada bakteri hücresi öldüğünden, etki geri döndürülemezdir. Klorheksidin uygulandığı konsantrasyonda göstereceği bakteriyostatik veya bakterisit etkinin, incelenen bakteri türlerine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (136).

2.2.2.4. Piyasada bulunan klorheksidin preparatları

a. Ağız gargaraları: %0,2 ve %0,12 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda bulunmaktadır. Alkol içeren ve içermeyen formları mevcuttur.

b. Jel: %1, %0,2 ve %0,12 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda bulunmaktadır.

c. Spreyler: %0,1 ve %0,2 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda bulunmaktadır.

d. Diş macunu: %1 konsantrasyonda, floridli veya floridsiz olarak piyasayada bulunmaktadır. Plak oluşumunun önlenmesi ve gingivitisin kontrol altına alınmasında etkili olduğu görülmüştür.

e. Verniler: Genellikle kök yüzeyinde çürük oluşumuna karşı profilaktik olarak ve yüksek çürük risk grubundaki çocuklarda florid uygulamalarına ek olarak uygulanmaktadır.

f. Yavaş salınım apareyleri: Küretaj ve diş kök yüzeyi temizliğini takiben dişeti cebine yerleştirilmek ve tedaviyi desteklemek üzere üretilmiş klorheksidin apareyeridir (137).

Löe & Schiott (1970), yaptıkları klinik çalışmanın sonucunda günde iki kez, bir dakika boyunca klorheksidin glukonat ile gargara yapmanın, plak oluşumu ve gingivitisini tamamen engellediğini göstermiştir. Klorheksidin kullanımının bırakılması ile plak oluşumunun normal değerlere döndüğünü ve gargaranın 24 saatlik bir süreden sonra etkinliğinin kalmadığını vurgulamıştır (138).

Klorheksidin, fiziksel ve antibakteriyel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla farklı maddelerle kombine edilmiş ve yeni ürünler piyasaya sürülmüştür. %1'lik klorheksidin diasetatın %1 timol ile birleşiminden Cervitec® Plus, %0,2'lik klorheksidin diglukonatın %0,09 sodyum florid (NaF) ile birleşiminden ise Cervitec® Jel geliştirilmiştir. Cervitec Plus'un içeriğinde bulunan timolün, hücre zarının geçirgenliğini değiştirdiği ve bakterinin pH ve inorganik iyon dengesini bozarak antibakteriyel özellik gösterdiği bildirilmiştir. Klorheksidin florid ile birlikte

uygulanmasının ise *S. mutans* ve LB üzerinde daha etkili olduğu çeşitli araştırmalar ile gösterilmiştir (139–141).

Kocataş-Ersin ve ark. (2008), süt dişlerinde çürükleri olup tedavileri tamamlanmış (DMFT=0), tükürük *S. mutans* seviyesi yüksek ve yüksek çürük risk grubunda olan çocuklar üzerinde yaptıkları çalışmada, bir gruba üç ayda bir klorheksidin jel (Cervitec Plus, Vivadent, %1 klorheksidin diasetat ve %1 timol), bir gruba altı ayda bir NaF jel (%2,0 NaF, Sultan Dental Products; 4,500 ppm fluoride ion) uygulamış, kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapmayıp üç ayda bir ağız diş sağlığı eğitimi vermiştir. İki yıllık takip sonucunda gruplar arasında çürük sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Yalnız ağız diş sağlığı eğitimi verilen grubun tükürük, *S. mutans* seviyesi diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Tüm grupların plak indeksi altıncı ayda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşerken, ikinci yılın sonunda anlamlı bir fark izlenmediği belirtilmiştir (142).

Sajjan ve ark. (2013), klorheksidin (Cervitec® Plus) ve florid jel (Duraphat®, %5 NaF) uygulamalarının mikrobiyal dental plakta bulunan *S. mutans* seviyelerine etkisini karşılaştırdıkları üç aylık çalışmalarında, *S. mutans* seviyesini düşürmede klorheksidin jelin anlamlı derecede daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (143).

Baygın ve ark. (2014), genel anestezi altında diş tedavileri tamamlanmış 90 engelli çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, çocukları randomize olarak 3 gruba ayırmış ve birinci gruba fluor protector (0,01 florid) uygulayıp 12 ay Colgate total original ile diş fırçalama önermiş, ikinci gruba Cervitec® Plus (%1 klorheksidin ve %1 timol) uygulayıp 12 ay Cervitec® Jel (%0,2 klorheksidin diglukonat ve %0,09 NaF) ile fırçalama önermiş, üçüncü gruba ise klinik uygulama yapmamış ve sadece Colgate total original ile fırçalama önermiştir. Grup 1 ve 2'nin birinci ve altıncı ay kontrollerinde plak indeksi, gingival indeksi, tükürük MS ve LB seviyeleri anlamlı derecede düşerken, 12. ay kontrollerinde anlamlı bir fark izlenmediği rapor edilmiştir (144).

2.2.2.5. Klorheksidinin güvenilirliği

Yapılan hayvan çalışmalarında klorheksidinin gastrointestinal bölgeden absorbe olmadığı ya da çok az absorbe olduğu gösterilmiştir. Akut oral toksisitesinin çok dūřuk olmasının bu özelliği ile ilişkili olduğu dūřünölmektedir. Uygun şekilde kullanımı genellikle güvenlidir ve toksik etki yaratmamaktadır. Klorheksidin ile yapılan hayvan çalışmalarında klorheksidinin yarılanma ömrünün 4 gün olduğu ve birincil atılım yolunun dışkı olduğu göstermiştir (145).

Ağız yoluyla alınmasının sistemik toksisite, mikrobiyal direnç ya da süperenfeksiyona neden olmadığı belirtilmiştir. Ancak, dilde, dişlerde ve restorasyonlarda kahverengi renklenmeler, tat alma bozukluğu, özellikle epitel deskuamasyonu, yumuşak doku laserasyonları, parotis bezinde şişme ve supragingival diş taşı oluşumunun artması gibi birçok yerel yan etkisi bulunmaktadır (129).

Klorheksidinin boyama etkisi ile ilgili 2 farklı görüş vardır. Bazı araştırmacılar renkleşmenin pelikül proteinlerinin denaturasyonu ile metalik sülfidlerin oluşmasına bağlı olduğunu savunmaktadır (146). Renkleşmenin diyet ile alınan kromojenler ve absorbe edilmiş klorheksidin arasındaki reaksiyona bağlı olduğu görüşü ise daha yaygındır. *İn vitro* koşullarda ortamda pelikül yokken klorheksidin ve diyet kromojenleri ile renkleşme oluşturulabilmesi bu görüşü desteklemektedir. Klorheksidinin tek başına kullanıldığında renkleşme yapmadığı ancak özellikle çay ile beraber kullanıldığında yüksek derecede renkleşmeye neden olduğu gösterilmiştir (147).

2.2.3. Esansiyel Yağ İçerikli Gargaralar

Daha önce yayınlanmış çalışmalarda, klorheksidin ve amin florür/kalay florür preparatlarının antiplak ve antibakteriyel etkinliği gösterilmiştir (148–154). Ancak son yıllarda doğal ürünlerin antiplak ve antibakteriyel ajan olarak kullanımı konusunda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Esansiyel yağların ve bitki özlerinin antiplak ve antibakteriyel etkilerini gösteren çalışmalar yapılmıştır (155).

Uçucu yağlar olarak da adlandırılan esansiyel yağlar, bitkilerin; iek, tomurcuk, yaprak, meyve, ince dallar, kabuk, tohum, odun, reçine ve kök gibi bölümlerinden elde

edilen aromatik yağlı sıvılardır. Esansiyel yağlar özütleme, fermantasyon veya ekspresyon yoluyla elde edilebilir, ancak buhar damıtma en yaygın kullanılan yöntemdir. Esansiyel yağlar farklı konsantrasyonlarda yaklaşık 20-60 bileşen içeren çok karmaşık doğal karışımlardır (156).

Eser miktarda bulunan diğer bileşenlere kıyasla oldukça yüksek konsantrasyonlarda (%20-70) iki veya üç ana bileşenle karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, küçük bileşenlerin esansiyel yağların antimikrobiyal özelliğinde kritik bir rol oynadığı ve diğer bileşiklerle sinerjik etkiler gösterdiği saptanmıştır (156).

Ana kimyasal grup, düşük molekül ağırlıklı olan terpen ve terpenoidlerden ve diğer aromatik ve alifatik bileşenlerden oluşmaktadır. Esansiyel yağların doğal aromasının ve antimikrobiyal aktivitesinin, bileşenlerin kimyasal konfigürasyonları, konsantrasyonları ve aralarındaki etkileşim ve biyoaktif özellikleri gibi faktörlerle ilgili olduğu belirtilmiştir (157). Esansiyel yağların bileşenlerinin karmaşık içeriği göz önünde bulundurulduğunda, antimikrobiyal etkisinin belirli bir mekanizma ile ilişkilendirilmesinin zor olduğu görülmektedir. Esansiyel yağların, çeşitli mekanizmalar ile hücre duvarının bozulmasına, hücre zarının hasar görmesine, zar proteinlerinin hasar görmesine, hücre içeriğinin sızmasına, sitoplazmanın pıhtılaşmasına, temel enzimlerin etkisizleşmesine ve genetik materyelin işlevinin bozulmasına neden olabileceği düşünülmektedir (137,158).

Uçucu yağlarda bulunan fenolik bileşikler normalde bir karbon yan zincirine sahiptir; timol, öjenol ve karvarolün bu gruba dahil olduğu bildirilmiştir. Bu bileşenlerin yüksek seviyede antiseptik, antibakteriyel ve dezenfektan etkiye, ayrıca önemli derecede uyarıcı, terapötik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarla fenolün hedef bakterilerde ileri derecede hücre içi bileşen kaybına neden olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücre içi pıhtılaşmaya sebep olarak bakteriyel hücre zarı hasarına yol açtığı gösterilmiştir (159).

Fenolik bileşiklerin mikroorganizamalara karşı toksik etkisinin; muhtemelen sülfhidril grupları ile tepkimeye girerek oksitlenmesi ve enzim inhibisyonuna yol açması ile ya da proteinlerle spesifik olmayan etkileşimler yoluyla meydana geldiği düşünülmektedir. Fenol bileşiklerinin hidrosilasyonunun artmasıyla

mikroorganizmalara karşı toksik etkisinin de arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarının konumu ve sayısının mikroorganizmalara karşı gelişen toksik etkide önemli rol oynadığı düşünülmektedir (160). Fenollerin doğası gereği, fenol içeriği yüksek olan esansiyel yağlar uzun dönem kullanıldığında toksik etki yaratabilmektedir, bu nedenle fenol içerikli ajanların düşük konsantrasyonlarda ve kısa süreli kullanımı önerilmiştir. Fenol bileşikleri için başlıca bitki kaynakları anason, tarçın, karanfil, rezene, muskat, maydanoz, sassafralar, yıldız anason, tarhun otu ve bazı botanik aileleridir (161).

Antimikrobiyal etkilerinin farkedilmesiyle birlikte fenoller ve bazı esansiyel yağlar pastil ve gargaraların bileşiminde antiplak ajan olarak kullanılmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalarla, bu bileşiklerin bakteri enzimlerini inhibe edip, hücre zarı lipitlerine bağlandığı ve transmembran transportta değişiklik yaptığı, bu sayede antiplak ajan olarak yüksek bir etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Klorheksidin ile etkilerinin karşılaştırıldığı uzun ve kısa süreli çalışmalarda, esansiyel yağların antiplak ajan olarak etkinliğinin klorheksidin kadar yüksek olmamakla birlikte yeterli olduğu belirtilmiştir (149,152,153,162).

Fenoller, prostoglandin ve lökotrien oluşumunu önleyerek antienflamatuvar etki göstermektedirler. Fenol içerikli bir gargara olan Listerine® ve onun jenerik versiyonları, supragingival plak birikimini ve dişeti iltihabını önlemek ve azaltmak için Amerikan Dişhekimleri Birliği (ADA) onay damgasına sahip tek fenol bileşikleridir (163). Yapılan kısa dönem çalışmalar bu ajanın plak ve gingiviti %35 oranında azalttığını, uzun dönem çalışmalar ise plağı %13,8-56,3 arasında (164), gingiviti ise %14-35,9 arasında azalttığını (165,166) göstermiştir. Literatürde bildirilen olası yan etkiler arasında yanma hissi, acı tat ve dişlerin lekelenmesi bulunmaktadır (167).

Esansiyel yağlar gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile mayaları etkileyecek derecede geniş bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. Gram pozitif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki gösterirken, gram negatif patojenlerden gelen endotoksinleri ise ortamdaki uzaklaştırırlar. Esansiyel yağların antimikrobiyal etki mekanizması, hücre duvarının bozulmasına, hücre zarının hasar görmesine, zar proteinlerinin hasar görmesine, hücre içeriğinin sızmasına, sitoplazmanın

pıhtılaşmasına, enzimatik aktivitenin azalmasına ve genetik materyelin işlevinin bozulmasına neden olmaktadır (137,158).

Quintas ve ark. (2015), %0,2'lik klorheksidin digluokonat içeren Oraldin Perio ve esansiyel yağ içeren Listerine®'in mikrobiyal dental plak üzerine etkilerini karşılaştırmış ve bu iki ajanın bakteri canlılığını ve biyofilm kalınlığını azaltmada steril suya oranla belirgin bir şekilde daha etkili olduğunu, bununla birlikte klorheksidin ve esansiyel yağın bakteri canlılığını azaltmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığını (%13,2-%14,7), biyofilm kalınlığını azaltmada ise %0,2'lik klorheksidinin esansiyel yağlara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkili olduğunu (6,5 µm – 10,0 µm) göstermişlerdir (168).

2.2.4. Povidon İyodin (PVP-I)

En güçlü ve en geniş kullanım alanına sahip antiseptik olan PVP-I çok hızlı bir şekilde bakterisidal etki göstermektedir. Sağlık alanında, cilt dezenfektanı olarak ve yara iyileşmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ağız içi topikal uygulamalarda %10'luk solüsyonu tercih edilmekte olan PVP-I'nin periodontal patojenler üzerine etkili olduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bakteriyel direnç gelişmesine neden olmayan PVP-I'nin, sistemik toksisitesi ve maliyeti de düşüktür. Kronik periodontitis tedavisinde de olumlu etkileri kanıtlanmış olan PVP-I tedavide yardımcı olarak sıklıkla önerilmektedir (169,170)

Periodontal cep irrigasyonunda antiseptik ajan olarak kullanılan %0,005'lik PVP-I'nin %0,2'lik klorheksidine kıyasla daha uzun süre antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (171).

Hoang ve ark. (2013), her yarım çenesinde ≥ 6 mm derinliğinde en az bir periodontal cep tespit edilen 60 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, başlangıç periodontal tedavi, küretaj ve kök yüzeyi düzleştirme işlemlerine ek olarak çalışma grubunda %10'luk PVP-I ve kontrol grubunda steril salin solüsyonu ile cep irrigasyonu yapmış ve PVP-I irrigasyonunun geleneksel mekanik tedavilere göre patojen sayısında çok daha yüksek oranda azalma sağladığını rapor etmişlerdir (172).

PVP-I'nın yüksek düzeyde antimikrobiyal etki göstermesine karşın, çürük önleyici etkileri üzerinde ortak bir karar bulunmamaktadır, bu nedenle yaygın olarak diş çürüklerinin önlenmesinde değil periodontitis tedavisinde tercih edilmektedir (173).

2.2.5. Kitosan

Kitin (β -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin), ilk olarak 1884'de tanımlanmış olan önemli bir polisakarittir. Bu biyopolimer çok sayıda canlı tarafından sentezlenmektedir; yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların dış iskeletinde, bazı bakteri, mantar ve mayaların hücre duvarında oluşmaktadır. Yıllık üretim miktarlarına bakıldığında dünyada selülozdan sonra en yaygın bulunan polimerdir. Kitinin deasetilasyon derecesi (polimerin kökenine bağlı olarak) yaklaşık %50'ye ulaştığında, sulu asidik ortamlarda çözünür hale gelmekte ve bu formu kitosan olarak adlandırılmaktadır. Kitosan, tek psödonatural katyonik polimer olarak tanımlanmaktadır (174).

İkinci ve ark. (2002), klorheksidin içeren ve içermeyen, jel ve film şekilde kitosan formülasyonları geliştirmiş ve biyoadeziv özellikleri ile periodontal patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda, biyoadeziv özelliği ve antimikrobiyal etkisi ile kitosan içeren bu formülasyonların periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği, klorheksidin içermeyen formülasyonların da bakteriler üzerine etkili oldukları, klorheksidin antimikrobiyal etkisini ise değiştirmedikleri belirtilmiştir (175).

Ataç ve ark. (2005), kitosanın klorheksidin içeren ve içermeyen film formülasyonlarını hazırlamış, ve bu yeni formülasyonların antimikrobiyal özelliklerini karşılaştırmışlardır. Antimikrobiyal ajanlar için iyi bir taşıyıcı olduğu belirtilen kitosan film formülasyonlarının aynı zamanda cerrahi işlemler sonrası ağız yaralarının iyileşmesinde tek başına da kullanılabileceği rapor edilmiştir (176).

2.2.6. Lizozim, Laktoferrin, Laktoperoksidaz

Tükürüğün lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz gibi antimikrobiyal protein ve enzimler içerdiği bilinmektedir. Etkin bir mekanik temizlik sonrasında ortamda bu

antimikrobiyal bileşenlerin bulunmasının mikroorganizma sayısını düşürdüğü ve bu sayede ağız hijyenine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (177).

Lizozim, laktoferrin gibi antimikrobiyal proteinler basit yöntemlerle diş macunu ve ağız çalkalama suları gibi ağız bakım ürünlerinin bileşimine eklenebilmektedir. Bu antimikrobiyal proteinler düşük maliyetle sığır kolestrumundan saflaştırılabilmekte ve sığır lizozim ve laktoferrini içeren ticari ürünler oluşturulabilmektedir. Biotene[®], Oralbalance[®], BioXtra[®] ve Zendium Saliva[®] lizozim ve laktoferrin içeren ticari ürünlerdendir. Son ikisi “peynir altı suyu ekstresi” veya “kolostrum” ve dolayısıyla sığır immünoglobulinleri de içermektedir, bununla birlikte üretici firma tarafından insan ağız içi patojenlerine karşı etkili olup olmadıkları bildirilmemiştir (178).

İnsan laktoferrini yakın zamanda *Aspergillus niger* fermantasyonu ile klonlanmıştır (179). Gelecekte, sığır sütünden elde edilen laktoferrinin yerine, insanda klinik kullanım için etkili ve güvenli olduğu bildirilen rekombinant insan laktoferrinin kullanılması öngörülmektedir. Ağız bakım ürünlerine eklenen demir içermeyen ve demir bağlı laktoferrinin etkileri arasında bir fark olup olmadığı henüz bilinmemektedir (179).

Tükürük peroksidaz sistemlerinin taklit edilmesinin, lizozim veya laktoferrine kıyasla daha karmaşık olduğu bildirilmiştir. Peroksidaz insan tükürüğünden ve polimorf nüveli lökositlerden saflaştırılmış ancak sadece araştırma için kullanılmıştır. Peroksidazın ticari ürünler için yüksek miktarda saflaştırılmasının hem zor hem de çok maliyetli olacağı belirtilmiştir. Bu nedenle insan tükürük peroksidazına yapısal ve katalitik olarak en yakın enzim olan laktoperoksidaz, ticari kullanım için sığır sütünden veya kolostrumundan saflaştırılmıştır (180). Laktoperoksidaz sistemi, Biotene[®], BioXtra[®], Zendium Saliva[®] ve Oralbalance[®] gibi ticari ürünlere dahil edilmiştir. Bu ürünlerin birçoğu sadece diş macunu formunda değil, aynı zamanda alkolsüz ağız çalkalama suyu, ksilitol aromalı sakız, ağız kuruluğu olan hastaların kullanımı için nemlendirici jel veya protez yapıştırıcısı olarak da üretilmektedir. Laktoperoksidaz sistemi antibakteriyel aktivitesini 1 - 2 yıl boyunca korurken, lizozim veya laktoferrin fonksiyonlarında olası değişikliğe ilişkin veri henüz bulunmamaktadır (181).

Kirstilü ve ark. (1994), normal tükürük akış hızına sahip 20 gönüllü ile yaptıkları çift körlü çalışmada, Biotene® diş macunu kullanımının plak pH'sını, asidojeniteyi veya laktik asit üretimini etkilemediğini, mikrobiyal dental plak birikimi ve plak pH'sında değişiklik olmadığını, ayrıca tükürük veya mikrobiyal dental plaktaki MS'lere, toplam streptokoklara, LB'ye veya toplam anaerobik floraya karşı Biotene® kaynaklı hiçbir antibakteriyel etki gelişmediğini rapor etmişlerdir (182).

Jyoti ve ark. (2009), 3-5 yaş grubu çocuklar üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmada, laktoferrin, lizozim ve laktoperoksidaz içeren Biotene® ve sodyum monoflorofosfat içeren Colgate Active diş macunlarının, EÇÇ saptanan çocuklardaki karyojenik bakteriler üzerine, etkisini değerlendirmişlerdir. Biotene® kullanan grupta tükürük MS ve LB sayılarının başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüş; ancak iki ürün karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir (183).

Hatti ve ark. (2007), laktoferrin, lizozim ve laktoperoksidaz içeren BioXtra® ve floridli Colgate-Palmolive® diş macunlarının plak oluşumu ve ağızdaki mikroorganizma sayıları üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla 18 yaş ve üzeri hastalar üzerinde randomize kontrollü çift körlü bir klinik çalışma yapmışlardır. Diş macunlarının 4 günlük kullanımı sonunda iki grubun plak skorları karşılaştırıldığında BioXtra® kullanan grubun plak skorunun istatistiksel olarak daha düşük olduğu, mikroorganizma sayıları karşılaştırıldığında ise yine BioXtra® kullanan grubun tükürük mikroorganizma sayılarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (184).

Gudipani ve ark. (2014), EÇÇ'li 30 çocuk üzerinde yaptıkları çalışmada, florid içeren, florid içermeyen ve lizozim, laktoferrin ve laktoperoksidaz içeren (BioXtra®) diş macunlarının antibakteriyel etkilerini karşılaştırmıştır. Macunların bir haftalık kullanımları sonrasında, BioXtra® kullanan grubun hem *S. mutans* hem de *L. acidophilus* sayılarında oldukça anlamlı derecede azalma izlenirken, floridli diş macunu kullanan grubun *S. mutans* sayısında oldukça anlamlı, *L. acidophilus* sayısında ise anlamlı derecede azalma izlenmiştir. Floridsiz diş macunu kullanan grupta ise *S. mutans* sayısında anlamlı azalma olurken *L. acidophilus* sayısında anlamlı bir değişiklik görülmediği bildirilmiştir (185).

Tonguç-Altın ve ark. (2015), yeni geliştirilmiş lizozim ve laktoferrin içeren formülasyonların MS ve LB üzerindeki antibakteriyel etkilerini incelemiş ve mikrobiyal dental plakta bulunan ve çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir (10).

Bunun takiben yapılan ‘Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonların Biyoyumluluklarının *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi’ adlı doktora tezinde; kontrol grubu olan klorheksidinin sitotoksik etkisi çalışma gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hücre canlılık oranı klorheksidin grubunda %25’den az, poloksamer 407 grubunda ise %50–75 arasında bulunmuştur (11).

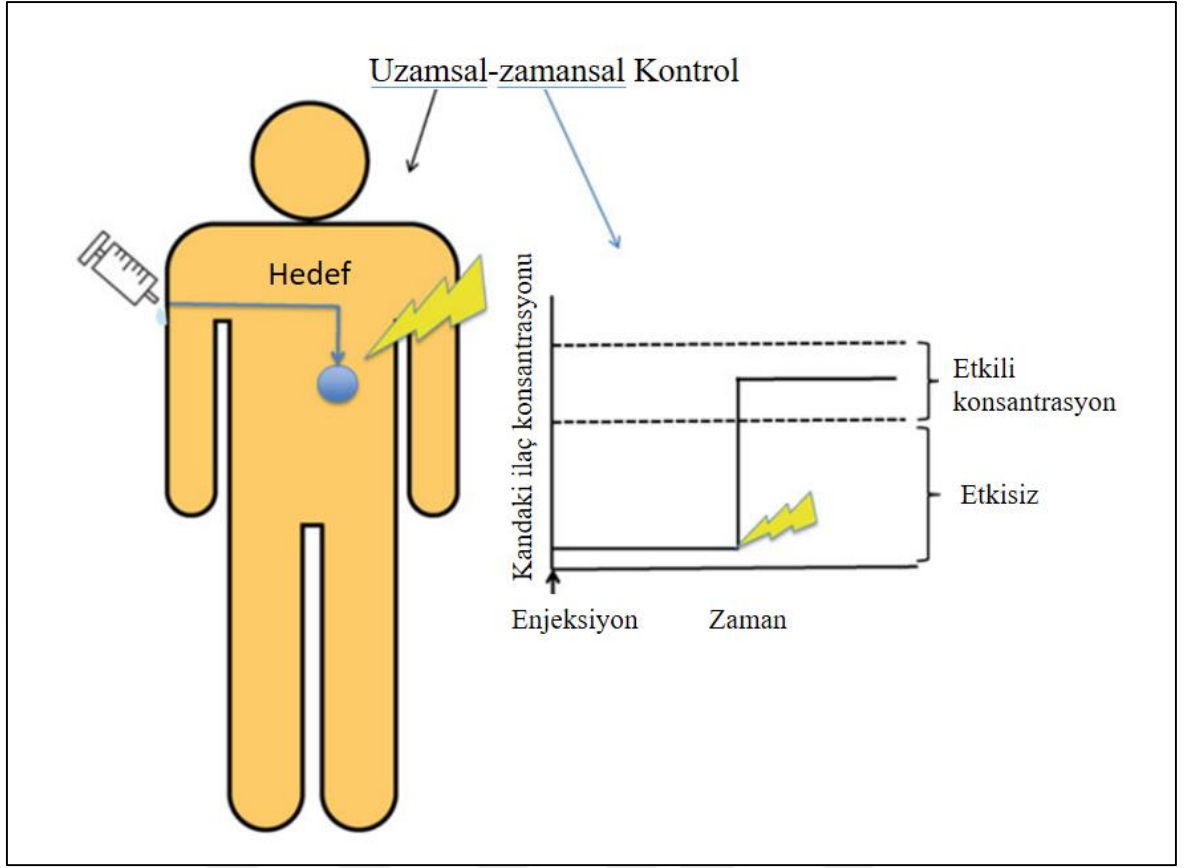
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşınması, insanlarda veya hayvanlarda terapötik bir etki elde etmek için farmasötik bileşiklerin, proteinlerin veya nükleik asitlerin uygulanması işlemidir. İlaç taşıma sistemleri; bir bileşenin bir başka kimyasal ile, bir ilaç uygulama cihazı ya da zamanı ile ilacın salım hızını, doku ve organlara salımı veya her ikisini de kontrol eden sistemlerdir. Bu sistemler, etken maddenin vücuda kolayca alınmasını ve hedef organ veya dokuya ulaşmasını sağlamaktadırlar. Etken maddeye uygun olarak seçilen ilaç taşıyıcı sistemler, ilacın kontrollü salıverilmesinde, hedef bölgeye ulaşip istenilen etkiyi gösterebilmesinde, istenilen kan konsantrasyonuna ulaşip bu konsantrasyonun istenilen süre boyunca devam ettirilmesinde önemli bir yere sahiptir. İki tür ilaç taşıma sistemi bulunmaktadır. Biri, bölgenin düzenlendiği “hedefli salınım”, diğeri ise materyalin zamana bağlı olarak düzenlendiği “kontrollü salınım” olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4) (192,193).

İlaç taşıma sistemleri günümüzde farmasötik teknoloji alanında üzerine en çok çalışma yapılan konulardan biridir. Bu konudaki çalışmaların temel amacının; geleneksel veya yeni etken maddelerinin güvenilirlik ve etkinliğini arttırmak, terapötik indeksini arttırmak, istenmeyen yan etkilerini azaltmak ve bu sayede daha iyi bir hasta uyumu elde etmek olduğu bildirilmiştir (194).

Günümüzde ilaç taşıyıcı olarak kullanılmak üzere pek çok sistem geliştirilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemler hareketli taşıyıcılar (mikro/nanopartiküller) ve statik taşıyıcı sistemler (vücudun belirli bölgelerine yerleştiren polimerik sistemler) olarak sınıflandırılmaktadır. Üzerlerinde en çok çalışma yapılan ilaç taşıyıcı sistemler; lipozomlar, niozomlar, sfingozomlar, miseller, mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller, katı-lipit nanopartiküller, mikrosüngerler olarak sıralanmaktadır (192,195).

İlaçların *in vivo* koşullarda tespit edilen davranışları, uygulamaya hazır hale getirilmek amacı ile ilaç taşıyıcı sistemlerle birleştirildiğinde değişebilmektedir. Benzer şekilde taşıyıcı sistemler içinde enkapsüle halde bulunan ilaçların dokudaki dağılımı, metabolizması, kinetik parametreleri de kısmen veya tamamen değişiklik gösterebilmektedir. Bu sistemlerin uygulanmasında öncelikle kullanılacak sistemin hedef doku ve organ sistemleri ile ilişkisi tam olarak bilinmelidir. İlaç taşıyıcı sistemlerin en büyük avantajı, partikül büyüklüklerine göre belirli doku ve organlara hedeflendirilebilmeleri ve bu sayede yan etki ve istenmeyen reaksiyonların en aza indirilebilmesidir (196).



Şekil 4. Uzamsal-zamansal kontrollü ilaç salımı: ilacın hedefe ulaşması, etkili kan konsantrasyonuna ulaşması ve bu konsantrasyonun istenilen süre boyunca korunması (192).

2.3.1. Ağız Bölgesinde Kullanılan İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaçların, ağız içinde mukoza tarafından emilebildiği ilk olarak 1847 yılında Sobrero tarafından tespit edilmiştir. Nitrogliserinin keşfi ve ağız boşluğunda emiliminin sistematik çalışmaları ilk kez 1935 ve 1944'te Walton tarafından rapor edilmiştir (197,198). Bu çalışmaların ışığında, sistemik etki sağlama amacıyla geliştirilen mukozal ilaç taşıma sistemlerine ek olarak ağız hastalıklarının (diş çürükleri, diş eti hastalıkları ve oral mukoza enfeksiyonları) tedavisinde lokal etkili ilaç uygulamaları üzerine de çok sayıda araştırma yapılmıştır (199).

2.3.1.1. Adeziv olmayan sistemler

Ağız boşluğu içerisinde serbest halde bulunan ilaç, taşıyıcı sistemden salındığında ağız mukozası ile temas etmektedir (200).

2.3.1.1.a. Hızlı çözünen dozaj şekilleri

En basit uygulama yöntemidir. Ağız ortamında kısa süre kalabilmesi ve bireyler arasında etkin maddenin absorbe edilme ve hedefe ulaşma hız ve derecesinin (biyoyararlanım) farklılık göstermesi etkinliği azaltan etkenlerdir (200).

2.4.1.1.b. Sakızlar

Temel absorpsiyon bölgesi dilaltı mukozası olan sakızların formülasyonunda ana madde olarak selüloz ve akrilik türevi polimerler kullanılmaktadır. İlacın sistemden salınımı, sakızın çiğneme hızı ve şiddeti ile kontrol edilmektedir (201).

2.4.1.1.c. Pastiller

Emilerek kullanılan pastillerin temel hedefi etken maddenin ağız içi ya da farinkste uzun süre tutulmasıdır (202).

2.4.1.1.d. Çözeltiler

Antibakteriyel etken maddelerin taşıyıcı sistemler içerisinde çözülmesi ile oluşturulan gargaralar özellikle ağızdaki çeşitli rahatsızlıkların önlenmesinde ve tedavisinde tercih edilen çözelti formundaki preparatlardır. Antibakteriyel çözelti sistemlerinden en sık tercih edilen ve üzerine en çok çalışma yapılan %0,2 konsantrasyonundaki klorheksidin diglukonattır (203).

2.4.1.1.e. Mikroporöz boş fiberler

İlaçların gözenekli polimer yapı içerisine hapsedilmesi ile geliştirilmiş olan bu sistemler ağız içine uzun süreli ilaç salımı yapılmaktadır. Periodontal tedavilerde cep

içerisine yerleştirilmek üzere bu sistemle geliştirilmiş antibiyotikler bulunmaktadır (194).

2.4.1.2. Adeziv sistemler

Etken maddenin ağız içerisinde daha uzun süre tutulması ve bu sayede daha uzun süreli etki elde etmeye yönelik çalışmaların yoğunlaşması ile adeziv sistemler geliştirilmiştir. Adeziv sistemlerin en önemli özelliği, ilaç taşıyıcı sistemin sabitlenebilmesi ve kontrollü salımın sağlanabilmesidir (204).

Farklı yüzeylerin aralarında ara yüzey kuvvetleriyle bir arada tutulması adezyon olarak adlandırılmaktadır. Adezyonun oluştuğu yüzeylerden biri biyolojik bir yapı ise biyoadezyon olarak ifade edilirken, biyolojik yüzeye uygun süre boyunca adezyon yapabilen maddeler ise biyoadeziv madde olarak tanımlanmaktadır. Biyoadezyon adeziv tabletlerin bileşimindeki yapay veya doğal moleküllerin istenilen süre boyunca biyolojik dokuya tutunabilmesini sağlamaktadır. Adezyon sağlanan biyolojik yapının mukoza olması durumunda biyoadeziv sistem mucus tabakası ile temas etmekte ve bu sistem mukoadeziv sistem olarak ifade edilmektedir (205).

Ağız boşluğunda kullanılacak adeziv ilaç taşıyıcı sistemlerin, istenen süre boyunca mukozaya tutunabilmesi, mukozaya zarar vermemesi, biyouyumlu olması ve irritasyona yol açmaması, ayrıca dudak ve yanak hareketlerini kısıtlamaması için yeterince esnek olması beklenmektedir (206).

Ağız içerisinde lokal ya da sistemik uygulamalar için geliştirilmiş olan biyoadeziv ilaç taşıyıcı sistemler tek veya çift yönlü ilaç salımı yapabilmektedir (206).

2.4.1.2.a. Adeziv tabletler

Adeziv tablet sistemlerin monolitik, kısmen kaplı ya da tabakalı matriksler olmak üzere 3 farklı formu bulunmaktadır. Sistemik tedavi hedeflendiğinde, mukoza ile temas etmeyen yüzeyi koruyabilmek amacı ile tek yönlü ilaç salımı yapabilen kısmen kaplı formları kullanılmaktadır. Tek yönlü salım sağlamak amacıyla üretilen adeziv tabletlerin bir tabakasına etken madde yerleştirilip mukoza ile teması sağlanırken, ağız

boşluğuna bakan tabaka inert özellikte, adeziv tabakayı tükürük ve enzimlerden koruyacak şekilde hazırlanmaktadır. İlacın direkt ağız boşluğuna salınımı hedeflendiğinde, etken madde adeziv olmayan tabakaya yerleştirmektedir. Antibiyotik ve antiseptiklerin ağız içine mukoadeziv tablet sistemleri ile uygulandığı çalışmalar yapılmıştır (207,208)

Adeziv tabletlerin, yeme, içme ve konuşmayı kısıtlamamakla birlikte yeterince esnek olmadıkları bildirilmiştir. Ayrıca temas yüzeyinin küçük olması, hızlı ilaç salımının sağlanamaması, kronik uygulamalarda mukozada bulunma süresinin ve uygulama sıklığının artması nedeniyle mukoza iritasyon riskinin olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (206).

2.4.1.2.b. Adeziv filmler ve yamalar

Adeziv tabletlere dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucu geliştirilmiş olan adeziv filmler ve yamalar, esnek ve geniş yüzey alanlı sistemlerdir. Bu sistemler, özellikle adeziv tablet formunda verilemeyen ya da verilmesi halinde yüksek miktarda kayıp yaşanan etken maddelerin uygulanması amacıyla geliştirilmiştir. Uygulandığında uzun süreli etki elde edilmesi ile etki veya yan etkisinin istenildiği noktada sonlandırılabilmesi sistemin en önemli avantajları olarak bildirilmektedir (206).

Adeziv yama sistemleri ağız mukozasına yapıştırılarak uygulanmaktadır. 20 mg kadar etken madde eklenebilen adeziv filmler ince şeritler halinde tasarlanmış olup dil üzerinde 30 sn'den daha kısa bir sürede dil üzerinde çözünebilmektedir. Bu uygulama ile etken madde doğrudan kan dolaşımına geçebildiğinden bu sistemlerin özellikle hızlı tedavi gerektiren durumlarda kullanıldığı bildirilmektedir (209).

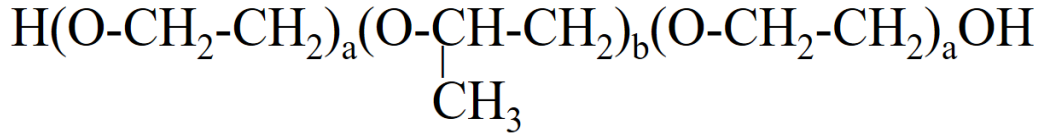
2.4.1.2.c. Adeziv yarı katı preparatlar (merhemler-jeller)

Etken madde krem ya da merhemler yoluyla uygulandığı takdirde mukoza yüzeyine yeterince bağlanamamakta ve ilacın bir miktarı tükürük ile birlikte yutulurken ortamdaki uzaklaşmaktadır. Polimerler ile hazırlanan adeziv merhem ve jellerin ise ilacın ortamda kalabilme süresini, dolayısıyla etkinliğini arttırdığı bilinmektedir (210).

Poloksamer

Polioksietilen ve polioksipropilen'in polimerleri olan ve 30 çeşitten fazla non iyonik yüzey aktif ajanlardan oluşan poloksamerler piyasada Pluronics® ticari ismiyle bulunmaktadır. Bu polimerler biyoyoumlu olup uzun yıllardır ilaç taşıyıcı sistem olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Poloksamerler, ABA tipi üçlü blok kopolimerlerdir ve poloksietilen oksit (PEO) ve poloksipropilen oksitin (PPO) yoğunlaştırılmasıyla üretilmektedir (211).

Poloksamer 407, poloksamer ABA blok kopolimer serilerinden en sık kullanılanıdır. Moleküler ağırlığı 12500, PEO/PPO içeriği 2:1 oranında olan poloksamer 407, piyasada Pluronic® F-127 ticari ismiyle bulunmaktadır (BASF Laboratories, Wyandoote, USA) (212). Poloksamer 407'nin kimyasal formülasyonu aşağıdaki gibidir (Şekil 5).



Şekil 5. Poloksamer 407'nin kimyasal formülasyonu (212)

Poloksamerler soğuk suda daha fazla çözünmektedir. Bu durum düşük sıcaklıklarda artan çözünme ve hidrojen bağlanması ile açıklanmıştır (211).

Poloksamerlerin oluşturduğu konsantre sulu çözeltiler termoreversible (ısı ile dönüşebilen), adeziv yarı katı (jel) sistemleri oluşturmaktadır. Poloksamer 407'nin ağırlık/ağırlık (a/a) olarak %20-30 konsantrasyonundaki sulu çözeltileri, ilginç bir ters termal jelleşme karakterine sahiptir, buzdolabında (4-5 °C) sıvı iken, oda sıcaklığında

(25 °C) akışkan yoğun bir sıvı, vücut sıcaklığına ulaştığında ise (37 °C) transparan yarı katı (jel) bir form almaktadır. Soğutma ile tekrar sıvı hale geçtiklerinden ve ısı ile geri dönüşebilen jeller olarak sınıflandırılmaktadırlar (213).

Poloksamerler, mekanizması halen tartışmalı olan bu jelleşme özellikleri ile mukozal ilaç uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır; bunun nedeni ilacın jelleşmesi ile mukozada kalma süresi ve mukoza ile temasının ve buna bağlı olarak da ilacın biyoyararlanımının artmasıdır (212).

Liu ve Chu (2000), %50'den yüksek a/a konsantrasyonda hazırlanan poloksamerin daha visköz bir yapıda hatta kısmen katı formda olduğunu ve sıvı formuna çözünmesinin daha uzun zaman aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca poloksamer 407'nin %20-30 a/a konsantrasyonlarında daha kolay hazırlanabileceğini belirtmişlerdir (214)

Yapılan toksikoloji çalışmaları ile, poloksamer 407'nin iyi tolere edilebilir bir kopolimer olduğunu gösterilmiş; medikal, farmasötik ve kozmetik alanlarında kullanım için oldukça uygun bir materyal olduğu rapor edilmiştir (212).

Poloksamerlerin, lidokain (215) ve antikanser ajanların (216) topikal uygulamalarında ve yanık tedavilerinde (213,217) kullanımının uygun olduğu bildirilmiştir. Vücut sıcaklığında sıvıdan jel forma geçmeleri nedeniyle doku altına enjekte edilebilen implantlar olarak da tercih edilmektedirler (218). Pek çok diş macunu ve ağız gargaraları bileşiminde taşıyıcı sistem olarak farklı konsantrasyonlarda poloksamer bulunmaktadır (219).

Cogger ve ark. (2006), fareler üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmada, poloksamer 407'nin intraperitoneal enjeksiyonunun hiperlipidemiye yol açtığını göstermişlerdir (220).

2.4. Tıbbi Cihazların Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi

Tıbbi cihaz; üretici tarafından tek başına ya da kombinasyon halinde insanlar tarafından ya da insanlar üzerinde kullanılmak üzere tasarlanmış, alet, aygıt, cihaz,

makine, implant, yazılım, malzeme gibi her türlü ürüne verilen genel bir isimdir. Tıbbi cihazlar bir ya da daha fazla amaç için kullanılabilirler:

- Hastalığın tanısı, önlenmesi, izlenmesi, tedavisi veya hafifletilmesi,
- Bir yaralanmanın tanısı, izlenmesi, tedavisi, hafifletilmesi veya telafi edilmesi,
- Anatomik veya fizyolojik bir bölgenin araştırılması, modifiye edilmesi, değiştirilmesi veya desteklenmesi,
- Yaşamı desteklemek veya sürdürmek,
- Gebelik kontrolü
- Dezenfeksiyon,
- İnsan vücudundan elde edilen örneklerin *in vitro* koşullarda incelenmesi ve tıbbi amaçlar için bilgi sağlanması,
- İnsan vücudunda, farmakolojik, immünolojik veya metabolik yollarla birincil olarak amaçlanan eylemini gerçekleştiremeyen bölgenin işlevini sağlamasına yardımcı olmak olunması (221).

Biyolojik değerlendirmenin temel amacı, insanların tıbbi cihazların kullanımından kaynaklanan potansiyel biyolojik risklerden korunmasıdır. Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesiyle ilgili çok sayıda uluslararası ve ulusal standart ve kılavuz bulunmaktadır. Her bir cihazın genel değerlendirmesi ve geliştirilmesinin bir parçası olarak, risk yönetimi sürecinde tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi için bir rehber doküman olması amaçlanmıştır ve Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından mevcut kılavuzların derlenmesi ile 'Tıbbî Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi' klavuzu yayımlanmıştır (ISO 10993:1992). Klavuzun son revizyonu 2018 yılında yapılmıştır (ISO 10993:2018) (222). Bu kılavuz, tüm kaynaklardan gelen mevcut verilerin değerlendirilmesini, gerektiğinde ilave testlerin seçilmesi ve uygulanmasını birleştirmekte, böylece her türlü tıbbi cihazın biyolojik cevaplarının eksiksiz bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır (222).

Bu kılavuz, tıbbi cihazların dokular üzerindeki etkilerinin, cihazların belirli özel durumlarından ziyade, çoğunlukla genel bir şekilde değerlendirilmesine yöneliktir. Bu nedenle, tam bir biyolojik güvenlik değerlendirmesi için, tıbbi cihazlar, kullanım sırasında insan dokularıyla beklenen temaslarının niteliğine ve süresine göre

sınıflandırılmıştır. Her seçenek için uygulanması gereken test yöntemlerinin listelenmiş olduğu bu klavuz, biyolojik değerlendirmenin planlanacağı bir rehber niteliği taşımaktadır (Tablo 2).

Biyolojik cevabın değerlendirilmesi, *in vitro* ve *ex vivo* test yöntemlerine ve hayvan modellerine dayanmaktadır. Bu nedenle, hayvanlarda bir tıbbi cihaz kullanımı sırasında biyolojik bir yanıt öngörülürken bu reaksiyonun insan türünde de izleneceğinin kesin olarak gösterilemediği dikkate alınmalıdır. Ayrıca, bireyler arasında aynı materyale verilen biyolojik cevaplar arasındaki farklılıklar, bazı hastaların iyi bilinen materyallere karşı bile olumsuz reaksiyon verebileceğini göstermektedir (12).

Herhangi bir tıbbi cihazın uzun süreli kullanılabilmesi için biyolojik olarak uyumlu olması gerektiği bilinmektedir. Biyouyumluluk, kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olmayan ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb.) oluşmasına yol açmamak olarak tanımlanmaktadır (223).

Biyolojik değerlendirme sürecinde dikkate alınması gereken bir çok faktör bulunmaktadır. Materyalin karakterizasyonu biyolojik değerlendirme sürecinde çok önemli bir ilk adım olarak belirtilmektedir. Gereken kimyasal karakterizasyonun kapsamının, var olan güvenilirlik ve toksikolojik veriler ile tıbbi cihaz ile dokunun temasının niteliğine ve süresine bağlı olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, karakterizasyonun en azından, cihazı oluşturan kimyasalları ve imalatında kullanılan katkı maddelerini ele alması gerektiği belirtilmektedir. Kimyasal karakterizasyon işlemindeki her bir değerlendirmenin, biyolojik değerlendirmede karar aşamaları ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (**Şekil 6**).

Tablo 2. Tıbbi cihazın kategorizasyonuna göre gerekli biyolojik değerlendirme testlerinin seçimi (12)

Tıbbi cihaz kategorizasyonu			Biyolojik etkisi								
Kategori	Temasın şekli	Temas süresi	Sitetoksosite	Duyarlılık	İritasyon veya intrakutanöz reaktivite	Sistemik toksisite (akut)	Subkronik toksisite (subakut)	Genotoksisite	İmplantasyon	Hemokompatibilite	
											A - limitli (≤24 sa)
											B - uzun (24 sa - 30 gün)
											C - kalıcı (> 30 gün)
Yüzey cihazı	Deri	A	X ^a	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X						
	Mukoz membran	A	X	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X		X	X			
	Kırılmış veya hasar görmüş yüzey	A	X	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X		X	X			
Harici cihaz	Kan yolu, indirekt	A	X	X	X	X				X	
		B	X	X	X	X				X	
		C	X	X		X	X	X		X	
	Doku/kemik/dentin	A	X	X	X						
		B	X	X	X	X	X	X	X		
		C	X	X	X	X	X	X	X		
	Kan dolaşımı	A	X	X	X	X					X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X
İmplant cihaz	Doku / kemik	A	X	X	X						
		B	X	X	X	X	X	X	X		
		C	X	X	X	X	X	X	X		
	Kan	A	X	X	X	X	X		X	X	
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	

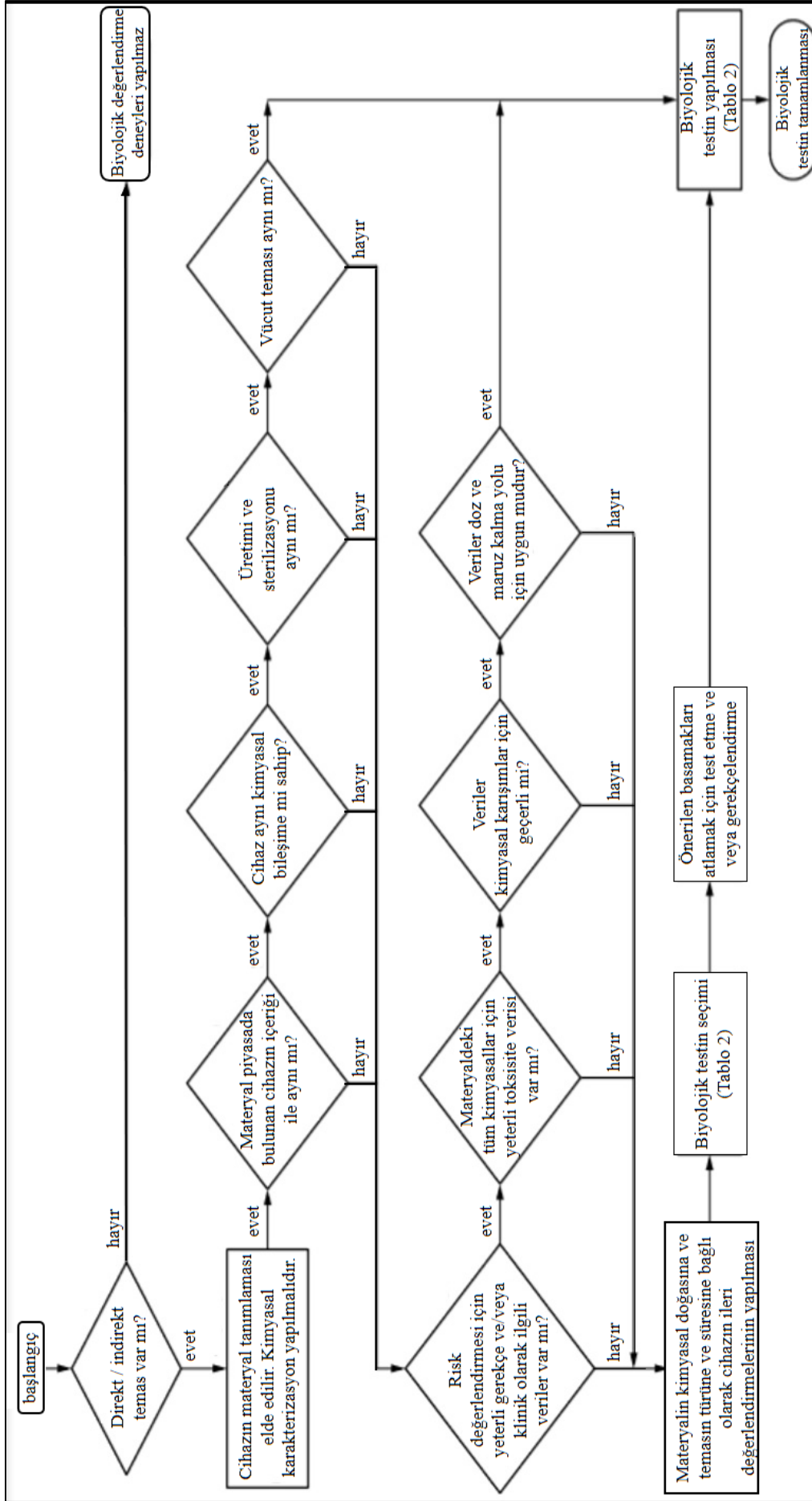
^a Çarpı işaretleri, biyolojik güvenlik değerlendirmesi için gerekli olacak testleri göstermektedir. Mevcut verilerin yeterli olduğu durumlarda ilave testler gerekli değildir.

Materyalin uygulanacağı bölgenin biyolojik cevap üzerinde büyük bir etkisi vardır. Materyalin mineralize ya da yumuşak dokuya yerleştirilecek olması, mukoza ile doğrudan ya da kısıtlı temasta olması, kemik, kan, tükürük ya da doku sıvıları ile direkt olarak ya da herhangi bir bariyer aracılığı ile temasta olması gibi faktörler, materyale karşı gelişecek biyolojik cevapta etkin rol oynamaktadır. Vücutta kalma ve temas süreleri de benzer şekilde materyale karşı gelişecek olan biyolojik cevabı etkilemektedir. Örneğin dental uygulamalarda kullanılan herhangi bir ölçü maddesinin ağız ortamında bulunduğu kısa süre içerisinde alerjik bir reaksiyona neden olabileceği, bununla birlikte, bu kısa sürede toksik ve mutajenik etkiler göstermesinin beklenmeyeceği bildirilmektedir (224).

2.4.1. İritasyon (Tahriş) Deneyleri

İritasyon, bir maddenin/materyalin tek, tekrarlanan veya sürekli uygulanmasına karşı özgül olmayan lokalize inflamatuvar tepki olarak tanımlanmıştır (225).

İritasyon deneyleri, tıbbi cihazların, materyallerin ve/veya bunların ekstraktlarının iritasyon potansiyelini, tahmin etmek için kullanılmaktadır. Bu sayede kaşıntı, şişlik ve yangı gibi meydana gelebilecek geri dönüşebilir hasarın seviyesi saptanabilmektedir. Bu deneyler bir modelin, cilt, göz ve mukoza zarı gibi uygulama için uygun bir bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Yapılacak testler, bölgeye (cilt, göz, mukoza) ve maruz kalma süresine uygun olarak planlanmaktadır (225).



Şekil 6. Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesinde sistematik yaklaşımın özeti (12)

İntrakutanöz reaktivite testleri, dokunun tıbbi cihaz ekstraktlarına lokalize reaksiyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu testler, dermal veya mukozal testlerle iritasyonun belirlenmesinin uygun olmadığı durumlarda (tıbbi cihazın implante edildiği ya da kan teması olduğu durumlar) uygulanabilmektedir (226).

Geliştirilmekte ve araştırılmakta olan bir tıbbi cihazın içerisindeki bazı malzemeler deneye tabi tutulmuş ve cilt veya mukoza iritasyonu ile duyarlılık potansiyeli dokümente edilmiş olabilir. Ancak diğer materyaller ve kimyasal bileşenler dokularla temas ettiklerinde ters etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle yeni bir tıbbi cihaz, piyasaya sürülmeden önce içeriğindeki her bir bileşenin potansiyel ters etkiler yönünden değerlendirilmesi gerektiği bilinmektedir (12).

Bileşimlerin detayları ile ilgili verilerin mevcut olmadığı ya da sadece nitel bilgilerin mevcut olduğu durumlarda, bunun yanı sıra üretim sırasında yeni ya da bilinmeyen maddelerin geliştirilmesi planlandığında materyalin analizinin yapılması gerekmektedir. Araştırmadaki materyaller için uygun analitik yöntemler kullanılması gerektiği, tüm analitik tekniklerin doğrulanması, geçerli kılınması ve rapor edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Çalışılan materyalin pH değerinin bilinmediği durumlarda deneylerden önce ölçüm yapılması gerekmektedir. Materyalin kimyasal analizi (nitel ve nicel) yararlı bilgi sağlamaktadır. Bu sayede, materyal içerisinde bulunan bileşiklerin iritasyon potansiyeli ile ilgili bilgi elde edilebilirken, materyalin kimyasal analizinin iritasyon deneyini gereksiz kılan sonuçlar verebileceği de dikkate alınmalıdır (227).

Deney numunesinin pH değerinin ≤ 2 veya $\geq 11,5$ olduğu durumlarda materyal iritan olarak beyan edilir ve daha fazla deney yapılması gerekmez. Bununla birlikte, incelenen malzemenin asidik veya bazik olmasının, ciddi hasar oluşturma kapasitesiyle ilişkili olarak dikkate alınan tek faktör olmadığı ileri sürülmektedir. Malzemenin derişimi, temas süresi ile diğer birçok fiziksel ve kimyasal özelliklerin de önemli olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, birçok ürün iritasyon potansiyeline rağmen yaşamsal yararları veya öngörülen biyolojik etkinliğinden dolayı kabul görmektedir (227).

Geleneksel olarak tıbbi cihazlar insanlar üzerinde denenmeden önce biyolojik cevabın tahmin edilebilmesi için küçük hayvan deneyleri yapılmaktadır. Yakın geçmişte bu test yöntemlerine alternatif olarak *in vitro* deneyler de ilave edilmiştir. Bu yöndeki

ilerlemeye ve önemli çabaya rağmen bulgular, *in vivo* deney gereksiniminin tamamen önüne geçmek için halihazırda tatmin edici bir *in vitro* yöntemin geliştirilmediğini göstermektedir. Uygun olduğunda, hayvan deneyinden önce görüntüleme amaçları için *in vitro* yöntemlerin ön kullanımının teşvik edilmesi gerektiği bildirilmiştir (227,228).

2.4.1.1. *In vitro* iritasyon deneyleri

Uluslararası organizasyonlar, alternatif yöntemlerin araştırılmasına paralel olarak, iritasyon deneyleri için uygun *in vitro* yöntemler geliştirmek ve geçerli kılmak amacıyla çalışmaya devam etmektedir.

In vitro deri iritasyon testleri için valide edilmiş üç adet doku kültürü yöntemi bulunmaktadır:

2.4.1.1.a. EpiSkin™ deri iritasyon testi

Normal insan keratinositlerinden elde edilen *in vitro* olarak yeniden yapılandırılmış bir insan epidermidir. Bu modelin farklı gelişim evrelerini taklit edecek formları bulunmaktadır. Bu modelin histolojik olarak *in vivo* insan epidermisini taklit ettiği bildirilmektedir.

Kimyasalları sınıflandırmak ve tescillemek amacı ile tasarlanmış olan bu yöntem, Avrupa Alternatif Yöntemlerin Validasyonu Merkezi'nin (ECVAM) akut deri iritasyonuna yönelik *in vitro* testlerle ilgili uluslararası validasyon çalışmasının bir parçası olarak onaylanmıştır. Ayrıca, EVCAM'nin bilimsel danışma komitesi (ESAC) tarafından bu yöntemin taraması yapılmış ve cilt iritasyon değerlendirmelerinde yasal onayların alınması için dikkate alınması tavsiye edilmiştir. Ardından bu test yöntem, Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından, test rehberi olarak kabul edilmiştir (No 439) (229,230).

2.4.1.1.b. EpiDerm™ deri iritasyon testi

Genel olarak Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi (RHE) olarak da bilinen EpiDerm™, özel olarak hazırlanmış doku kültürleri üzerinde kültürlenmiş normal, insan

kaynaklı epidermal keratinositlerden oluşan kullanıma hazır, özel bir üç boyutlu (3D) doku modelidir (231).

Bu yöntem bir dizi validasyon çalışmasında doğrulanmış olup, deri iritasyon potansiyeli için eşdeğer tüm *in vivo* test yöntemlerinin yerini alabileceği ECVAM ve OECD tarafından onaylanmıştır (229).

2.4.1.1.c. SkinEthic™ deri iritasyon testi:

Kimyasal bir ortamda, hava-sıvı arayüzündeki etkisiz bir polikarbonat filtre üzerinde kültürlenmiş normal, insan kaynaklı keratinositlerinden *in vitro* olarak yeniden yapılandırılmış bir insan epidermidir. Bu modelin farklı gelişim evrelerini taklit edecek formları bulunmaktadır (232).

Bu yöntem ECVAM ve OECD tarafından onaylanmış olup yasal olarak *in vivo* (tavşan) deri iritasyon deneylerinin yerini almıştır (229).

In vitro deri iritasyon deney modellerine benzer olarak, oküler, oral mukoza, rektal, penil ve vajinal iritasyon deneyleri için de doku kültürleri üretilmiş olsa da henüz validasyonları tamamlanmadığından bu modeller hayvan deneylerinin yerini alamamıştır.

2.4.1.2. Oral mukoza iritasyon deneyleri

İlaçların geliştirilmesinde öncelikli olarak uygulama alanındaki bölgesel toleransın değerlendirilmesi gerekmektedir. Oral mukoza, ağız yoluyla uygulanan tıbbi ürünlerde bulunan etken maddelere veya ilaca uygun şekil ya da kıvam kazandırmak amacıyla ilave edilen etkisiz ara maddelere (eksipiyan) doğrudan maruz kalmaktadır. Bu nedenle, ağız boşluğunda uygulanması planlanan ürünlerin oral mukozaya karşı iritasyon potansiyelini araştırmak amacıyla klinik olmayan iritasyon deneylerinin yapılması gereklidir.

Oral mukoza iritasyon deneyleri, hamsterların yanak kesesi mukozasına materyalin temas ettirilmesi veya uygulama çubukları ile sürülmesi gibi yöntemlerle

yaygın bir şekilde yapılmıştır (233–235). Geçmişte fareler (236,237), kobaylar (236,238), köpekler (239) ve tavşanlar (240) gibi diğer deney hayvanları da oral mukoza iritasyon deneylerinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, yakın geçmişe kadar ilaç endüstrisinde oral mukoza iritasyon deneylerini tarif eden herhangi bir yasal düzenleme yapılmamıştır ve değerlendirme yöntemi standartlaştırılmamıştır. Diş macunu ve gargara ürünlerinin iritasyon potansiyelini değerlendirmek için Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Kozmetik Üreticileri Derneği (CTFA) tarafından oral mukozal iritasyon deneylerinin yapılması önerilmiş ve bir klavuz yayımlanmıştır (CTFA Güvenlik Test Klavuzu, 1981). Bu klavuz, oral mukozal iritasyon deneylerinin köpekler, sıçanlar veya kobaylar üzerindeki uygulama yöntemlerini tarif etmektedir. Uluslararası Standardizasyon Teşkilatı (ISO) 1995 yılında iritasyon ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık deneyleri için bir standart yayımlamış, 2002 ve 2010 yıllarında revize edilmiş ve bugün kabul edilen son halini almıştır (ISO 10933-10:2010). Bu klavuz Türk Standartları Enstitüsü tarafından da kabul edilip yayımlanmıştır (TS EN ISO 10993-10:2010) (227).

Oral mukoza iritasyon deneyleri, oral mukoza ile temas etmesi planlanan materyaller için, bu materyallerin güvenlik verileri diğer yollarla elde edilemediği durumlarda kullanılmaktadır. Bu deney ile deneye tabi tutulan materyalin oral dokuda iritasyon oluşturma potansiyeli değerlendirilmektedir. Cilt veya göz için iritan olduğu saptanan ya da pH değeri ≤ 2 veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir materyal deneye tabi tutulmamalı ve ağız dokusu için potansiyel iritan olarak kabul edilmelidir (227).

İnsan oral mukozasının iritasyon potansiyeline sahip bir madde ile teması karışısında oluşturacağı tepkiyi belirlemek için en uygun modelin Suriye hamsterlarının yanak kesesi olduğu kabul edilmektedir (241,242). Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi standardına (ISO 10993-10) göre oral mukoza iritasyon testlerinde, deney malzemesini değerlendirmek için, en az üç adet, tek bir suştan akraba olmayan her iki cinsiyette sağlıklı genç yetişkin Suriye hamsterları kullanılması gerekmektedir. Uygun şartlar sağlanabildiğinde, her bir hayvanın boynuna normal beslenmeye ve solunuma izin verecek ancak, pamuk peleti çıkarmasını önleyecek şekilde uygun bir tasma takılması önerilmektedir (227).

Deneylerin yürütülmesi ve iritasyon deneylerinden elde edilen verilerin yorumlanmasında tıbbi cihazın yapısı, uygulama sıklığı, süresi ve doku ile temas şekli dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir. İritasyon deneyleri için kritik parametrelerden birinin, deney malzemelerinin hazırlanması olduğu vurgulanmıştır. Dokuya doğrudan temas etmesi planlanan katı deney malzemelerinin, uygun fiziksel forma (örneğin, tabaka, film) sahip katı malzemeler hiçbir değişiklik yapılmadan deneye tabi tutulması önerilmektedir. Deney ve negatif kontrol grubu örneklerinin 0,5 cm'den daha büyük kalınlıkta olmayacak şekilde, 2,5 cm x 2,5 cm ebadında, planlanan kullanıma yakın bir şekilde hazırlanması gerekmektedir. Negatif kontrol grubu örneklerinin ise, fiziksel olarak deney grubuna benzemesi ve iritan olmaması gerektiği bildirilmektedir. Katı deney malzemelerinin iritasyon deneyi için doğrudan hayvanın iç yanağa yerleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir (227).

Dokuya doğrudan temas etmesi planlanan sıvı deney malzemeleri, seyreltilmeden veya doğrudan çöktürme ile veya uygulanamaz ise uygun bir sıvı ile seyreltilerek deneye tabi tutulmalıdır. Deney malzemesinin özütlenmesi, seyreltilmesi veya ıslatılması gerekiyorsa iritan olmayan uygun bir çözücü tercih edilmelidir. Sıvı deney malzemeleri veya özütler için pamuk bir pelet örnek içerisinde ıslatılır ve emilen hacim kaydedilir. Pamuk peletlerin iritasyon deneyi için doğrudan hayvanın iç yanağa yerleştirilmesi gerekmektedir.

Maruz kalma süresi malzemenin planlanan kullanım süresini yansıtmalı, ancak 5 dakikadan daha kısa olmamalıdır. Akut maruz kalma deneyleri için bu işlem 4 saat boyunca her saat başında tekrarlanmalıdır. Tekrarlanan maruz kalma deneyleri için ise uygulamaların sayısı, süresi ve aralığı, klinik planlanan maruz kalma sürelerine göre belirlenmelidir (227).

2.4.1.2.a. Makroskopik değerlendirme

Uygulama yapılan iç yanak, diğer iç yanak ve dahil edilmişse kontrol grubundaki hayvanların iç yanakları ışık kaynağı yardımı ile makroskopik olarak değerlendirilir. Dokudaki değişiklikler, tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi standardı (ISO 10993-10) referans alınarak sayısal olarak derecelendirilir (0: eritem yok, 1: çok hafif eritem, 2: belirgin eritem, 3: orta derecede eritem, 4: ciddi eritem).

Ortalama makroskopik değerlendirme derecesini tayin etmek amacıyla bu değerler toplanıp gözlem sayısına bölünür (227).

2.4.1.2.b. Histopatolojik değerlendirme

Son uygulamadan 24 saat sonra uygulama yapılan yanak dokuları cerrahi olarak çıkarılır. Alınan dokular mikroskopik inceleme için hazırlanır. Değişiklikler, tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi standardında (ISO 10993-10) belirtilen, mikroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak; mukoza epiteli (0: normal, 1: hücre rejenerasyonu/yassılaşması, 2: metaplazi, 3: fokal erozyon, 4: genel erozyon), lökosit infiltrasyonu (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin), vasküler konjesyon (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) ve ödem (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) açısından değerlendirilerek sayısal olarak derecelendirilir. Ortalama mikroskopik değerlendirme derecesini tayin etmek amacıyla bu değerler toplanıp gözlem sayısına bölünür.

İritasyon indeksini belirlemek amacıyla kontrol grubu ortalaması deney grubu ortalamasından çıkartılır ve çıkan sonuca göre tepki tanımı belirlenir (227).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Dizaynı

Bu çalışma, Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi - Bölüm 10: Tahriş ve Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Deneyleri Klavuzu (ISO 10993-10: 2010) referans alınarak planlanmış bir oral mukoza iritasyon deneyidir. Geliştirilen formülasyonların klinik ortamda belirli aralıklarla uygulanması planlandığından ve mukoza ile temas süresi 24 saatten az olacağından, çalışmada akut maruz kalma prosedürleri uygulandı.

Çalışma Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 27.07.2018 tarihinde alınan 677 etik kurul karar numarası onayı (Ek-2) ile Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) yürütüldü.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma, tek bir suştan akraba olmayan, sağlıklı, genç yetişkin, 8 haftalık, ortalama 50 gram ağırlığında 9 adet dişi Suriye hamsteri üzerinde yürütüldü (Şekil 7). Tüm hamsterlar, 21 °C sıcaklıkta, %40-60 nem oranında, sürekli ılık ve temiz hava olan bir odada, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusta üçerli olarak metal kafeslerde barındırıldı. Hamsterların beslenmesinde herhangi bir gıda kısıtlaması uygulanmadı ve kafeslerde sürekli ve sınırsız olarak su bulunduruldu. Hamsterlar rastgele seçilerek üç gruba ayrıldı.

3.3. Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonun Hazırlanması

Çalışmada *in vivo* iritasyon etkisi değerlendirilecek olan, lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel formülasyonları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ve Farmakognazi Anabilim Dalı Laboratuvar'ında hazırlandı. Formülasyonlarda yer alan materyaller, markaları ve üretici firma isimleri Tablo 3'de listelenmiştir.



Şekil 7. Suriye Hamsteri

3.3.1. Poloksamer 407 Hidrojelin Hazırlanması

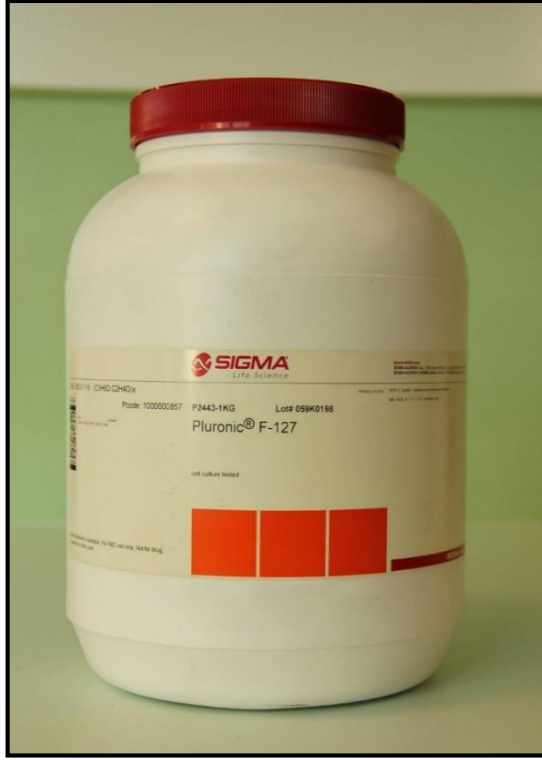
10 g Pluronic® F-127 (Sigma®-Aldrich, BASF Corp, USA) (Şekil 8) başta 10 ml saf su ile çözülüp +4°C'de birkaç saat bekletildikten sonra saf su ilave edilerek çözelti 100 ml'ye tamamlandı ve %10 ağırlık/hacim (a/h) poloksamer 407 polimerinin hidrojel formülasyonu elde edildi.

3.3.2. Lizozim ve Laktoferrin İçeren Formülasyonun Hazırlanması

Formülasyon, 2 mg Lizozim (L6876, Sigma®-Aldrich, USA) ve 1 mg Laktoferrin'in (L0520, Sigma®-Aldrich, USA) (Şekil 9), 2 ml %10'luk (a/h) poloksamer 407 polimeri ile vorteks cihazı yardımıyla karıştırılması ile hazırlandı (Şekil 10).

Tablo 3. Formülasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları, markaları ve üretici firmaları

MATERYAL	TOPLAM MİKTAR	FONKSİYON	MARKA ve ÜRETİCİ FİRMA
Lizozim	1 mg/ml	Antibakteriyel	L6877- 1 G Sigma®-Aldrich, USA
Laktoferrin	0,5 mg/ml	Antibakteriyel	L0520- 100 MG Sigma®-Aldrich, USA
Poloksamer 407	%10 (a/h)	Taşıyıcı ve çözücü ajan	Pluronic F-127 Sigma®-Aldrich, USA



Şekil 8. Pluronic® F-127 (Sigma®-Aldrich, BASF Corp, USA)



Şekil 9. Tavuk yumurtasından elde edilmiş Lizozim (L6876-1g, Sigma®-Aldrich, USA) ve insan sütünden elde edilmiş Laktoferrin (L0520-100 mg, Sigma®-Aldrich, USA)



Şekil 10. Çalışmada kullanılan yellowline TTS 2 vorteks cihazı

3.4. Kontrol Grupları

Bu çalışmada uygunsuz koşullar nedeniyle iritasyon oluşmayacağını kontrolü amacıyla negatif kontrol grubu olarak steril apirojen distile su (Koçak Farma, İstanbul, Türkiye), referans ürün olarak ise klorheksidin jel (Cervitec® Gel - Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) kullanıldı (**Şekil 11**).

Oral mukoza iritasyon deneyinde kullanılacak formülasyonlar Tablo 4'de gösterildi.



Şekil 11. Çalışmada kullanılan steril distile su ve klorheksidin jel

Tablo 4. Oral mukoza iritasyon etkisi değerlendirilecek formülasyonlar, içerikleri ve kodları

KODLAR	FORMÜLASYONLAR	İÇERİKLERİ
Grup 1	Steril distile su	Apirojen steril distile su
Grup 2	Cervitec® Gel - Ivoclar Vivadent Klorheksidin jel	Klorheksidin diglukonat (%0,2)
Grup 3	Lizozim + Laktoferrin + Pluronic® F-127 hidrojel	Lizozim (1 mg/ml) + Laktoferrin (0,5 mg/ml) + Poloksamer 407 (%10 a/h)

3.5. Oral mukoza iritasyon deneyinin uygulanması

Oral mukoza iritasyon deneyi ISO 10993-10:2010 referans alınarak uygulandı. Her bir deney grubu için 3 Suriye hamsteri kullanıldı. Uygulamadan önce hayvanların ağız içi ve yanak keseleri steril serum fizyolojik ile yıkanıp yemek artıkları uzaklaştırıldı (**Şekil 12**) ve ışık kaynağı altında mukoza incelendi (**Şekil 13**).

Deney malzemelerinin eşit miktarda kullanımını sağlayabilmek için, numunelerin emdirileceği pamuk peletler hamsterlarının yanak keslerine uygun olacak büyüklük denenerak saptandı, buna göre eşit büyüklükte peletler hazırlandı. Hazırlanan peletlerin, pamuk dışına taşma olmadan emebilecekleri maksimum numune miktarı ön denemeler ile 300 µl olarak tespit edildi. Bu sayede mikropipetler kullanılarak her hayvana eşit hacimde (300 µl) ilaç uygulanabilmesi sağlandı.

Standart boyutlarda hazırlanmış olan üç pamuğa 300'er µl, taze hazırlanmış, lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 (%10) içeren hidrojel emdirildi ve hayvanların sol yanak kesesine yerleştirildi (**Şekil 14**). Sağ yanak kesesine uygulama yapılmadı. Pamuklar yerleştirildikten sonra hayvanlara tasma uygulandı ve el hareketi ile pamukları çıkarmaları engellendi (**Şekil 15**). 5 dakika boyunca mukoza ile direkt temasta bırakılan numune emdirilmiş pamuklar 5 dakikanın sonunda çıkarıldı ve mukoza makroskopik olarak değerlendirilip değişiklikler Tablo 5'e göre skorlandı (**Şekil 16**). Bu uygulama 4 saat boyunca her saat başı tekrarlandı. Makroskopik değerlendirme her uygulama sonunda ve son uygulamadan 24 saat sonra tekrarlandı.

Çalışmada yardımcı materyal olarak; ışık kaynağı (illüminatör), pamuk peletler, mikropipetler ve belirlenen hacimlerde tek kullanımlık uçlar, presel, kronometre ve tasma kullanıldı (**Şekil 17**).

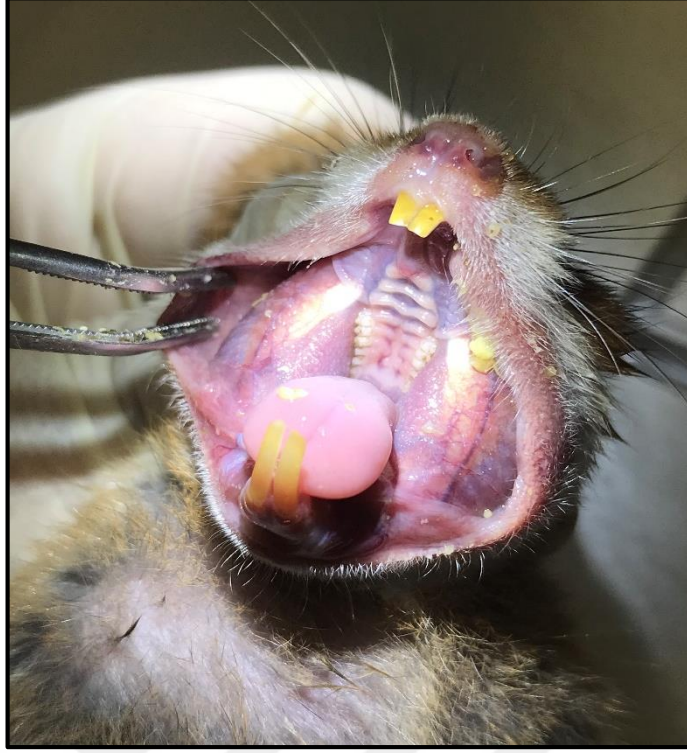
Çalışma basamakları akış şemasında belirtilmiştir (Şema 1).

Tablo 5. Oral mukoza iritasyon deneylerinde makroskopik değerlendirme için derecelendirme sistemi

Reaksiyon - Eritem ve skar oluşumu	Sayısal derecelendirme
Eritem yok	0
Çok hafif eritem (zorlukla farkedilebilir)	1
Belirgin eritem	2
Orta derecede eritem	3
Ciddi eritem (pancar gibi kırmızı) ile eritemin derecelendirilmesini önleyen skar oluşumu arasında	4



Şekil 12. Ağız iinin steril serum fizyolojik ile yıkanıp yemek artıklarının uzaklaştırılması



Şekil 13. Deney öncesi oral mukozanın makroskopik değerlendirmesi



Şekil 14. Hayvanların yanak kesesine numune emdirilmiş pamukların yerleştirilmesi



Şekil 15. Hayvanlara tasma uygulaması

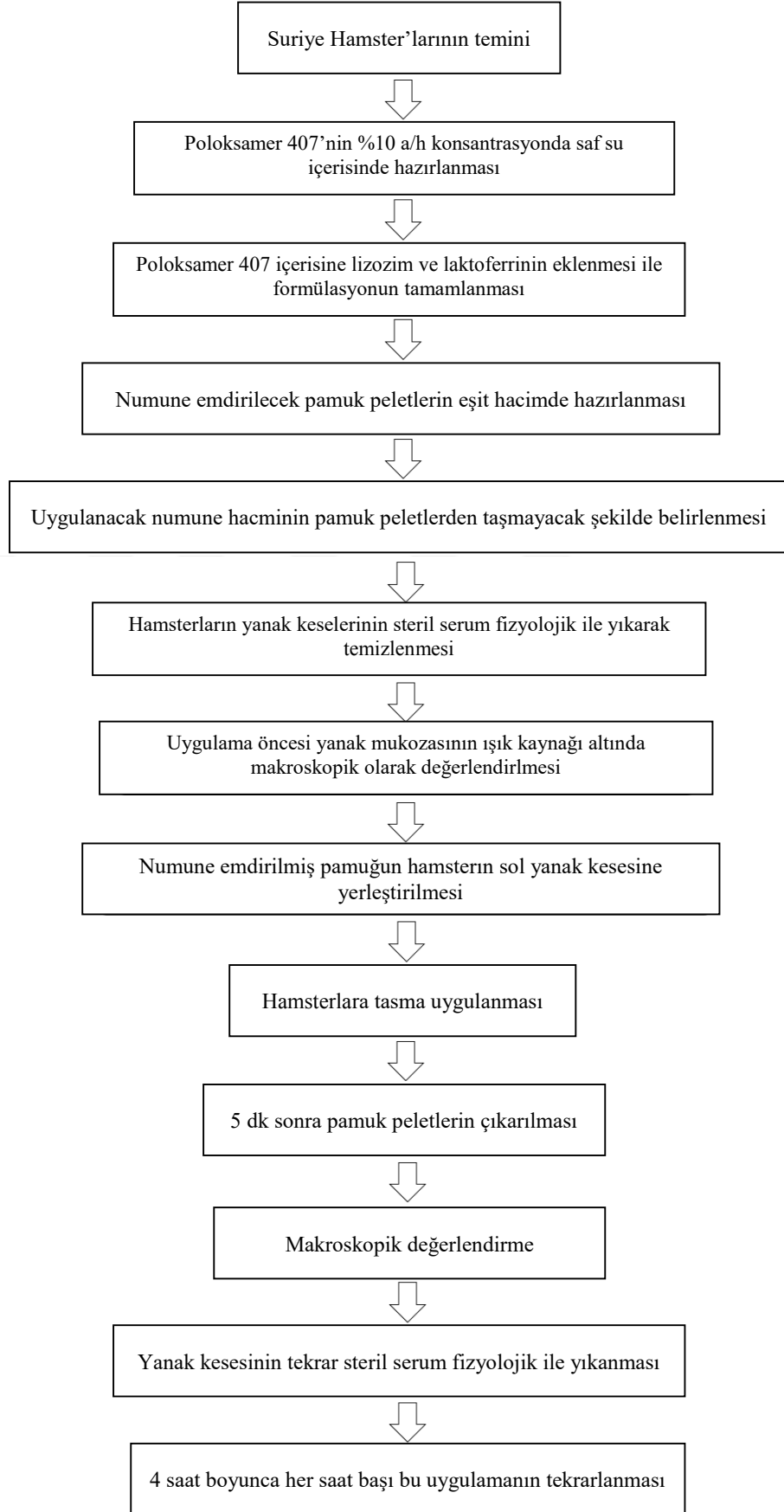


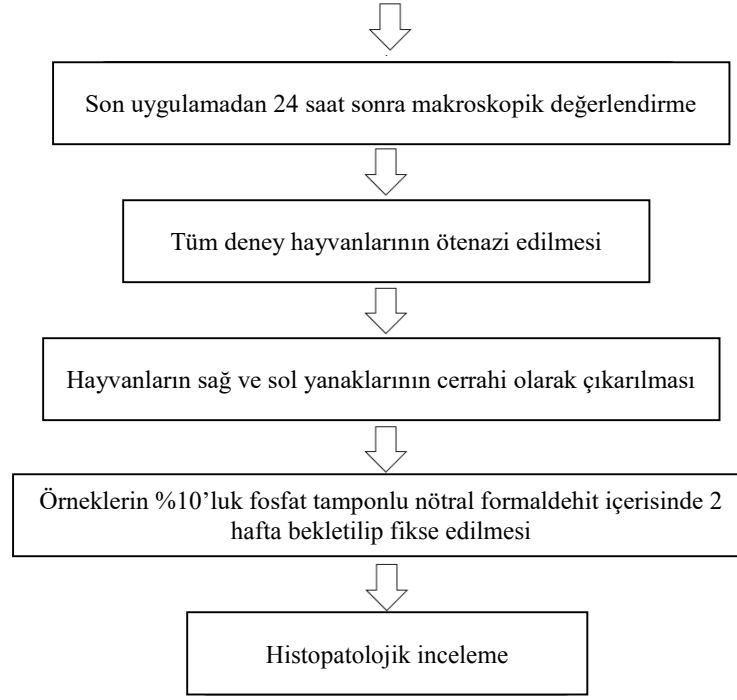
Şekil 16. Uygulama sonrası oral mukozanın makroskopik incelemesi



Şekil 17. Kullanılacak materyaller ve deney ortamının hazırlanması

Şema 1. Çalışmanın Akış Şeması (oral mukoza iritasyon deneyi)



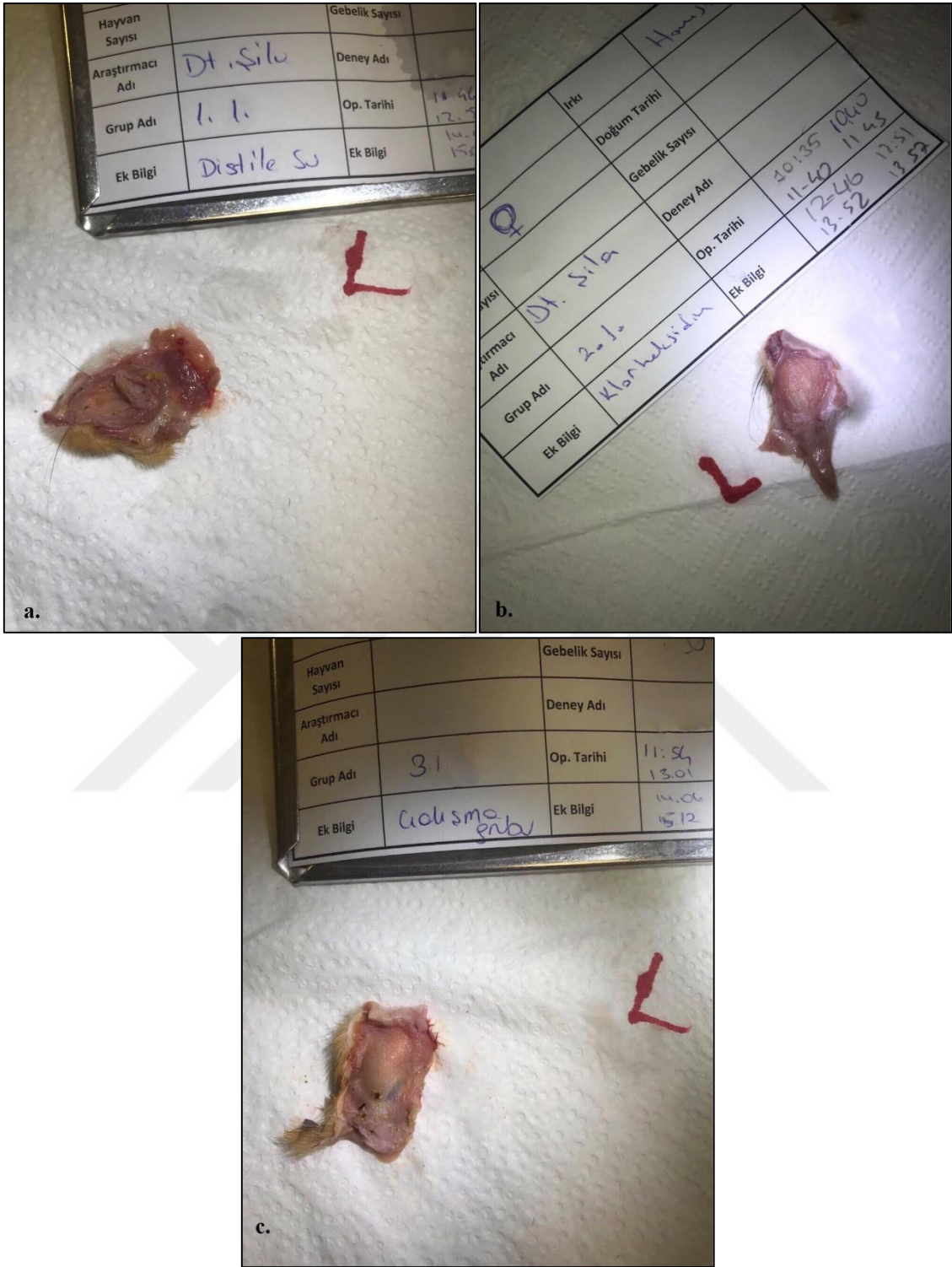


3.6. Histopatolojik İnceleme

Son uygulamadan 24 saat sonra makroskopik değerlendirme yapıldı ve ardından tüm deney hayvanları yüksek doz anestezi ile ötenazi edildi. Her bir hamsterın sağ ve sol yanağının tümü cerrahi olarak çıkarıldı (**Şekil 18**) ve örnekler histopatolojik değerlendirme için numaralandırılmış kaplardaki %10'luk fosfat tamponlu nötral formaldehit (pH=7,4) içerisine konulup, dokuların fiksasyonunu sağlamak amacı ile iki hafta boyunca bu solüsyonda bekletildi (**Şekil 19**). Fiksasyonun ardından rutin doku takibinden geçirilen parçalardan parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan elde edilen üç mikron kalınlığındaki kesitler Hematoksilen - Eozin (H&E) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Örnekler, ISO 10993-10'de (227) belirtilen mikroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak, mukoza epiteli (0: normal, 1: hücre rejenerasyonu/yassılaştırması, 2: metaplazi, 3: fokal erozyon, 4: genel erozyon), lökosit infiltrasyonu (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin), vasküler konjesyon (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) ve ödem (0:yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) açısından değerlendirildi (Tablo 6). Histopatolojik inceleme İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı'nda yürütüldü.

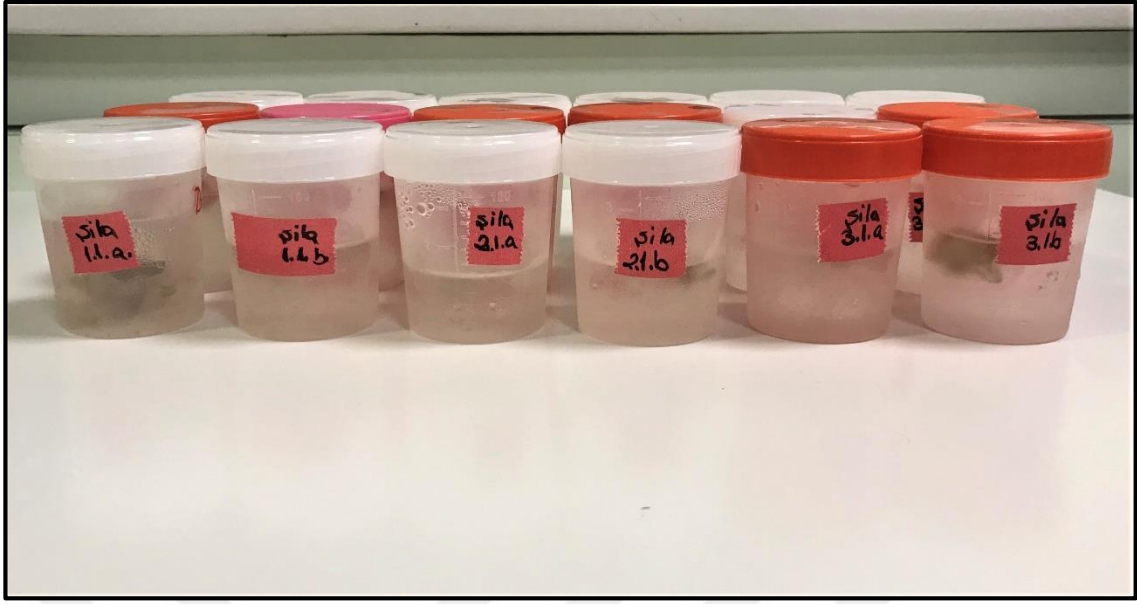
Tablo 6. Oral mukoza iritasyon deneylerinde mikroskopik değerlendirme için derecelendirme sistemi (227)

Reaksiyon	Sayısal Derecelendirme
Epitel	
Normal, sağlam	0
Hücre dejenerasyonu veya yassılaşması	1
Metaplazi	2
Fokal erozyon	3
Genel erozyon	4
Lökosit İnfiltrasyonu (her yüksek nüfuz alanı için)	
yok	0
en az (25'den daha az)	1
hafif (26 - 50)	2
orta (51 - 100)	3
belirgin (100'den daha büyük)	4
Vasküler Konjesyon	
yok	0
en az	1
hafif	2
orta	3
belirgin, damarların yıkımı ile birlikte	4
Ödem	
yok	0
en az	1
hafif	2
orta	3
belirgin	4



Şekil 18. Cerrahi olarak çıkarılmış yanak dokuları;

a. distile su uygulanmış hayvanların yanak dokusu, b. klorheksidin jel uygulanmış hayvanların yanak dokusu, c. lizozim, laktoferrin ve poloksamer içeren hidrojel uygulanmış hayvanların yanak dokusu



Şekil 19. Örneklerin %10'luk fosfat tamponlu nötral formaldehit içerisinde fikse edilmesi

Her deney grubunun ortalama skorunun kontrol grubunun ortalama skorundan çıkarılması ile iritasyon indeksi hesaplanmış, ardından ISO 10993-10'de (227) belirtilen iritasyon indeksi çizelgesi referans alınarak tepki tanımı belirlenmiştir. İritasyon indeksinin 0 olarak hesaplanması iritasyon oluşturmadığını, 1-4 hesaplanması en az, 5-8 hesaplanması hafif, 9-11 hesaplanması orta, 12-16 hesaplanması ciddi derecede iritasyon oluşturduğunu ifade etmektedir (Tablo 7).

Tablo 7. İritasyon indeksi

Ortalama derece	Tepki tanımı
0	Yok
1-4	En az
5-8	Hafif
9-11	Orta
12-16	Ciddi

4. BULGULAR

Tablo 8’de her grup için 3 adet Suriye hamsterı üzerinde yapılmış olan akut oral mukoza iritasyon deneyinin sonucunda steril distile su, klorheksidin ve deney grubunun birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü uygulamalarından hemen sonra ve son uygulamadan 24 saat sonra elde edilen makroskopik skorlar ve ortalama skorlar yer almaktadır.

Makroskopik değerlendirme sonucunda, uygulama yapılan her üç grupta da herhangi bir dönemde eritem ya da skar oluşumu izlenmemiştir (Tablo 8).

Tablo 8: Makroskopik değerlendirme skorları

Grup	Grup1			Grup 2			Grup 3		
	Steril distile su			Klorheksidin jel			Lizozim + Laktoferrin + poloksamer 407 hidrojel		
Hayvan numarası	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
1. uygulama	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. uygulama	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. uygulama	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. uygulama	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Son uygulamadan 24 saat sonra	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ortalama skor	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Yanak mukozası, ISO 10993-10’de (227) belirtilen makroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak, eritem ve skar oluşumu açısından (0: eritem yok, 1: çok hafif eritem, 2: belirgin eritem, 3: orta derecede eritem, 4 ciddi derecede eritem) değerlendirilmiştir. Ortalama skor toplam skorun üçe bölünmesi ile hesaplanmıştır.

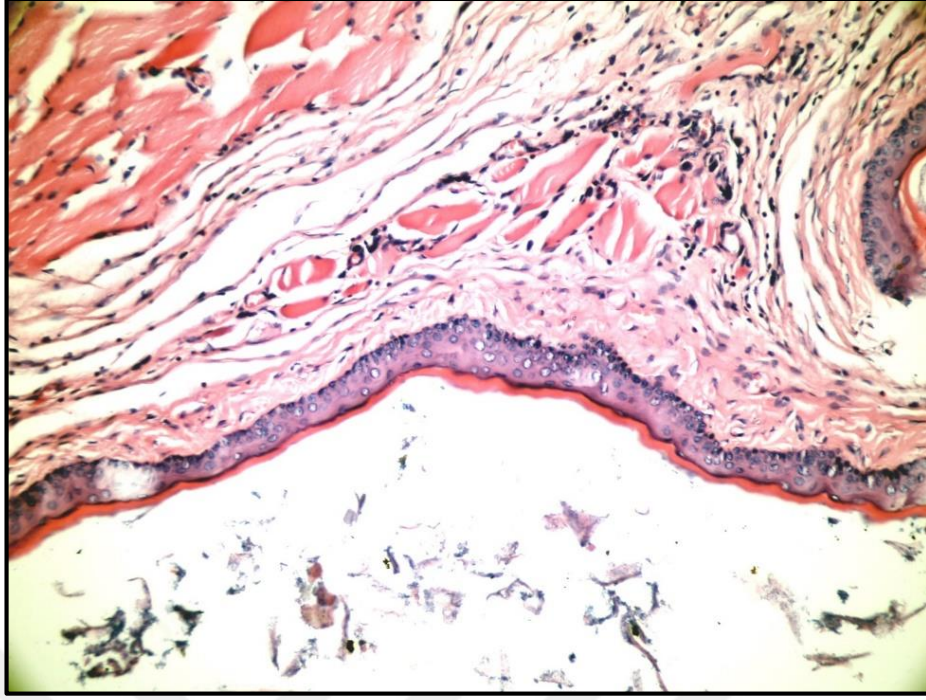
Steril distile su uygulanan grubun histopatolojik inceleme sonuçları Tablo 9’de verilmiştir. İnceleme sonucunda, tüm örneklerin uygulama yapılmayan sağ ve uygulama yapılmış olan sol yanak dokularında yüzeyde doğal yapıda ketinize epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler izlenmiştir. Epitel hücrelerinde yassılaşıma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişimi görülmemiştir. Örneklerin hiçbirinde sağ ve sol yanak dokusunda lökosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ya da ödem gözlemlenmemiştir (**Şekil 20**). Üç örneğin aldığı skorların toplanması ve hayvan sayısına bölünmesi ile ortalama skor 0 olarak bulunmuştur.

Tablo 9: Steril distile su uygulanan grubun histopatolojik değerlendirme skorları

Grup		Grup 1 Steril distile su					
		1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
Uygulama bölgesi		Sağ	Sağ	Sağ	Sol	Sol	Sol
Değerlendirme alanı	Epitel	0	0	0	0	0	0
	Lökosit infiltrasyonu	0	0	0	0	0	0
	Vasküler konjesyon	0	0	0	0	0	0
	Ödem	0	0	0	0	0	0
Toplam skor		0			0		
Ortalama skor		0			0		

Örnekler, ISO 10993-10’de (227) belirtilen mikroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak, mukoza epiteli (0: normal, 1: hücre rejenerasyonu/yassılaşıması, 2: metaplazi, 3: fokal erozyon, 4: genel erozyon), lökosit infiltrasyonu (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin), vasküler konjesyon (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) ve ödem (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) açısından skorlanmıştır.

Ortalama skor, toplam skorun üçe bölünmesi ile hesaplanmıştır.



Şekil 20. Steril distile su uygulanan grubun histolojik görüntüsü

Yüzeyde doğal yapıda ketinize çok katlı yassı epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler (H&E x 200).

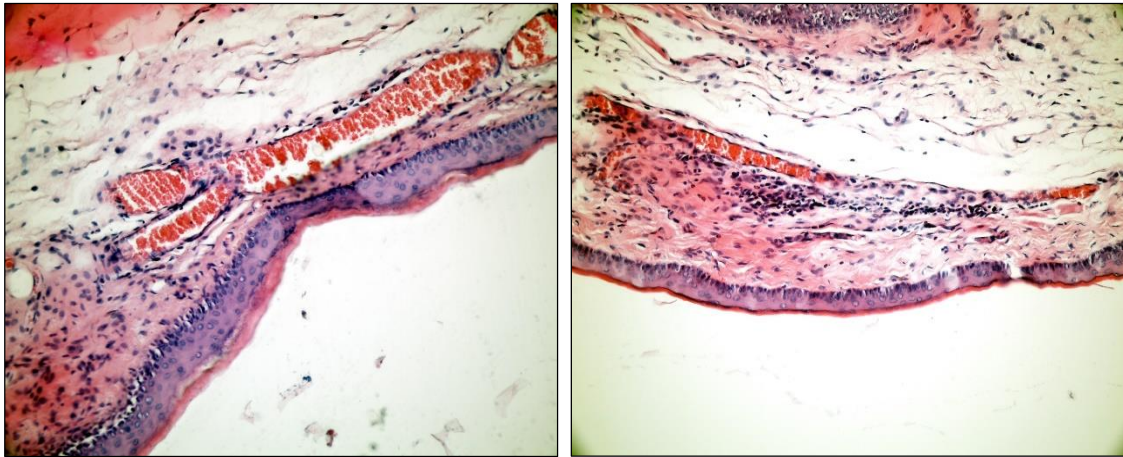
Klorheksidin jel uygulanan grubun histopatolojik inceleme sonuçları Tablo 10'da verilmiştir. İnceleme sonucunda, tüm örneklerin uygulama yapılmayan sağ yanak dokularında epitelin normal olduğu, epitel hücrelerinde yassılaşıma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişmediği görülmüştür. Örneklerin hiç birinde sağ yanak dokusunda lökosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ya da ödem gözlemlenmemiştir. Birinci ve ikinci hayvanın klorheksidin jel uygulanmış sol yanak dokusunda yüzeyde doğal yapıda keratinize çok katlı yassı epitel altında bağ doku içinde hafif derecede lökosit infiltrasyonu izlenmiştir. Lökosit sayısı 25'den az olduğundan 1 ile skorlanmıştır. 3. örnekte lökosit infiltrasyonu izlenmemiştir. Örneklerin hiç birinde sol yanak dokusunda vasküler konjesyon gözlemlenmemiştir. Birinci ve ikinci örneğin bağ dokusunda interstisyel alanda ödem oluşumu izlenmiştir, üçüncü hayvanda ise ödem gelişmediği görülmüştür (**Şekil 21**). Birinci hayvanda en az, ikinci hayvanda orta derecede ödem olduğundan sırası ile 1 ve 3 ile skorlanmışlardır. Üç örneğin aldığı skorların toplanması ve hayvan sayısına bölünmesi ile ortalama skor 2 olarak bulunmuştur.

Tablo 10: Klorheksidin jel uygulanan grubun histopatolojik değerlendirme skorları

Grup	Grup 2 Klorheksidin jel					
	2.1	2.2	2.3	2.1	2.2	2.3
Hayvan numarası	2.1	2.2	2.3	2.1	2.2	2.3
Uygulama bölgesi	Sağ	Sağ	Sağ	Sol	Sol	Sol
Değerlendirme alanı						
Epitel	0	0	0	0	0	0
Lökosit infiltrasyonu	0	0	0	1	1	0
Vasküler konjesyon	0	0	0	0	0	0
Ödem	0	0	0	1	3	0
Toplam skor	0			6		
Ortalama skor	0			2		

Örnekler, ISO 10993-10'de (227) belirtilen mikroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak, mukoza epitel (0: normal, 1: hücre rejenerasyonu/yassılaştırması, 2: metaplazi, 3: fokal erozyon, 4: genel erozyon), lökosit infiltrasyonu (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin), vasküler konjesyon (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) ve ödem (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) açısından skorlanmıştır.

Ortalama skor, toplam skorun üçe bölünmesiyle hesaplanmıştır.



Şekil 21. Klorheksidin jel uygulanan grubun histolojik görüntüsü

Yüzeyde doğal yapıda keratinize çok katlı yassı epitel altında bağ doku içinde hafif derecede lökosit infiltrasyonu ve bağ dokusunda interstisyel alanda ödem (H&E x 200).

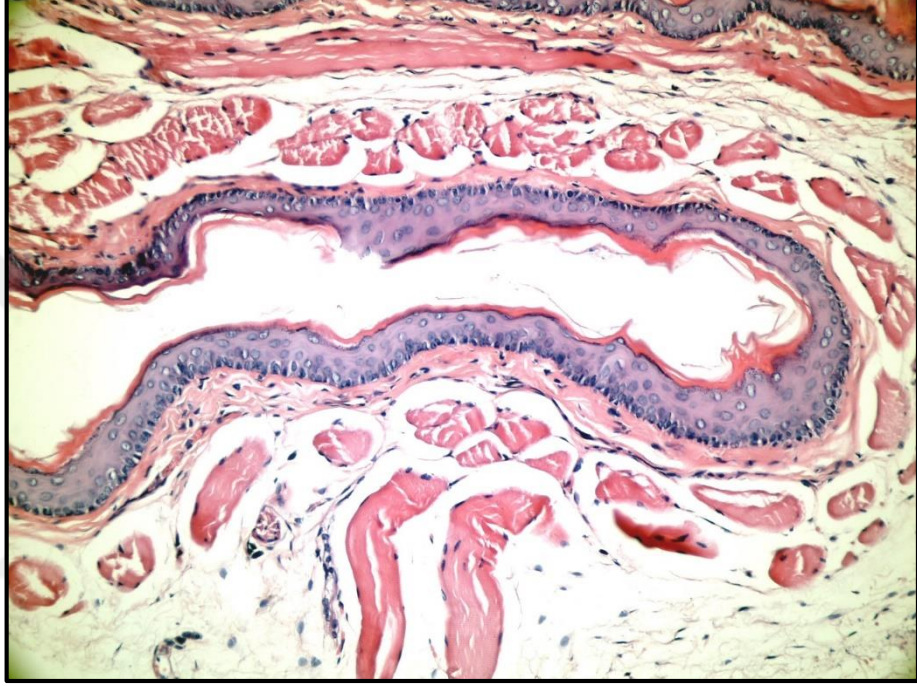
Lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı olarak poloksamer 407 içeren yeni formülasyonun uygulandığı grubun histopatolojik inceleme sonuçları Tablo 11’de verilmiştir. İnceleme sonucunda, tüm örneklerin uygulama yapılmayan sağ ve uygulama yapılmış olan sol yanak dokularında yüzeyde doğal yapıda ketinize epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler izlenmiştir. Epitel hücrelerinde yassılaşıma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişimi görülmemiştir. Örneklerin hiç birinde sağ ve sol yanak dokusunda lökosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ya da ödem gözlemlenmemiştir (**Şekil 22**). Üç örneğin aldığı skorların toplanması ve hayvan sayısına bölünmesi ile ortalama skor 0 olarak bulunmuştur.

Tablo 11: Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 uygulanan grubun histopatolojik incelemesi

Grup	Grup 3 Lizozim + laktoferrin + poloksamer 407					
	3.1	3.2	3.3	3.1	3.2	3.3
Uygulama bölgesi	Sağ	Sağ	Sağ	Sol	Sol	Sol
Değerlendirme alanı						
Epitel	0	0	0	0	0	0
Lökosit infiltrasyonu	0	0	0	0	0	0
Vasküler konjesyon	0	0	0	0	0	0
Ödem	0	0	0	0	0	0
Toplam skor	0			0		
Ortalama skor	0			0		

Örnekler, ISO 10993-10’de (227) belirtilen mikroskopik değerlendirme prosedürleri referans alınarak, mukoza epiteli (0: normal, 1: hücre rejenerasyonu/yassılaşıması, 2: metaplazi, 3: fokal erozyon, 4: genel erozyon), lökosit infiltrasyonu (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin), vasküler konjesyon (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) ve ödem (0: yok, 1: en az, 2: hafif, 3: orta, 4: belirgin) açısından skorlanmıştır.

Ortalama skor, toplam skorun üçe bölünmesiyle hesaplanmıştır.



Şekil 22. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 uygulanan grubun histolojik görüntüsü
Yüzeyde doğal yapıda ketinize çok katlı yassı epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler (H&E x 100)

Steril distile su ile klorheksidin jel uygulamaları karşılaştırıldığında klorheksidin jelin iritasyon indeksi 2 olarak hesaplanmış ve steril distile suya göre daha iritan olduğu ancak bu etkinin en az düzeyde olduğu belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 7. Steril distile su ve klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması

	Grup 1 Steril distile su	Grup 2 Klorheksidin jel
Ortalama skor	0	2
İritasyon indeksi	-	2
Tepki tanımı	-	En az

İritasyon indeksi, her deney grubunun ortalama skorunun kontrol grubundan çıkarılması ile hesaplanmıştır.

Tepki tanımı, ISO 10993-10'de belirtilen iritasyon indeksi çizelgesi referans alınarak belirlenmiştir.

Steril distile su ve lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel uygulamalarının iritasyon etkileri karşılaştırıldığında yeni formülasyonun iritasyon indeksi 0 olarak hesaplanmıştır. Yeni geliştirilmiş hidrojel formülasyonunun iritasyon düzeyinin steril distile su ile eşit olduğu görülmüştür (Tablo 13).

Tablo 8. Steril distile su ve lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 hidrojel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması

	Grup 1 Steril distile su	Grup 3 Lizozim + laktoferrin + poloksamer 407 hidrojel
Ortalama skor	0	0
İritasyon indeksi	-	0
Tepki tanımı	-	Yok

İritasyon indeksi, her deney grubunun ortalama skorunun kontrol grubundan çıkarılması ile hesaplanmıştır.

Tepki tanımı, ISO 10993-10'de belirtilen iritasyon indeksi çizelgesi referans alınarak belirlenmiştir.

Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel ile klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkileri karşılaştırıldığında klorheksidin jelin iritasyon indeksi 2 olarak hesaplanmıştır. Yeni geliştirilmiş hidrojel formülasyon iritasyon oluşturmazken, klorheksin jel uygulamasının lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojele göre daha iritan olduğu ancak bu etkinin en az düzeyde olduğu belirlenmiştir (Tablo 14).

Tablo 9. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 hidrojel ve klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkilerinin karşılaştırılması

	Grup 3 Lizozim + laktoferrin + poloksamer 407 hidrojel	Grup 2 Klorheksidin jel
Ortalama skor	0	2
İritasyon indeksi	-	2
Tepki tanımı	-	En az

İritasyon indeksi, her deney grubunun ortalama skorunun kontrol grubundan çıkarılması ile hesaplanmıştır.

Tepki tanımı, ISO 10993-10'de belirtilen iritasyon indeksi çizelgesi referans alınarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Günümüz diş hekimliğinde, antimikrobiyal ajanların kullanımı, çürük ve dişeti hastalıklarının önlenmesinde sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir. Mekanik temizliğe ek olarak antimikrobiyal ajanların kullanımının, mikrobiyal dental plağın hem miktarını azalttığı hem de yapısını bozduğu ve bu sayede diş çürüğü ve gingivitis önlemede başarılı etki gösterdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (118,119,243,244).

Diş hekimliğinde en sık tercih edilen antimikrobiyal ajanlar, florid ve klorheksidin preparatlarıdır. Floridin, bakterilerin metabolik faaliyetlerini inhibe ederek asit üretimini ve EPS yapısını engellediği gösterilmiştir, ancak gelişmekte olan sürekli dişlerde fluorozis oluşturma ve sistemik toksisiteye neden olma gibi riskleri nedeniyle yutma refleksi gelişmemiş olan, 3 yaşın altındaki çocuklarda kullanımında, kullanılan preparatın florid konsantrasyonu, veriliş yolu ve miktarı önem kazanmaktadır (104). Antimikrobiyal etkisi pek çok çalışma ile gösterilmiş olan klorheksidin, antiplak ve antigingivitis ajanlar arasında altın standart olarak kabul edilmektedir ve jel ile vernik formlarının çocukların kullanımı için güvenli olduğu bildirilmiştir (125). Ancak klorheksidin preparatlarının uzun süreli kullanımı oral mukozada yan etkilere, dişlerde renklemeye, tat alma bozukluklarına ve diş taşı birikiminde artışa, ayrıca sitotoksik etkiye neden olabildiğinden, uzun dönem kullanımı da önerilmemektedir (125,129,245).

Bu nedenle son yıllarda antimikrobiyal etkiye sahip, florid ve klorheksidin preparatlarına alternatif yeni uygulamaların geliştirilmesi fikri ortaya çıkmıştır. Yakın zamanda antibakteriyel etkileri ve biouyumlulukları *in vitro* deneylerle gösterilmiş olan, lizozim ve laktoferrin içeren yeni formülasyonların kullanımının EÇÇ'nin önüne geçilmesi için bir alternatif oluşturabileceği düşünülmektedir (10,11).

Lizozim, laktoferrin gibi antimikrobiyal tükürük proteinleri basit uygulamalarla diş macunu ve ağız çalkalama suları gibi ağız bakım ürünlerinin bileşimine eklenebilmektedir. Bu antimikrobiyal proteinler düşük maliyetle sığır kolestrumundan saflaştırılabilmekte, böylece sığır lizozim ve laktoferrini içeren ticari ürünler oluşturulabilmektedir. Biotene[®], Oralbalance[®], BioXtra[®] ve Zendium Saliva[®] lizozim

ve laktoferrin içeren ticari ürünlerdendir (178). Ancak yapılan çalışmalar bu ürünlerin çürük oluşumunda etkili olan temel patojenlere, dolayısıyla mikrobiyal dental plak oluşumunu engellemeye karşı etkisinin yetersiz olduğunu göstermiştir (182,190,191,246).

Bununla birlikte, birçok farklı antimikrobiyal proteinin de *in vitro* koşullarda olumlu sonuç verirken, *in vivo* testlerde sınırlı aktivite gösterdiği izlenmiş ve klinik uygulamalarında genel bir başarısızlık olduğuna dikkat çekilmiştir. Başarısız sonuçların temel nedeninin, antimikrobiyal proteinlerin stabiliteilerinin yetersizliği olduğu ve bu özelliklerinin geliştirilmesi gerektiği düşünülmüştür (247,248).

Antimikrobiyal ajanlardan oluşan formülasyonların stabiliteilerini arttırmak ve daha yüksek fayda sağlamak amacı ile, bileşimlerine ilaç taşıyıcı sistemlerin eklenmesi son yıllarda dikkat çeken güncel bir yaklaşımdır (249).

Son yıllarda diş hekimliğinde ve özellikle de periodontal tedavilerde metronidazol, klorheksidin, minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklin gibi antimikrobiyal ajanların etki ve etkinliğini arttırmak amacıyla poloksamer ve lipozom gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler ile jel/hidrojel formülasyonların geliştirildiği görülmüştür (250–258). İlaç taşıyıcı sistemlerin kullanımının en önemli avantajlarının etken maddeyi direkt olarak ilgili bölgeye taşımaları ve orada istenilen konsantrasyonu uzun süre koruyabilmeleri olduğu bildirilmiştir (249).

Tonguc-Altin ve ark (2015), antimikrobiyal protein içerikli ticari ürünlerin istenilen sonucu vermemesi üzerine formülasyonlarına ilaç taşıyıcı sistemlerin eklenmesi düşüncesi ile antimikrobiyal tükürük proteinlerinden lizozim ve laktoferrini, farklı ilaç taşıyıcı sistemler ile birleştirip (poloksamer 407 ve/veya dondurularak kurutulan Lipozomal DOTAP (DLD)) yeni formülasyonlar geliştirmişlerdir. Yaptıkları *in vitro* çalışmada bu yeni formülasyonların diş çürüğü oluşumunda etkili oldukları bilinen *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *L. acidophilus* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkilerini %0,2'lik klorheksidin glukonat gargara ve jel ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada formülasyonların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiş, lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren grubun, *S. sobrinus*'a antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonun lizozim için 0,5

mg/ml, laktoferrin için 0,25 mg/ml ve poloksamer 407 polimeri için %5 g/ml olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına etki eden en düşük konsantrasyonların ise lizozim için 1 mg/ml, laktoferrin için 0,5 mg/ml ve poloksamer 407 polimer için %10 g/ml olduğu bildirilmiştir. (10).

Bu çalışmanın sonucunda, tek başına Sorensen'in çözeltisi ile hazırlanmış tampon solüsyonu ve lizozim-laktoferrin içeren tampon solüsyonunun, incelenen bakteri suşları üzerinde etkili olmadığı, DLD'nin tek başına veya lizozim ve laktoferrin ile birleştirildiği formda bakteri suşları üzerinde inhibisyon göstermediği; bununla birlikte poloksamer 407 polimerinin lizozim ve laktoferrin içeriğinden bağımsız olarak eklendiği her formülasyonda bakteri suşları üzerinde inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir. %0,2'lik klorheksidin gargaranın (Klorhex[®], DrogSan) diğer formülasyonlara oranla çok düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu belirtilmiştir (10).

Çalışmada aynı zamanda bu yeni formülasyonların, hidroksiapatit diskler üzerinde 24 saatlik *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilm oluşumunu önleme kapasiteleri %0,2'lik klorheksidin glukonat jel (Cervitec[®] Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve klorheksidin jelin biyofilm oluşumunu tam olarak önlediği, bunu takiben gruplar arasında her iki suş üzerinde de en yüksek etkiyi lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren grubun gösterdiği belirtilmiştir. Bu formülasyonların klorheksinden daha güvenilir olabileceği, bu nedenle de diş hekimliği pratiğinde antimikrobiyal ve antiplak ajan olarak tercih edilebileceği ve ilaç piyasasında yer alabileceği ileri sürülmüştür. Bunun için ise öncelikle sitotoksitesite çalışmalarının ve hayvan deneylerinin yapılması gerektiği vurgulanmıştır (10).

Lizozim ve laktoferrin içerikli bu formülasyonların antibakteriyel etkinliklerinin gösterilmesinin ardından, 2015 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'nda, **Şenöz D.** tarafından, lizozim, laktoferrin ve ilaç taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 polimeri içeren farklı formülasyonların ve farklı konsantrasyonlardaki poloksamer 407 polimerlerinin biyoyumumluluklarının %0,2'lik klorheksidin gargara ile *in vitro* koşullarda karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği bir doktora tezi yürütülmüştür (11).

Tonguc-Altin ve ark.'nın çalışmasında (10), DLD'nin antimikrobiyal etkinliği arttırmadığı gösterildiğinden, çalışmada taşıyıcı sistem olarak sadece poloksamer 407 polimerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Çalışmada mukozal iritasyon skorlarının belirlenmesi için döllenen beyaz Leghorn cinsi tavuk yumurtaları üzerinde Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) testi yapılmış ve tüm formülasyonların zayıf ve orta derecede iritasyon gösterdiği, grupların hiç birinde mukoza üzerine ciddi derecede iritasyon gözlenmediği bildirilmiştir. Lizozim ve laktoferrinin %20 konsantrasyondaki poloksamer 407 ile birleştirilmesiyle oluşturan grup orta derece iritasyon gösterirken, aynı grubun MİK değeri olacak şekilde lizozim ve laktoferrinin %10 konsantrasyondaki poloksamer 407 ile birleştirilmesiyle oluşturulan formülasyonun zayıf iritasyon gösterdiği bildirilmiştir. Klorheksidin gargaranın iritasyon seviyesi ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (11).

Çalışmada, formülasyonların sitotoksik etkilerini değerlendirmek için metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) test yöntemi kullanılmış ve üç gün sonunda hücre canlılık oranı en düşük olan grubun klorheksidin gargara grubu olduğu rapor edilmiştir. Lizozim, laktoferrin ve %20'lik poloksamer 407 içeren grubun hücre canlılık oranının, lizozim, laktoferrin ve %10'luk poloksamer 407 içeren gruba göre daha düşük olduğu, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği belirtilmiştir. Maddelerin uzun süreli etkilerinin anlaşılabilmesi için, ileri çalışmalarla bu maddelerin etkinliğinin kinetik olarak değerlendirilmesi ve hayvan deneylerinin yapılması gerektiği vurgulanmıştır (11).

Literatürde bu formülasyonların oral mukoza üzerindeki iritasyon etkilerinin değerlendirildiği bir hayvan deneyi bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 içeren formülasyonun oral mukoza üzerindeki iritasyon etkileri *in vivo* koşullarda değerlendirilmiştir. Poloksamer 407'nin %20'lik konsantrasyonunun *in vitro* koşullarda orta derecede iritasyon oluşturduğu ve hücre canlılık oranının daha düşük olduğu bilindiğinden, MİK değeri olan ve zayıf/önemsiz iritasyon oluşturan %10'luk konsantrasyonu kullanılmıştır.

Bu çalışmada, yeni geliştirilmiş formülasyonların oral mukoza iritasyon indeksi, alternatif antiplak ajanların etkinliğinin ölçülmesinde pozitif kontrol olarak kabul edilmiş olan ve altın standart olma özelliği taşıyan, ancak uzun süreli kullanımında sitotoksik etki gösterdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmış olan klorheksidin diglukonat jel ile karşılaştırılmıştır.

Lizozimin doğal bir besin bileşeni olarak uzun ve güvenli bir geçmişi vardır. Bir koruyucu olarak ilave alınmasının, tüketici sağlığı için bir tehlike oluşturmadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından genel olarak güvenilir, zararsız (GRAS) olarak kabul edilmektedir (259). Avrupa Parlamentosunun, renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri ile ilgili 95/2/EC sayılı tebliğine göre olgunlaşmış peynire ilave edilen lizozim quantum satis (herhangi bir en yüksek düzeyin belirtilmediği, ancak istenilen etkinin sağlanabildiği en küçük miktarı) statüsündedir. Ancak yumurta alerjisi olan kişilerin lizozime duyarlı olabileceğini belirten çalışmalar da mevcuttur (260).

Laktoferrin kullanımının en büyük avantajlarından birinin, doğal bir memeli ürünü olması ve bu nedenle mikrobiyal sekonder metabolitlerden veya sentetik ilaçlardan daha biyoyumlu olması olduğu belirtilmiştir. İnsan ve sığır laktoferrinleri deneysel sistemlerde karşılaştırılmış ve biyolojik aktivitelerinin benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Sığır laktoferrininin alerjik potansiyele sahip olduğu, bu olası yan etkinin insan hastalıklarının tedavisinde rekombinant insan laktoferrini kullanımıyla azaltılabileceği vurgulanmıştır (261). Alerjik potansiyeli ortadan kaldırmak amacı ile bu çalışmada insan sütünden elde edilmiş Laktoferrin (Sigma®-Aldrich, USA) kullanılmıştır.

Diş hekimliği pratiğinde kullanılması planlanan materyallerin biyoyumlulukları *in vitro* testlerin ardından, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile değerlendirilmektedir. İritasyon testleri, ilaçların *in vitro* çalışmaları tamamlandıktan sonra önerilen ilk basamaktır (12).

Uluslararası organizasyonlar, iritasyon deneyleri için hayvan kullanımına son verecek uygun *in vitro* doku kültürü testlerini geliştirmek ve geçerli kılmak amacıyla çalışmaya devam etmektedir. Bazı 3D doku modelleri (EpiSkin™, Epiderm™ ve

SkinEthic™), EVCAM ve OECD tarafından onaylanmış ve yasal olarak *in vivo* (tavşan) deri iritasyon deneylerinin yerini almıştır. Benzer şekilde bukkal (EpiGingival™) ve oral (EpiOral™) mukozayı taklit eden doku modelleri geliştirilmiş olsa da henüz validasyon çalışmaları devam ettiğinden hayvan deneylerinin yerini alamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada doku kültür testleri yerine hayvan deneyi tercih edilmiştir.

Geçmişte oral mukoza iritasyon deneyleri için; fare (236,237), kobay (236,238), köpek (239) ve tavşan (240) gibi deney hayvanları kullanılmış olsa da, son yıllarda hamsterlar da yaygın olarak kullanılmaktadır (233–235). Hamsterların yanak keseleri, maddelerin mukoza üzerindeki iritasyon etkilerinin test edilmesi için en uygun model olarak kabul edilmektedir (241,242,262).

CTFA ve ISO'nun, materyallerin iritasyonunun değerlendirilmesinde izlenecek yolları standart hale getirdiği klavuzlar bulunmaktadır. CTFA klavuzları iritasyon testinin sıçan, kobay veya köpekler üzerinde yapılmasını önerirken, ISO standartlarında Suriye hamsterlarının kullanımı önerilmektedir (227,263).

Belirli bir materyalin özelliklerinin incelendiği farklı çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılması sonuçların karşılaştırılmasında problemlere yol açmaktadır. Bu problemlerin ortadan kalkması için çalışmaların yayımlanmış standartlar rehber alınarak planlanması önem taşımaktadır. Bu çalışmada oral mukoza iritasyonunu değerlendirme testleri, daha fazla kabul görmüş ve 2010 yılında güncellenmiş olan ISO (10933-10) standartlarına uygun olarak yürütülmüştür (227).

Daha önce yayımlanmış oral mukoza iritasyon testleri incelendiğinde, daha eski bir kılavuz olmasına rağmen, CTFA klavuzunun da sıklıkla rehber alındığı ve sıçan ya da kobayların kullanıldığı görülmüştür (237,238,264,265). Bunun Suriye hamsterlarının teminin güçlüğünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

ISO standardında, test edilecek materyalin, öngörülen maruz kalma süresine göre tercih edilebilecek akut ve kronik olmak üzere iki iritasyon testi yöntemi belirtilmiştir. Bu çalışmada, geliştirilen formülasyonun, hastanın çürük risk grubuna göre 3-6 ay aralıkla kullanımı planlandığından, akut iritasyon test prosedürü referans alınmıştır.

Yayımlanmış oral mukoza iritasyon çalışmaları incelendiğinde, her deney grubu için kullanılan hayvan sayısı üç ile beş arasında değişmektedir. Standartta en az üç hayvan kullanılması gerektiği belirtildiğinden bu çalışmada her deney grubu için üç hayvan kullanılmıştır. Aynı standardın rehber alındığı ancak hayvan sayısı daha fazla olan çalışmalar görülmüştür (266–268).

Referans alınan standartta hayvanların cinsiyeti sınırlandırılmamıştır, cinsiyetler arasında mukoza hassasiyeti değişiklik gösterebileceğinden bu çalışmada tek cins hayvan kullanılması planlanmış ve dişi hamsterlar tercih edilmiştir.

Bu çalışmada lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı olarak poloksamer 407 içeren yeni formülasyonların ve kontrol grubu olarak %0,2'lik klorheksidin diglukonatın jelin oral mukoza üzerindeki iritan etkileri *in vivo* koşullarda değerlendirilmiştir.

Makroskopik değerlendirme sonucunda, uygulama yapılan her üç grupta da herhangi bir dönemde eritem ya da skar oluşumu izlenmemiştir. Çalışmanın akut oral mukoza iritasyon deneyi olmasından dolayı, bir günlük uygulama sonrasındaki mukoza değişiklikleri makroskopik olarak incelenmiştir. Bu kısa uygulamanın da mukoza üzerinde gözle görülür değişikliğe neden olmayabileceği düşünülmektedir.

Histopatolojik incelemede, Grup 1 (steril distile su) ve Grup 2 (1 mg/ml lizozim + 0,5 mg/ml laktoferrin + poloksamer 407) iritasyon oluşturmazken, Grup 3'ün (%0,2 klorheksin diglukonat jel) lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojele göre en az düzeyde iritasyona neden olduğu görülmüştür.

Uygulamaların tümünde epitelin normal olduğu ve vasküler konjesyon oluşmadığı görülmüştür. Lökosit infiltrasyonu ve ödem sadece klorheksidin grubunda meydana gelmiştir.

Yuca ve ark. (2006), fareler üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmada, fareleri gruplara ayırmış (%0,12 klorheksidin glukonat + %0,15 benzidamin hidroklorid; benzidamin hidroklorid; %0,2 klorheksidin glukonat; fusafungine) ve 10 gün boyunca günde iki kez farklı klorheksidin oral spreyleri uygulamıştır. Çalışma sonucunda farelerin orofaringeal mukozasında düşük dereceli displazi, fibroz, hiperplazi, tıkanıklık

ve ödem oluştuğu ancak patolojik lezyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (269). *Gurgan ve ark. (2006)*, yaptıkları çift kör klinik çalışmanın sonucunda, bir hafta boyunca %0,2 alkolsüz klorheksidin ile gargara yapmanın, oral mukozada iritasyon, yanma hissi ve tat algısı problemlerine yol açtığını, ayrıca dil ve dişlerde renklemeye neden olduğunu rapor etmiştir (270). Bu çalışmaların sonuçları bulgularımızı destekler niteliktedir.

Farklı antiseptiklerin doku toksisitesinin değerlendirildiği bir HET-CAM testinde iritasyon skoru en yüksek olan grubun klorheksidin (İS:20) olduğu belirtilmiştir (271). Benzer şekilde klorheksidin glukonatın (%0,5) *in vitro* deri iritasyon potansiyeli 3D doku modellerinde değerlendirilmiş ve 30 dakikalık uygulama sonrası hücre canlılık oranının %5 olduğu gösterilmiştir (272). Klorheksidin ile yapılmış *in vitro* iritasyon testleri de sonuçlarımızı desteklemektedir.

Klorheksidinin, seyreltilmiş çözelti formunda bile, fibroblastlar, osteoblastlar ve kondrositler ve ökaryotik hücreler üzerinde ciddi sitotoksik etkilere neden olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma yayımlanmıştır (273–275).

Klorheksidinin alveoler kemik ve diş eti epitel hücrelerinin kültürü üzerinde toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (276–279). Bununla birlikte, klorheksidinin, insan gingival fibroblast proliferasyonunun doza bağlı azalmasını indükleyebileceği ve hem kollajen hem de kollajen olmayan protein üretimini azalttığı bildirilmiştir (280–282).

Günümüze kadar yayımlanan çalışmalar incelendiğinde laktoferrinin tek başına ya da lizozim ile birlikte iritasyon potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Lichtenberg ve ark. (2017), *Acremonium alcalophilum* kaynaklı lizozim elde etmiş ve güvenilirliğini çeşitli yöntemlerle değerlendirmiştir. *In vitro* deri (EpiDerm™) ve göz (izole tavuk gözü) iritasyonu deneyleri uygulamış ve lizozimin iritasyon etkisi göstermediğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada oral mukoza iritasyonu ayrıca değerlendirilmemiş olsa da sonuçları çalışmamızın bulguları ile benzerlik göstermektedir (283).

Bu çalışmanın sınırlamaları:

- Deneysel hayvanları, yeni üretilen formülasyonların olumlu / olumsuz etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmakla birlikte, insan organizması üzerinde elde edilebilecek etkileri ve / veya klinik bulguları tam olarak yansıtmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçlarının lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren formülasyonun kullanıldığı prospektif randomize klinik deneyler ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.
- Yeni jel formülasyonların devamlı kullanımı düşünülmediğinden akut iritasyon prosedürleri izlenmiştir. Uzun süreli kullanımının etkilerini belirlemek amacıyla kronik iritasyon çalışmalarının da yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Lizozim, laktoferrin ve ilaç taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 içeren hidrojel formülasyonun oral mukoza iritasyon etkilerinin steril apirojen distile su ve %0,2'lik klorheksidin jel ile karşılaştırıldığı bu çalışmada;

1. Makroskopik değerlendirme sonucunda, uygulama yapılan her üç grupta da herhangi bir dönemde eritem ya da skar oluşumu izlenmemiştir.
2. Steril distile su uygulanan grubun histopatolojik inceleme sonucunda, tüm örneklerin yanak dokularında yüzeyde doğal yapıda ketinize epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler izlenmiştir. Epitel hücrelerinde yassılaşma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişimi görülmemiştir. Örneklerin hiçbirinde sağ ve sol yanak dokusunda lökosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ya da ödem gözlemlenmemiştir.
3. Klorheksidin jel uygulanan grubun histopatolojik inceleme sonucunda, tüm örneklerin yanak dokularında epitelin normal olduğu, epitel hücrelerinde yassılaşma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişmediği görülmüştür. İki hayvanın klorheksidin jel uygulanmış yanak dokusunda bağ doku içinde hafif derecede lökosit infiltrasyonu izlenmiştir. Örneklerin hiç birinde yanak dokusunda vasküler konjesyon gözlemlenmemiştir. İki örneğin bağ dokusunda interstisyel alanda ödem oluşumu izlenmiştir.
4. Lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı olarak poloksamer 407 içeren yeni formülasyonun uygulandığı grubun histopatolojik inceleme sonucunda, tüm örneklerin yanak dokularında yüzeyde doğal yapıda ketinize epitel, altında gevşek yapıda bağ dokusu ve bağ dokusu içinde kolagen lifler izlenmiştir. Epitel hücrelerinde yassılaşma, metaplazi, fokal ya da genel erozyon gelişimi görülmemiştir. Örneklerin hiç birinde yanak dokusunda lökosit infiltrasyonu, vasküler konjesyon ya da ödem gözlemlenmemiştir.

5. Steril distile su ile klorheksidin jel uygulamaları karşılaştırıldığında klorheksidin jelin iritasyon indeksi 2 olarak hesaplanmış ve steril distile suya göre daha iritan olduğu ancak bu etkilerinin en az düzeyde olduğu belirlenmiştir.
6. Steril distile su ve lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel uygulamalarının iritasyon etkileri karşılaştırıldığında yeni formülasyonun iritasyon indeksi 0 olarak hesaplanmıştır. Yeni geliştirilmiş hidrojel formülasyonunun iritasyon düzeyinin steril distile su ile eşit olduğu görülmüştür.
7. Lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojel ile klorheksidin jel uygulamalarının iritasyon etkileri karşılaştırıldığında klorheksidin jelin iritasyon indeksi 2 olarak hesaplanmıştır. Yeni geliştirilmiş hidrojel formülasyon iritasyon oluşturmazken, klorheksin jel uygulamasının lizozim, laktoferrin ve poloksamer 407 içeren hidrojele göre daha iritan olduğu ancak bu etkinin en az düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, antibakteriyel etkisi ve biyouyumluluğu *in vitro* olarak gösterilmiş olan, lizozim, laktoferrin ve ilaç taşıyıcı sistem olarak poloksamer 407 içeren formülasyonun, bu *in vivo* çalışmanın koşulları altında oral mukozada iritasyon oluşturmadığı makroskopik ve histopatolojik olarak belirlenmiştir. Bu formülasyonun daha uzun süreli etkilerinin anlaşılabilmesi için, kronik oral mukoza iritasyon testlerinin ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık (hipersensitivite) deneylerinin de yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Overman PR. Biofilm: A new view of plaque. *J Contemp Dent Pract.* 2000;1(3):18–29.
2. Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:513–52.
3. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1599–607.
4. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721–32.
5. Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(1):8–13.
6. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38(3):204–11.
7. García-Godoy F, Hicks M. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:25–34.
8. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion *in vitro*. *Biomed Mater.* 2009;4(3):034104.
9. Goswami M, Chaitra T, Saha S. Latest developments in non-fluoridated remineralizing technologies. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012;30(1):2–6.
10. Tonguc-Altin K, Sandalli N, Duman G, Selvi-Kuvvetli S, Topcuoglu N, Kulekci G. Development of novel formulations containing lysozyme and lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on Mutans Streptococci and Lactobacilli. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):706–14.
11. Şenöz D. Lizozim, laktoferrin ve taşıyıcı olarak poloksamer 407 içeren yeni formülasyonların biyoyumluluklarının *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi. İstanbul, Yeditepe Üniversitesi, 2014.

12. ISO 10993-1: Biological Evaluation of Medical Devices. *Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2018.
13. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004;38(2):247–53.
14. Nieuw Amerongen A, Veerman ECI. Saliva: The defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002;8(1):12–22.
15. Moss SJ. Clinical implications of recent advances in salivary research. *J Esthet Dent.* 1995;7(5):197–203.
16. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66:623–7.
17. Dawes C, Pedersen AML, Villa A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol.* 2015;60(6):863–74.
18. McQuone SJ. Acute viral and bacterial infections of the salivary glands. *Otolaryngol Clin North Am.* 1999;32(5):793–811.
19. Tabak L. In defense of the oral cavity: Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:547–64.
20. Grant DA, Stern IB, Listgarten MA. Saliva. In: *Periodontics*. 6th ed. St Louis: CV Mosby;1988:135–46
21. Dawes C. A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. *Caries Res.* 1983;17(4):321–34.
22. Dawes C. Salivary Clearance and Its Effects on Oral Health. In: Edgar M, Dawes C, O’Mullane D, eds. *Saliva and Oral Health*. 4th ed. London: Stephen Hancocks Ltd.; 2012:81–96.
23. Lagerluf F, Dawes C. The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. *J Dent Res.* 1984;63(5):618–21.

24. Dawes C. Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth. *Arch Oral Biol.* 2003;48(5):329–36.
25. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85(2):162–9.
26. Wikner S, Söder P. Factors associated with salivary buffering capacity in young adults in Stockholm, Sweden. *Scand J Dent Res.* 1994;102(1):50–3.
27. Menaker L, Morhart RE, Navia J. Salivary Eater and Electrolytes and Oral Health. In: *The Biologic Basis of Dental Caries: An Oral Biology Textbook.* Hagerstown, London: Harper and Row; 1980:132–43
28. Mandel ID. Impact of saliva on dental caries. *Compend Suppl.* 1989;13:S476–81.
29. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989;119(2):298–304.
30. Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. *Cell Tissue Res.* 2011;343(2):263–87.
31. Johnson DA, Alvares OF, Etzel KR, Kalu DN. Regulation of salivary proteins. *J Dent Res.* 1987;66(2):576–82.
32. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: Report of a consensus meeting. *Br Dent J.* 1990;169(3-4):96–8.
33. Roth G, Calmes R. Salivary Glands and Saliva. In: Roth G, Calmes R, eds. *Oral Biology.* St Louis: CV Mosby; 1981:196–236.
34. Lagerluf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):229–38.
35. Stephan RM. Intra-oral Hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res.* 1944;23(4):257–66.
36. Edgar WM. The role of saliva in the control of pH changes in human dental plaque. *Caries Res.* 1976;10(4):241–54.

37. Rugg-Gunn AJ, Edgar WM, Geddes DA, Jenkins GN. The effect of different meal patterns upon plaque pH in human subjects. *Br Dent J*. 1975;139(9):351–6.
38. Bibby BG, Mundorff SA, Zero DT, Almekinder KJ. Oral food clearance and the pH of plaque and saliva. *J Am Dent Assoc*. 1986;112(3):333–7.
39. Neel EAA, Aljabo A, Strange A, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4743–63.
40. Featherstone JDB, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res*. 1981;15(5):377–85.
41. Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent*. 2002;88(3):337–43.
42. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem*. 1977;252(5):1689–95.
43. Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in saliva: An *in vivo* study. *Caries Res*. 2014;48(2):170–3.
44. Brancher JA, Medeiros KG dos S, Arruda ES, et al. Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(2):166–70.
45. Gillum TL, Kuennen M, Gourley C, Schneider S, Dokladny K, Moseley P. Salivary antimicrobial protein response to prolonged running. *Biol Sport*. 2013;30(1):3–8.
46. Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed Mutans Streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(1):47–52.
47. Arthur RA, del Bel Cury AA, Mattos-Graner RO, et al. Genotypic and phenotypic analysis of *S. mutans* isolated from dental biofilms formed *in vivo* under high cariogenic conditions. *Braz Dent J*. 2011;22(4):267–74.

48. Kneist S, Schmidt F, Callaway A, et al. Diversity of Lactobacillus species in deep carious lesions of primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2010;11(4):181–6.
49. Ranadheer E, Reddy Nv, Nayak U, Rao VaP. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2011;29(2):106–12.
50. Paganini M, Dezan CC, Bichaco TR, De Andrade FB, Neto AC, Fernandes KBP. Dental caries status and salivary properties of asthmatic children and adolescents. *Int J Paediatr Dent*. 2011;21(3):185–91.
51. Rudney JD, Hickey KL, Ji Z. Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans Streptococci to microplates coated with human saliva. *J Dent Res*. 1999;78(3):759–68.
52. Khurshid Z, Naseem M, Sheikh Z, Najeeb S, Shahab S, Zafar MS. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm J*. 2016;24(5):515–24.
53. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4295–320.
54. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000*. 2009;51:152–80.
55. Benkerroum N. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J Biotechnol*. 2008;7(25):4856–67.
56. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc B Biol Sci*. 1922;93(653):306–3017.
57. Masschalck B, Michiels CW. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2003;29(3):191–214.
58. Xue QG, Schey KL, Volety AK, Chu FLE, La Peyre JF. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2004;139(1):11–25.

59. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ. Novel alternatives to antibiotics: Bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol.* 2008;104(1):1–13.
60. Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR. Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature.* 1965;206(4986):757–61.
61. Johnson LN, Phillips DC. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Å resolution. *Nature.* 1965;206(4986):761–3.
62. Prager EM, Wilson AC, Arnheim N. Widespread distribution of lysozyme g in egg white of birds. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7295–7.
63. Kuroki R, Weaver LH, Matthews BW. Structural basis of the conversion of T4 lysozyme into a transglycosidase by reengineering the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):8949–8954.
64. Chandan RC, Parry RM, Shahani KM. Lysozyme, lipase, and ribonuclease in milk of various species. *J Dairy Sci.* 1968;51(4):606–7.
65. Canfield RE, McMurry S. Purification and characterization of a lysozyme from goose egg white. *Biochem Biophys Res Commun.* 1967;26(1):38–42.
66. Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, Fukuda S, Sugimura K, Imoto T. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *Eur J Biochem.* 1999;259(1–2):456–61.
67. Bachali S, Bailly X, Jollès J, Jollès P, Deutsch JS. The lysozyme of the starfish *Asterias rubens*: A paradigmatic type i lysozyme. *Eur J Biochem.* 2004;271(2):237–42.
68. Meyer K, Hahnel E, Steinberg A. Lysozyme of plant origin. *J Biol Chem.* 1946;163:733–40.
69. Morita T, Hara S, Matsushima Y. Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *J Biochem.* 1978;83(3):893–903.

70. Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem.* 1984;63(2):165-89.
71. Schenkels LCPM, Veerman ECI, Amerongen AVN. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(2):161-75.
72. Zelechowska P, Agier J, Brzezińska-Błaszczyk E. Endogenous antimicrobial factors in the treatment of infectious diseases. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(4):419-25.
73. Murray PR, Cantrell HF, Lankford RB, The IV, Susceptibility SG. Multicenter evaluation of the *in vitro* activity of piperacillin-tazobactam compared with eleven selected β -lactam antibiotics and ciprofloxacin against more than 42,000 aerobic gram-positive and gram-negative bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19(2):111-20.
74. Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ. Structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. *Bacteriol Rev.* 1974;38(1):87-110.
75. Warren GH, Gray J, Bartell P. The lysis of *Pseudomonas aeruginosa* by lysozyme. *J Bacteriol.* 1955;70(5):614-9.
76. Repaske R. Lysis of gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim Biophys Acta.* 1958;30(2):225-32.
77. Wilson LA, Spitznagel JK. Molecular and structural damage to *Escherichia coli* produced by antibody, complement, and lysozyme systems. *J Bacteriol.* 1968;96(4):1339-48.
78. Feingold DS, Goldman JN, Kuritz HM. Locus of the lethal event in the serum bactericidal reaction. *J Bacteriol.* 1968;96(6):2127-31.
79. Jollès P. Recent developments in the study of lysozyme. *Angew Chemie Int Ed Eng.* 1964;3:28-36.
80. Nakae T, Nikaido H. Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella Typhimurium*. *J Biol Chem.* 1975;250(18):7359-65.

81. Spitznagel JK. Nonoxidative antimicrobial reactions of leukocytes. *Contemp Top Immunobiol.* 1984;14:283–343.
82. Grahame DAS, Bryksa BC, Yada RY. Factors Affecting Enzyme Activity. In: Yada RY, ed. *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality.* 1st ed. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing;2015:11–55
83. Castagnola M, Inzitari R, Fanali C, et al. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Mol Cell Proteomics.* 2010;10(1):M110.003467.
84. Stuchell RN, Mandel ID. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res.* 1983;62(5):552–4.
85. Bai J, Zhou Q, Bao Z ying, Li X xin, Qin M. Comparison of salivary proteins between children with early childhood caries and children without caries. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2007;42(1):21–3.
86. Tandon S, Satyamoorthy K, Bhalla S. Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemp Clin Dent.* 2010;1(1):17-22.
87. Cisani G, Varaldo PE, Ingianni A, Pompei R, Satta G. Inhibition of herpes simplex virus-induced cytopathic effect by modified hen egg-white lysozymes. *Curr Microbiol.* 1984;10:35–40.
88. Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Kung HF, Blithe DL, Chen HC. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(6):2678–2681.
89. León-Sicairos N, López-Soto F, Reyes-López M, Godínez-Vargas D, Ordaz-Pichardo C, De La Garza M. Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, slgA and lysozyme. *Clin Med Res.* 2006;4(2):106–13.
90. Wu T, Samaranayake LP, Leung WK, Sullivan PA. Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. *J Med Microbiol.* 1999;48(8):721–30.
91. Razavi-Rohani SM, Griffiths MW. The antifungal activity of butylated hydroxyanisole and lysozyme. *J Food Saf.* 2007;19(2):97–108.

92. Knorr D, Shetty KJ, Kinsella JE. Enzymatic lysis of yeast cell walls. *Biotechnol Bioeng.* 1979;21(11):2011–21.
93. Alsteens D, Dupres V, Mc Evoy K, Wildling L, Gruber HJ, Dufrêne YF. Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. *Nanotechnology.* 2008;19(38):384005.
94. Nwe N, Stevens WF, Tokura S, Tamura H. Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme Microb Technol.* 2008;42(3):242–51.
95. Sørensen M, Sørensen SPL. The protein in whey. *C R Trav Lab Carlsb.* 1940;23(7):55–99.
96. Johanson BG. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem Scand.* 1960;(2)14:510–2.
97. Groves ML. The isolation of a red protein from milk. *J Am Chem Soc.* 1960;82(13):3345–50.
98. Montreuil J, Tonnelat J, Mullet S. Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk. *Biochim Biophys Acta.* 1960;45:413–21.
99. Probable role of lactoferrin in the transport of iron across the intestinal brush border. *Nutr Rev.* 1980;38(7):256–7.
100. Steijns JM, van Hooijdonk ACM. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr.* 2000;84(1):S11–7.
101. Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(5):S389–97.
102. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 2003;40(7):395–405.
103. Wally J, Buchanan SK. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *BioMetals.* 2007;20(3-4):249–62.
104. Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M. Lactoferrin: A review. *Vet Med.*

2008;53(9):457–68.

105. Laputková G, Schwartzová V, Bánovčín J, Alexovič M, Sabo J. Salivary protein roles in oral health and as predictors of caries risk. *Open Life Sci.* 2018;13:174–200.
106. Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Oral health and salivary composition in diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 1993;7(1):57–62.
107. Kirstilä V, Häkkinen P, Jentsch H, Vilja P, Tenovuo J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic micro-organisms: A two-year cohort study. *J Dent Res.* 1998;77(1):73–80.
108. Mass E, Gadoth N, Harell D, Wolff A. Can salivary composition and high flow rate explain the low caries rate in children with familial dysautonomia? *Pediatr Dent.* 2002;24(6):581–6.
109. Hao G feng, Lin H cai. Relationship of concentration of lactoferrin and lysozyme in saliva and dental caries in primary dentition. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2009;44(2):82–4.
110. Felizardo K, Gonçalves R, Schwarcz W, Poli-Frederico R, Maciel S, Andrade F. An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity. *Rev Odonto Ciência.* 2010;25(4):344–9.
111. de Andrade FB, de Oliveira JC, Yoshie MT, Guimarães BM, Gonçalves RB, Schwarcz WD. Antimicrobial activity and synergism of lactoferrin and lysozyme against cariogenic microorganisms. *Braz Dent J.* 2014;25(2):165–9.
112. Moslemi M, Sattari M, Kooshki F, et al. Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2015;9(2):109–14.
113. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(4):301.e1-

- 8.
114. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Nazmi K, et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1999;26(5):269–275.
115. Dial EJ, Romero JJ, Headon DR, Lichtenberger LM. Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J Pharm Pharmacol*. 2000;52(12):1541–6.
116. Wang K, Zhou X, Li W, Zhang L. Human salivary proteins and their peptidomimetics: Values of function, early diagnosis, and therapeutic potential in combating dental caries. *Arch Oral Biol*. 2019;99:31–42.
117. Van Der Weijden FA, Slot DE. Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. *J Clin Periodontol*. 2015;42(S16):S77–91.
118. Albandar JM, Buischi YAP, Oliveira LB, Axelsson P. Lack of effect of oral hygiene training on periodontal disease regression over 3 years in adolescents. *J Periodontol*. 1995;66(4):255–60.
119. Van Der Weijden GA, Hioe KPK. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005;32(S6):214–28.
120. Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(S16):S106–38.
121. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999;27(1):31–40.
122. Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res*. 1990;69(S2):660–7.
123. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik A. Fluoride: A review of use and effects on health. *Mater Sociomed*. 2016;28(2):133–7.

124. Dawes C, Weatherell JA. Kinetics of fluoride in the oral fluids. *J Dent Res*. 1990;69(S2):638–44.
125. WHO Model List of Essential Medicines. *Chlorhexidine*. Erişim: 10.02.2019
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273826/EML-20-eng.pdf?ua=1>.
126. Schroeder HE, Shanley D. Formation and inhibition of dental calculus. *J Periodontol*. 2013;40(11):643–6.
127. Løe H, Von Der Fehr FR, Schiött CR. Inhibition of experimental caries by plaque prevention: The effect of chlorhexidine mouthrinses. *Scand J Dent Res*. 1972;80(1):1–9.
128. Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother*. 1954;9(2):192-6.
129. Balagopal S, Arjunker R. Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *J Pharm Sci Res*. 2013;5(12):270–4.
130. Paulson D. Chlorhexidine Gluconate. In: Paulson D, ed. *Handbook of topical antimicrobials: Industrial Applications in Consumer Products and Pharmaceuticals*. New York:Marcel Dekker Inc;2003:117–22
131. Denton G. Chlorhexidine. In: Block S, ed. *Disinfection, Sterilisation and Preservation*. 4th ed.Philadelphia:Lea and Febiger;1991:274–89.
132. Nayyar AS. Chlorhexidine: A cationic bisbiguanide, membrane active drug in periodontal medicine, structure advantages and associated adverse effects, a brief communication. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015;4(7):370–92.
133. James P, Worthington HV, Parnell C, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3(3):CD008676.
134. Rølla G, Løe H, Rindom Schiött C. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):90–5.

135. Stabholz A, Sela MN, Friedman M, Golomb G, Soskolne A. Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1986;13(8):783–8.
136. Bonesvoll P. Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 1977;4(5):49–65.
137. Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: Effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res.* 2009;23(S1):39–48.
138. Løe H, Rindom Schiøtt C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1970;5(2):79–83.
139. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, et al. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007;86(6):529–33.
140. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437–9.
141. Faria G, Celes MRN, De Rossi A, Silva LAB, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. *J Endod.* 2007;33(6):715–22.
142. Ersin NK, Eronat N, Totu FI, Ates M, Eden E. Effectiveness of 2-year application of schoolbased chlorhexidine varnish, sodium fluoride gel, and dental health education programs in high-risk adolescents. *Quintessence Int.* 2008;39(2):e45-51.
143. Sajjan P, Nagesh L, Sajjanar M, Reddy S, Venkatesh U. Comparative evaluation of chlorhexidine varnish and fluoride varnish on plaque *Streptococcus mutans* count - an *in vivo* study. *Int J Dent Hyg.* 2013;11(3):191–7.
144. Baygin O, Tuzuner T, Kusgoz A, Tanriver M, Arslan I, Senel AC. Antibacterial effects of fluoride varnish compared with chlorhexidine plus fluoride in disabled children. *Oral Health Prev Dent.* 2014;12(4):373–82.

145. Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. *J Periodontal Res.* 1973;8(S12):55–57.
146. Nordbö H, Eriksen HM, Röllä G, Attramadal A, Solheim H. Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine: Preliminary report. *Scand J Dent Res.* 1982;90(2):117–23.
147. Addy M, Moran J, Griffiths AA, Wills-Wood NJ. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine. I. Surface protein denaturation or dietary precipitation? *Br Dent J.* 1985;159(9):281–5.
148. Addy M, Jenkins S, Newcombe R. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (I) Plaque regrowth over a 4-day period. *J Clin Periodontol.* 1990;17(10):693–7.
149. Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of Listerine[®], Meridol[®] and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol.* 1990;17(5):292–7.
150. Rundegren J, Hvid EB, Johansson M, Åström M. Effect of 4 days of mouth rinsing with delmopinol or chlorhexidine on the vitality of plaque bacteria. *J Clin Periodontol.* 1992;19(5):322–5.
151. Jenkins S, Addy M, Newcombe RG. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol.* 1994;21(6):441–4.
152. Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, Meridol and Listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci.* 1995;103(6):355–61.
153. Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol.* 1999;26(3):164–8.
154. Otten MPT, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Abbas F, Van Hoogmoed CG. Retention of antimicrobial activity in plaque and saliva following mouthrinse use *in vivo*. *Caries Res.* 2010;44(5):459–64.

155. Hannig C, Gaeding A, Basche S, Richter G, Helbig R, Hannig M. Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin *in situ*. *Caries Res.* 2013;47(2):150–61.
156. Moreira MR, Alvarez M V., Ponce AG. Essential Oils. In: Siddiqui MW, Zavala JF, Hwang C, eds. *Postharvest Management Approaches for Maintaining Quality of Fresh Produce*. Switzerland:Springer International Publishing;2016:113–24
157. Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol.* 2008;19(3):156–64.
158. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223–53.
159. Abdollahi M, Hassani S, Derakhshani M. Phenol. In: Wexler P, ed. *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd ed. Amsterdam, The Netherland: Elsevier Academic Press;2014:871–3
160. Krastanov A, Alexieva Z, Yemendzhiev H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng Life Sci.* 2013;13(1):76–87.
161. Cheynier V. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochem Rev.* 2012;11(2–3):153–77.
162. Zheng CY, Wang ZH. Effects of chlorhexidine, Listerine and Fluoride Listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. *Chin J Dent Res.* 2011;14(2):135–40.
163. ADA seal products. *Listerine*[®]. Erişim: 17.02.2020
<https://www.ada.org/en/science-research/ada-seal-of-acceptance/ada-seal-products>.
164. Fornell J, Sudin Y, Lindhe J. Effect of Listerine[®] on dental plaque and gingivitis. *Eur J Oral Sci.* 1975;83(1):18–25.
165. DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Minah GE, Niehaus C. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol.* 1989;16(5):311–5.

166. Gordon JM, Lamster IB, Seiger MC. Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1985;12(8):697–704.
167. Krayner JW, Leite RS, Kirkwood KL. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2010;54(1):13–33.
168. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Antiplatelet effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an *in situ* model of oral biofilm growth: A randomised clinical trial. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117177.
169. Sahrman P, Imfeld T, Ronay V, Attin T, Schmidlin PR. Povidone-iodine gel and solution as adjunct to ultrasonic debridement in nonsurgical periodontitis treatment: An RCT pilot study. *Quintessence Int*. 2014;45(4):281–90.
170. Van der Sluijs M, Van der Sluijs E, Van der Weijden F, Slot DE. The effect on clinical parameters of periodontal inflammation following non-surgical periodontal therapy with ultrasonics and chemotherapeutic cooling solutions: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2016;43(12):1074–85.
171. von Ohle C, Weiger R, Decker E, Schlagenhaut U, Brex M. The efficacy of a single pocket irrigation on subgingival microbial vitality. *Clin Oral Investig*. 1998;2(2):84–90.
172. Hoang T, Jorgensen MG, Keim RG, Pattison AM, Slots J. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodontol Res*. 2003;38(3):311–7.
173. Young DA, Fontana M, Wolff MS. Current concepts in cariology. Preface. *Dent Clin North Am*. 2010;54(3):13–5.
174. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31(7):603–32.
175. İkinci G, Şenel S, Akincibay H, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm*. 2002;235(1–2):121–7.
176. Ataç MS, Şenel S, Eren A, Kustimur S, Güngör N. Application of chitosan films in sulcoplasty operations. *Adv Chitin Sci*. 2005;8:270–4.

177. Daly S, Seong J, Newcombe R, et al. A randomised clinical trial to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on gum health over 3 months. *J Dent*. 2019;80(S1):S26–32.
178. Wei H, Loimaranta V, Tenovuo J, et al. Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):9–15.
179. Headon DR. Human Lactoferrin: Production at Large Scale, Characterization and Applications. In: Shimazaki K, Tsuda H, Tomita M, Kuwata T, Perraudin JP, eds. *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*. Amsterdam:Elsevier Science BV;2000:415–27
180. Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F, Humphreys-Beher MG. Human salivary peroxidase and bovine lactoperoxidase are cross-reactive. *J Dent Res*. 1990;69(12):1839–46.
181. Bosch EH, Van Doorne H, De Vries S. The lactoperoxidase system: The influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *J Appl Microbiol*. 2000;89(2):215–24.
182. Kirstilä V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J. Effects of a lactoperoxidase-system-containing toothpaste on dental plaque and whole saliva *in vivo*. *Acta Odontol Scand*. 1994;52(6):346–53.
183. Jyoti S, Shashikiran N, Subba Reddy V. Effect of lactoperoxidase system containing toothpaste on cariogenic bacteria in children with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent*. 2009;33(4):299–303.
184. Hatti S, Ravindra S, Satpathy A, Kulkarni RD, Parande MV. Biofilm inhibition and antimicrobial activity of a dentifrice containing salivary substitutes. *Int J Dent Hyg*. 2007;5(4):218–24.
185. Gudipaneni RK, Vijay Kumarr R, Jesudass G, Peddengatagari S, Duddu Y. Short term comparative evaluation of antimicrobial efficacy of short tooth paste

- containing lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase in children with severe early childhood caries: A clinical study. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(4):ZC18-20.
186. Koch G, Edlund K, Hoogendoorn H. Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries. *Odontol Revy.* 1973;24(4):367–72.
 187. Koch G, Strand G. Effect of an enzyme dentifrice on caries. A two-year clinical pilot study. **Swed Dent J.** 1979;3(1):9–13.
 188. Rotgans J, Hoogendoorn H. The effect of brushing with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase on dental caries in rats. *Caries Res.* 1979;13(3):150–3.
 189. Midda M, Cooksey MW. Clinical uses of an enzyme-containing dentifrice. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):950–6.
 190. Afseth J, Rølla G. Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase. *Caries Res.* 1983;17(5):472–5.
 191. Moran J, Addy M. The antibacterial properties of some commercially available toothpastes *in vitro.* *Br Dent J.* 1984;156(5):175–8.
 192. Ito Y. Drug Delivery Systems. In: Ito Y, ed. *Photochemistry for Biomedical Applications: From Device Fabrication to Diagnosis and Therapy.* Singapore, Springer; 2018:231–75
 193. Pinto-Alphandary H, Andreumont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;13(3):155–68.
 194. Aktaş A, Giray B. Oral kaviteye uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler. *Turkiye Klin J Dental Sci.* 2009;15(2):109–17.
 195. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig.* 2012;2(1):2–11.
 196. Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(6):373–83.

197. Walton RP, Lacey CF. Absorption of drugs through the oral mucosa. *J Pharmacol Exp Ther.* 1935;54:61–76.
198. Walton RP. Sublingual administration of drugs. *J Am Med Assoc.* 1944;124(3):138–43.
199. Zhang H, Zhang J, Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: Clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(9):661–80.
200. Meka NJ. Oral mucosal drug delivery-An adjunct to the current therapeutic strategies in the dental management of oral diseases: Review. *Ohdm.* 2014;13(4):1034–40.
201. Jójárt I, Kása P, Kelemen A, Pintye-Hódi K. Study of the compressibility of chewing gum and its applicability as an oral drug delivery system. *Pharm Dev Technol.* 2016;21(3):321–7.
202. Bansal M, Singh SK, Gulati M. Lozenges as delivery system for upper respiratory catarrh medication. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2014;8(2):92–100.
203. Gandhi K, Maganti RS, Kaur H, Vinod KS, Verma P. Formulation and evaluation of sol-gel drug delivery system for intracanal pH sensitive controlled delivery of chlorhexidine. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(4):ZC68–72.
204. Bruschi ML, de Francisco LM, S de Toledo L de A, Borghi F. An overview of recent patents on composition of mucoadhesive drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2015;9(1):79–87.
205. Park K, Park H. Test Methods of Bioadhesion. In: Lenaerts V, Gurny R, eds. *Bioadhesive Drug Delivery Systems.* 1st ed. Florida, CRC Pres;1990:44–56
206. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery- A promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release.* 2006;114(1):15–40.
207. Giunchedi P, Juliano C, Gavini E, Cossu M, Sorrenti M. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan

- microspheres. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(2):233–9.
208. Coessens P, Herrebout F, De Boever JA, Voorspoels J, Remon JP. Plaque-inhibiting effect of bioadhesive mucosal tablets containing chlorhexidine in a 4-day plaque regrowth model. *Clin Oral Investig.* 2002;6(4):217–22.
209. Madhav NVS, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *J Control Release.* 2009;140(1):2–11.
210. Smart JD. Drug delivery using buccal-adhesive systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1993;11(3):253–70.
211. Gilbert JC, Hadgraft J, Bye A, Brookes LG. Drug release from Pluronic F-127 gels. *Int J Pharm.* 1986;32(2–3):223–8.
212. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709–28.
213. Schmolka IR. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* 1972;6(6):571–82.
214. Liu T, Chu B. Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *J Appl Crystallogr.* 2000;33(3):727–30.
215. Pai-Chie CC, Frank SG. *In vitro* release of lidocaine from Pluronic F-127 gels. *Int J Pharm.* 1981;8(2):89–99.
216. Miyazaki S, Takeuchi S, Yokouchi C, Takada M. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1984;32(10):4205–8.
217. Nalbandian RM, Henry RL, Wilks HS. Pluronic F-127 silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns. *J Biomed Mater Res.* 1972;6(6):583–90.
218. Hadgraft J, Howard JR. Drug release from Pluronic F-127 gels. *J Pharm Pharmacol.* 1986;32(2–3):223–8.

219. Johnston TP, Miller SC. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J Parenter Sci Technol.* 1985;39(2):83–9.
220. Cogger VC, Hilmer SN, Sullivan D, Muller M, Fraser R, Le Couteur DG. Hyperlipidemia and surfactants: The liver sieve is a link. *Atherosclerosis.* 2006;189(2):273–81.
221. GHTF Study Group 1. Information Document Concerning the Definition of the Term “Medical Device.” The Global Harmonization Task Force. 2005.
222. ISO 10993: Biological Evaluation of Medical Devices; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2018.
223. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008;29(20):2941–53.
224. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of Dental Materials. In: Schmalz G, ed. *Determination of Biocompatibility.* 1st ed. Berlin:Springer International Publishing; 2009:13–40
225. Jaeson CT, Paye M, Maibach HI. Principles and Mechanisms of Skin Irritation. In: Barel AO, Paye M, Maibach HI, ed. *Handbook of Cosmetic Science and Technology.* 4th ed. Maibach: CRC Press; 2014:345–53.
226. Brož P, Harr T, Hecking C, et al. Nonirritant intradermal skin test concentrations of ciprofloxacin, clarithromycin, and rifampicin. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2012;67(5):647–52.
227. ISO 10993-10: Biological Evaluation of Medical Devices. *Part 10: Tests for irritation and skin sensitization;* International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2010.
228. Casas JW, Lewerenz GM, Rankin EA, et al. *In vitro* human skin irritation test for evaluation of medical device extracts. *Toxicol In vitro.* 2013;27(8):2175–83.
229. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method 439. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2010

230. The European Commission's science and knowledge service. *EpiSkin™*.
Erişim: 26.06.2019
<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-irritation/episkin>.
231. The European Commission's science and knowledge service. *EpiDerm™*.
Erişim: 26.06.2019
<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-irritation/epiderm>.
232. The European Commission's science and knowledge service. *SkinEthic™*.
Erişim: 26.06.2019
<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-irritation/skinethic>.
233. Namiki N, Takagi N, Yuasa H, Kanaya Y. Studies on development of dosage forms for pediatric use. (V). Oral mucosal irritation study of gummi drugs in hamster cheek pouch. *Biol Pharm Bull*. 1998;21(1):87–9.
234. Anand VP, Cogdill CP, Klausner KA, et al. Reevaluation of ethylene oxide hemolysis and irritation potential. *J Biomed Mater Res*. 2003;64(4):648–54.
235. Piret J, Laforest G, Bussi eres M, Bergeron MG. Subchronic (26- and 52-week) toxicity and irritation studies of a novel microbicidal gel formulation containing sodium lauryl sulfate in animal models. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):164–74.
236. Nakamura T, Masuda M. An approach to oral mucosal irritation test in guinea pigs and rats. *J Jpn Cosmet Sci Soc*. 1994;18(1):1–5.
237. Arvidsson A, Stirling C, Sennerby L, Wennerberg A. Reactions in the oral mucous membrane after exposure to Carisolv - combined results from a clinical screening test in humans and an experimental study in rats. *Gerodontology*. 2001;18(2):109–13.
238. Manabe A, Katsuno K, Kurihara A, et al. Adverse effect of dentine bonding agent on the oral mucosa of guinea pigs. *J Oral Rehabil*. 2001;28(1):88–94.

239. Nixon GA, Buehler E V., Newmann EA. Preliminary safety assessment of disodium etidronate as an additive to experimental oral hygiene products. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1972;22(4):661–71.
240. Müller P, Hepke B, Meldau U, Raabe G. Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute and chronic direct toxic action of different alcohol concentrations. *Exp Pathol.* 1983;24(2–3):171–81.
241. Cutright DE, Perez B, Larson WJ, Posey WR, Hicks JL. The effect of repeated application of mouthwashes to the mucosa of the hamster cheek pouch. *J Oral Med.* 1974;29(2):36–40.
242. Harsanyi BB, Foong WC, Howell RE, Hidi P, Jones DW. Hamster cheek-pouch testing of dental soft polymers. *J Dent Res.* 1991;70(6):991–6.
243. Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(12):1649–57.
244. Overholser CD. Longitudinal clinical studies with antimicrobial mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 1988;15(8):517–9.
245. Cousido MC, Carmona IT, García-Caballero L, Limeres J, Álvarez M, Diz P. *In vivo* substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig.* 2010;14(4):397–402.
246. Lenander-Lumikari M, Tenovuo J, Mikola H. Effects of a lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. *Caries Res.* 1993;27(4):285–91.
247. Matsuzaki K, Sugishita KI, Fujii N, Miyajima K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry.* 1995;34(10):3423–9.
248. Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, Lee BJ. Antimicrobial peptides: Therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(12):1477–86.
249. Costa J, Silva N, Sarmiento B, Pintado M. Delivery systems for antimicrobial

- peptides and proteins: Towards optimization of bioavailability and targeting. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(2):108–20.
250. Chava VK, Vedula BD. Thermo-reversible green tea catechin gel for local application in chronic periodontitis: A 4-week clinical trial. *J Periodontol.* 2013;84(9):1290–6.
251. Sundararaj SC, Thomas M V, Peyyala R, Dziubla TD, Puleo DA. Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. *Biomaterials.* 2013;34(34):8835–42.
252. Garala K, Joshi P, Patel J, Ramkishan A, Shah M. Formulation and evaluation of periodontal *in situ* gel. *Int J Pharm Investig.* 2013;3(1):29–41.
253. Da Rocha HAJ, Silva CF, Santiago FL, Martins LG, Dias PC, De Magalhães D. Local drug delivery systems in the treatment of periodontitis: A literature review. *J Int Acad Periodontol.* 2015;17(3):82–9.
254. Morelli L, Cappelluti MA, Ricotti L, Lenardi C, Gerges I. An injectable system for local and sustained release of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Macromol Biosci.* 2017;17(8):1700103.
255. Rajeshwari HR, Dhamecha D, Jagwani S, et al. Formulation of thermoreversible gel of cranberry juice concentrate: Evaluation, biocompatibility studies and its antimicrobial activity against periodontal pathogens. *Mater Sci Eng C.* 2017;75:1506–14.
256. Gad HA, Kamel AO, Ezzat OM, El Dessouky HF, Sammour OA. Doxycycline hydrochloride-metronidazole solid lipid microparticles gels for treatment of periodontitis: development, *in vitro* and *in vivo* clinical evaluation. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(11):1241–51.
257. Nasra MMA, Khiri HM, Hazzah HA, Abdallah OY. Formulation, *in-vitro* characterization and clinical evaluation of curcumin *in-situ* gel for treatment of periodontitis. *Drug Deliv.* 2017;24(1):133–42.
258. Bansal M, Mittal N, Yadav SK, et al. Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded *in-situ* gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, *in-vitro* characterization and antimicrobial

- study. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2018;8(2):126–33.
259. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive Series: 65. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. International Journal of Food Microbiology. Geneva, Switzerland; 2012.
 260. Frémont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. *Allergy.* 1997;52(2):224–8.
 261. Weinberg ED. The therapeutic potential of lactoferrin. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003;12(5):841–51.
 262. Baert JH, Veys RJ, Ampe K, De Boever JA. The effect of sodium lauryl sulphate and triclosan on hamster cheek pouch mucosa. *Int J Exp Pathol.* 1996;77(2):73–8.
 263. CTFA. CTFA Safety Evaluation Guidelines. In: Cosmetic Toiletry and Fragrance Association. 1981.
 264. Fukui T, Masuno K, Makita Y, et al. Evaluation of oral mucosa irritation produced by ozone gel. *J Hard Tissue Biol.* 2015;24(1):104–6.
 265. Kimoto H, Ito Y, Matsumoto S, Hosoki E. A simple method for oral mucosal irritation test by intraoral instillation in rats. *J Toxicol Sci.* 2016;41(2):233–9.
 266. Niwano Y, Konno K, Matayoshi T, Nakamura K, Kanno T, Sasaki K. Oral mucosal irritation study in hamster to evaluate a therapeutic apparatus using hydrogen peroxide photolysis for periodontitis treatment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017;90:206–13.
 267. Bilbault T, Taylor S, Walker R, Grundy SL, Pappert EJ, Agro A. Buccal mucosal irritation studies of sublingual apomorphine film (APL-130277) in Syrian golden hamsters. *Ther Deliv.* 2016;7(9):611–8.
 268. Shirato M, Nakamura K, Tenkumo T, et al. Oral mucosal irritation potential of antimicrobial chemotherapy involving hydrogen peroxide photolysis with high-power laser irradiation for the treatment of periodontitis. *J Photochem Photobiol*

B. 2019;201:111633

269. Yuca K, Çankaya H, Bayram İ, Özbek H, Kiris M. Local irritant effects of topical oral sprays on oral mucosa in mice. *Adv Ther.* 2006;23(1):98–106.
270. Gürgan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E. Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A double-blind clinical study. *J Periodontol.* 2006;77(3):370–84.
271. Kalteis T, Lüring C, Schaumburger J, Perlick L, Bähis H, Grifka J. Tissue toxicity of antiseptics. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2003;141(2):233–8.
272. Nagasawa M, Hayashi H, Nakayoshi T. *In vitro* evaluation of skin sensitivity of povidone-iodine and other antiseptics using a three-dimensional human skin model. *Dermatology.* 2002;204(S1):109–13.
273. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964;16(10):655–62.
274. Denyer SP. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int Biodeterior Biodegrad.* 1995;36(3–4):227–45.
275. Best AJ, Nixon MF, Taylor GJS. Brief exposure of 0.05% chlorhexidine does not impair non-osteoarthritic human cartilage metabolism. *J Hosp Infect.* 2007;67(1):67–71.
276. Cabral CT, Fernandes MH. *In vitro* comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig.* 2007;11(2):155–64.
277. Babich H, Wurzbürger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol.* 1995;11(2):79–88.
278. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In vitro.* 2008;22(2):308–17.

279. Rajabalian S, Mohammadi M, Mozaffari B. Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. *Indian J Dent Res.* 2009;20(2):169–73.
280. Mariotti AJ, Rumpf DAH. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999;70(12):1443–8.
281. Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: An *in vitro* study. *Indian J Dent Res.* 2008;19(1):29–35.
282. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446–50.
283. Lichtenberg J, Perez Calvo E, Madsen K, et al. Safety evaluation of a novel muramidase for feed application. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017;89:57–69.

8. EK-1: DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI



DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI CERTIFICATE of ANIMAL USE in EXPERIMENTAL RESEARCH

Şila SAATÇIOĞLU

Yeditepe Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulunun Düzenlediği Araştırmacılar İçin 80 Saatlik Laboratuvar Hayvanları Kursunu Tamamlamış ve Kurs Sınavında Başarılı Olmuştur

Has completed the 80 hours course and passed the examination in Laboratory Animal Science organized by the Animal Research Ethics Committee of Yeditepe University

12 - 21 Ocak 2017 / 12 - 21 January, 2017

İstanbul, TÜRKİYE/İstanbul, TURKEY

Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Yeditepe Üniversitesi/Yeditepe University
Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu Başkanı /
Head of the Animal Research Ethics Committee

Prof. Dr. Canan AYKUT BİNGÖL
T.C. Yeditepe Üniversitesi Rektörü
Rector of the Yeditepe University

9. EK-2: ETİK KURUL ONAY BELGESİ



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU (YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
27.07.2018	677	18.06.2018	Doç. Dr. Senem Selvi Kuvvetli

“Lizozim, Laktoferrin ve Taşıyıcı Olarak Poloksamer 407 İçeren Yeni Formülasyonların, Antibakteriyel Etkilerinin ve Biyouyumluluklarının in vivo Koşullarda Değerlendirilmesi” adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 Yıl	Hayvan Türü ve cinsiyeti: Hamster ♀	Hayvan Sayısı: 9
------------------------------------	--	---------------------

GÖREVİ	ADI SOYADI	
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Vet. Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	
Üye	Doç. Dr. Soner DOĞAN	
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	KATILMADI
Üye	Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	KATILMADI
Üye	Hakan GÖKSEL	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şila	Soyadı	Saatcıoğlu
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	22.06.1990
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	45109360266
E-mail	dt.silasaatcioglu@gmail.com	Tel	0(535)3830897

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans / Yüksek Lisans	Diş Hekimliği	Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2014
Lise	-	Özel Esayan Ermeni Lisesi	2008

Bildiği Yabancı Dilleri	Yabancı Dil Sınav Notu (#)
İngilizce	YDS (55)

Bilimsel Çalışmaları

Yayımlanan makaleler

Türkiye Klinikleri - Diş çürüklerinin Önlenmesinde Probiyotiklerin Kullanımı Senem Selvi Kuvvetli, Şila Saatcıoğlu, Necmiye Bulam
--

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

“Ektodermal Displazi: Vaka Serisi” TPD Kongresi, 2015, Kuzey Kıbrıs, Poster sunumu Şila Saatcıoğlu, Didem Özdemir Özenen

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

“Evaluation of physical properties of new generation pulp capping materials”IAPD 2015, Glasgow, UK. Sözlü sunum, Senem Selvi Kuvvetli, İrem Birinci, Şila Saatcıoğlu, Burcu Sanem Turan

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – 2017, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul
Dental Travmatoloji Güncelleme Eğitimi – 2016, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
CEREC Kullanıcı Eğitimi, Uygulamalı Kurs, Sirona, İstanbul, Türkiye