



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**LİZOZİM VE LAKTOFERRİN İÇEREN
YENİ FORMULASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ
VE MUTANS STREPTOKOKLARI İLE
LAKTOBASİLLER ÜZERİNDEKİ
ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
İN VİTRO KOŞULLARDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

KÜBRA TONGUÇ

DANIŞMAN

Prof. Dr. NÜKET SANDALLI

İSTANBUL 2012

ÖZET

Üç yaşın altındaki çocuklarda, gelişmekte olan sürekli dişlerde fluorozis riski oluşturması nedeniyle floridli diş macunu ve uzun süre kullanımındaki yan etkileri ve sitotoksitesi nedeniyle klorheksidinin kullanımı önerilmemektedir. Tükürük proteinlerinden Lizozim ve Laktoferrin içeren bir preparatın küçük çocuklarda diş çürüklerinin önlenmesi için bir çözüm getirebileceği düşünülmektedir. Antimikrobiyal ajanların, poloxamer ve lipozomal taşıyıcı sistemler ile topikal uygulamalarının ağız hastalıklarının tedavisinde etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamızın amacı, Lizozim ile Laktoferrin içeren ve taşıyıcı sistem olarak Pluronic F-127 isimli Poloxamer ve/veya dondurularak kurutulan DOTAP içeren lipozom [Dondurularak kurutulan Lipozomal DOTAP (DLD)] kullanıldığı farklı formülasyonların, diş çürüğüne neden olduğu bilinen *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, ve *Lactobacillus acidophilus* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkilerinin klorheksidin jel ile karşılaştırmalı olarak in vitro koşullarda değerlendirilmesidir.

Çalışmamızdaki formülasyonlar; (1) Sorensen's Çözeltisi tampon olarak, (2) yalnız poloxamer 407'nin kullanıldığı jel şeklinde, (3) Lizozim ve Laktoferrinin tamponda çözdürülerek, (4) Lizozim ve Laktoferrin tamponda çözdürüldükten sonra poloxamer 407 ile birleştirilmesiyle, (5) DLD'nin tamponda çözdürülmesiyle, (6) poloxamer 407 tamponda dağıtıldıktan sonra DLD ile birleştirilmesiyle, (7) Lizozim ve Laktoferrin tamponda çözdürüldükten sonra DLD ile birleştirilerek, (8) Lizozim ve Laktoferrin çözdürüldükten ve poloxamer 407 içerisinde dağıtıldıktan sonra DLD'nin eklenmesiyle sekiz grup olarak hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak % 0,2'lik klorheksidin jel/gargara, pozitif kontrol grubu olarak boş hidroksiapatit diskler kullanılmıştır. Antibakteriyel etkinin değerlendirildiği birinci bölümde, çalışma gruplarının, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus*'a karşı antibakteriyel etki gösteren minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. İkinci bölümde ise, 10 farklı grubun hidroksiapatit diskler üzerinde 24 saatlik *Streptococcus sobrinus* ve *Streptococcus mutans* biyofilm oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

MİK deneyinde, poloxamer içermeyen formülasyonlar suşlara karşı etkili bulunmamıştır. Poloxamer 407 içeren formülasyonlar, Lizozim ve Laktoferrin içeriğinden bağımsız olarak suşlar üzerine inhibisyon göstermiştir. % 0,2'lik klorheksidinin diğer formülasyonlara oranla çok düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür.

Biyofilm deneyinde Poloxamer 407 ile hazırlanan jel formülasyonları *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmlerinin oluşumunu önlemede diğer deney gruplarına göre üstün bulunmuşlardır. Bu gruplar arasında en yüksek etkiyi her iki suş üzerinde de Lizozim, Laktoferrin içeren ve Poloxamerin kullanıldığı grup göstermiştir ($p<0,05$). % 0,2'lik klorheksidin diglukonat'ın biyofilm oluşumunu tam olarak önlediği görülmüştür.

Çalışmamızda antibakteriyel etkinliği gösterilen formülasyonlarda bulunan maddelerin daha uzun süreli etkilerinin anlaşılabilmesi için, ileriki çalışmalarda bu maddelerin etkinliğinin kinetik olarak değerlendirilmesi ve sitotoksitelerinin belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lizozim, Laktoferrin, taşıyıcı sistemler, antibakteriyel etki

SUMMARY

The children under three years old are not suggested to use fluoridated toothpaste because of the risk of fluorosis and chlorhexidine for a long period resulting adverse effects and cytotoxicity. New formulations containing lysozyme and lactoferrin might be effective on preventing tooth decay in small children. Topical application of antimicrobial agents with drug delivery systems such as poloxamer and liposome is used for the treatment of oral diseases.

The aim of this study was to determine the antibacterial effect of different formulations on *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus* among containing lysozyme and lactoferrin and drug delivery system as poloxamer 407 with the trade name of Pluronic F-127 or/and freeze dried liposome containing DOTAP [Freeze dried Liposomal DOTAP (FLD)] in comparison with 0,2 % chlorhexidine.

The formulations were (1) Sorensen's Buffer Solution, (2) the gel formulation containing only poloxamer 407, (3) the formulation dissolving lysozyme and lactoferrin in Sorensen's Buffer Solution, (4) the formulation combined with poloxamer 407 after dissolving lysozyme and lactoferrin in Sorensen's Buffer Solution, (5) the formulation dissolving FLD in Sorensen's Buffer Solution, (6) the formulation combined with FLD after dispersed into the poloxamer 407 in Sorensen's Buffer Solution, (7) the formulation combined with FLD after dissolving lysozyme and lactoferrin in Sorensen's Buffer Solution, (8) the formulation dissolving lysozyme and lactoferrin into Sorensen's Buffer, then incorporating into the poloxamer 407 and combining with FLD. The control group was 0,2% chlorhexidine gel/mouthwash and positive control group consisted of empty hydroxyapatite discs. The antibacterial effect was assessed by determining the Minimal Inhibition Concentrations (MIC) of the test groups on *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus*. The effects of ten groups on biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* for 24 hours on the hydroxyapatite discs were also evaluated.

In MIC experiment, the formulations which do not contain poloxamer 407 showed no inhibition effect on these bacteria. The formulations with poloxamer 407, apart from the content of lysozyme and lactoferrin, inhibited the bacteria. The 0,2 % chlorhexidine was effective on the bacteria at very low concentrations.

In biofilm experiment, the formulations with poloxamer 407 were found more effective in the inhibition of biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* than other groups. Among these, the formulation containing Lysozyme and Lactoferrin with poloxamer 407 exhibited the highest efficiency on these bacteria ($p < 0,05$). In the specimens with chlorhexidine, it was observed that there was no bacterial growth.

The formulations which showed antibacterial effect in the present study, should be further evaluated with regard to longer periods, using kinetic methods. Additionally cytotoxicity should be determined.

Key words: *Lysozyme, Lactoferrin, drug delivery system, antibacterial effect*

TEŞEKKÜR

Tüm ömrüm boyunca mesleki disiplinini örnek alacağım, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim, pedodonti eğitimimde çok büyük emeği olan değerli danışman hocam Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Nüket SANDALLI**'ya,

Böylesine geniş imkanları olan bir fakültede bize çalışma imkanı sunan değerli hocam, dekanımız Sayın **Prof. Dr. Türker SANDALLI**'ya,

Tezimizin laboratuvar kısmının yürütülmesindeki yardımlarından ve gösterdikleri dostluktan ötürü İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Güven KÜLEKÇİ**, **Yrd. Doç. Dr. Nursen TOPÇUOĞLU** ve **laborant Emine MUTLU**'ya,

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

Örneklerimizin elektron mikroskop görüntülerini almamızda bize laboratuvarlarını açan ve destek olan Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Fikrettin Şahin**'e,

Tezimdeki ve pedodonti eğitimimdeki değerli yardımları ve katkılarından dolayı Sayın hocam **Yrd. Doç. Dr. Senem SELVİ KUVVETLİ**'ye,

Öğrencilik ve doktora sürem boyunca ihtiyacım olduğu her an bilgi ve düşüncelerine başvurduğum **Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocalarıma**,

İki yıldır aramızda bulunmasa da manevi desteğini eksik etmeyen, tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın hocam **Doç. Dr. Şule KAVALOĞLU ÇILDIR**'a,

Berber klinikte çalışmayı keyifli hale getirdiğimiz, hastane içerisinde ve dışarısında güzel paylaşımlarımız olan **tüm asistan arkadaşlarıma**,

Doğduğum günden beri sevgi, destek ve anlayışlarını her an hissettiğim, aldığım bütün kararlarda arkamda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan annem **Fatma TONGUÇ** ve babam **Ergin TONGUÇ**'a,

Ailemizden uzakta birbirimize hep destek olduğumuz, kimi zaman kardeşim, kimi zaman arkadaşım olan, **Buşra TONGUÇ**'a,

Doktora eğitimim boyunca her türlü sıkıntımı paylaşan ve desteğini hiç eksik etmeyen nişanlım **Hilmi ALTIN**'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| İÇ KAPAK..... | i |
| ÖZET | iii |
| SUMMARY | v |
| TEŞEKKÜR | vii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| ŞEMA VE ŞEKİLLER LİSTESİ..... | xix |
| RESİMLER LİSTESİ..... | xx |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 7 |
| 2.1. Tükürük..... | 7 |
| 2.1.1. Tükürüğün Fonksiyonları..... | 12 |
| 2.1.1.1. Sindirim..... | 12 |
| 2.1.1.2. Nemlendirme-kayganlaştırma | 12 |
| 2.1.1.3. Yıkayıcı- dilüe edici- maddeleri uzaklaştırıcı etkisi..... | 12 |
| 2.1.1.4. Nötralizasyon-tamponlama | 13 |
| 2.1.1.5. Diş dokularının çözünmesinin önlenmesi ve remineralizasyonu | 14 |
| 2.1.1.6. Tat duyusu algılanması | 14 |
| 2.1.1.7. Antimikrobiyal etki | 14 |
| 2.1.2. Tükürük ve Diş Çürüğü..... | 15 |
| 2.1.3. Tükürük İmmunolojisi | 18 |
| 2.1.4. Tükürükte Bulunan Antimikrobiyal Proteinler | 19 |
| 2.1.4.1. İmmunoglobulin Olmayan Proteinler..... | 19 |
| 2.1.4.1.1. Lizozim | 19 |
| 2.1.4.1.2. Laktoferrin (LF) | 21 |
| 2.1.4.1.3. Peroksidaz | 23 |
| 2.1.4.1.4. Agglutininler | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.1.4.1.4.1. Glikoproteinler | 25 |
| 2.1.4.1.4.2. Müsinler | 25 |
| 2.1.4.1.4.3. Fibronektin | 26 |
| 2.1.4.1.4.4. Sistatinler..... | 26 |
| 2.1.4.2. İmmunoglobulinler..... | 26 |
| 2.1.5. Tükürükte Bulunan Antimikrobiyal Proteinlerin Ağız Diş Sağlığı İle İlişkisi..... | 27 |
| 2.1.6. Ağızda Kullanıma Sunulan Çeşitli Preparatların Antimikrobiyal Etkisinin Değerlendirilmesi..... | 28 |
| 2.1.6.1. Fluorid..... | 28 |
| 2.1.6.2. Klorheksidin..... | 29 |
| 2.1.6.2.1. Stabilitesi..... | 30 |
| 2.1.6.2.2. Antimikrobiyal etkisi | 30 |
| 2.1.6.2.3. Klorheksidin'in etki mekanizması..... | 32 |
| 2.1.6.2.4. Piyasada bulunan Klorheksidin preparatları | 33 |
| 2.1.6.3. Sanguinarine..... | 35 |
| 2.1.6.5. Lizozim, Laktoferrin ve Laktoperoksidaz | 36 |
| 2.1.6.6. Aloe Vera | 37 |
| 2.2. Çeşitli İlaçların Verilmesinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler..... | 38 |
| 2.2.1. Topikal İlaç Taşıyıcı Sistemleri | 39 |
| 2.2.1.1. Cilt içinden..... | 39 |
| 2.2.1.2. Mukozadan..... | 39 |
| 2.2.2. Güncel Olarak kullanılan Formülasyonlar | 40 |
| 2.2.2.1. Tabletler | 40 |
| 2.2.2.2. Spreyler | 40 |
| 2.2.2.3. Antibakteriyel etki gösterenler | 40 |
| 2.2.2.3.1. Ağız gargaraları..... | 40 |
| 2.2.2.3.2. Jeller | 41 |
| 2.2.2.3.2.1. Poloxamer (Pluronic F- 127)..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.2.4. Macunlar | 42 |
| 2.2.2.5. Yamalar | 42 |
| 2.2.2.6. Filmler | 42 |
| 2.2.3. İlaç taşıyıcı vektörleri | 42 |
| 2.2.3.1. Lipozomlar | 43 |
| 2.2.3.2. Lipozom karakterizasyonu | 45 |
| 2.2.4. Lipozom ve poloxamer formülasyonlarının topikal uygulamaları | 46 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 48 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılacak Olan Formülasyonların Hazırlanması | 48 |
| 3.1.1. Sorensen's Fosfat Çözeltisinin Hazırlanması (fosfat ile sodyum tuzları karışımı).... | 49 |
| 3.1.2. Pluronic® F- 127 (Poloxamer) Hazırlanması..... | 49 |
| 3.1.3. Lizozim ve Laktoferrinin Tampon Solusyonunda Hazırlanması | 50 |
| 3.1.4. Lizozim ve Laktoferrinin Pluronic® 127 (Poloxamer) ile Hazırlanması | 50 |
| 3.1.5. Lipozom Formülasyonu | 50 |
| 3.1.6. Lipozomal jel sistemler | 52 |
| 3.1.7. Lipozomal Lizozim ve Laktoferrin içeren Formülasyonun Hazırlanması | 53 |
| 3.1.8. Lizozim ve Laktoferrinin Lipozomal Jel Sistemler ile Hazırlanması | 53 |
| 3.2. Antibakteriyel etkinin değerlendirilmesi..... | 56 |
| 3.2.1. İnokulumun Hazırlanması | 56 |
| 3.2.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Deneyi | 57 |
| 3.2.3. İn vitro Biyofilm Oluşumunun İnhibisyonu Çalışması | 58 |
| 3.2.3.1. Biyofilmlerin Scanning Electron Mikroskopunda (SEM'de) İncelenmesi | 62 |
| 3.3. İstatistiksel Değerlendirme..... | 63 |
| 4. BULGULAR..... | 64 |
| 4.1. Minimal İnhibitör Konsantrasyon Deneyinin Bulguları | 64 |
| 4.2. Biyofilm Deneyinin Bulguları..... | 67 |
| 4.3. Scanning Electron Mikroskopu (SEM) Görüntüleri | 79 |
| 5. TARTIŞMA..... | 82 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Çalışma Yöntemlerinin Tartışılması | 83 |
| 5.3. Etken Maddelerin (Lizozim ve Laktoferin'in) Antibakteriyel Etkilerinin Tartışılması ... | 85 |
| 5.4. Taşıyıcı Sistemlerin Tartışılması..... | 87 |
| 5.4.1. Lipozomal Taşıyıcı Sistemlerin Tartışılması | 87 |
| 5.4.2. Poloxamer 407 (jel) Polimer Sistemlerinin Tartışılması..... | 88 |
| 5.5. Klorheksidinin Antibakteriyel Etkisinin Tartışılması | 89 |
| 5.6. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu Deneyinin Bulgularının Tartışılması | 90 |
| 5.7. Biyofilm Deneyi Bulgularının Tartışılması..... | 92 |
| 6. SONUÇLAR | 96 |
| 7. KAYNAKLAR | 98 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ..... | 116 |

KISALTMALAR

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | : <i>Aggregatibacter (Actinobacillus)</i> <i>actinomycetemcomitans</i> |
| <i>A. viscosus</i> | : <i>Actinomyces viscosus</i> |
| BHI | : Brain Heart Infusion |
| CO₂ | : Karbondioksit |
| <i>C. albicans</i> | : <i>Candida albicans</i> |
| cfu | : colony forming unit |
| CHX | : Klorheksidin |
| dk | : dakika |
| DMFS | : Çürük, çekilmiş, dolgulu diş yüzeyi |
| DOS | : Dişeti oluğu sıvısı |
| DLD | : Dondurularak kurutulan Lipozomal DOTAP |
| EÇÇ | : Erken çocukluk çağı çürükleri |
| <i>E. faecalis</i> | : <i>Enterococcus faecalis</i> |
| FLD | : Freeze dried Liposomal DOTAP |
| HCO₃⁻ | : Bikarbonat |
| g | : gram |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| g/mol | : Gram/mol |
| HA | : Hidroksiapatit |
| Histatin | : Histidinden zengin protein |
| H₂ | : Hidrojen |
| H₂O₂ | : Hidrojen peroksit |
| IA | : inhibisyon aktivitesi |
| IgA | : İmmunoglobulin A |
| IgD | : İmmunoglobulin D |
| IgE | : İmmunoglobulin E |
| IgG | : İmmunoglobulin G |
| IgM | : İmmunoglobulin M |
| sIgA | : Sekretuar IgA |
| LF | : Laktoferrin |
| <i>L. casei</i> | : <i>Lactobacillus casei</i> |
| <i>L. paracasei</i> | : <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| <i>L. fermentum</i> | : <i>Lactobacillus fermentum</i> |
| <i>L.acidophilus</i> | : <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| LPO | : Laktoperoksidaz |

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| MIK | : Minimal inhibitör konsantrasyonu |
| MPO | : Miyeloperoksidaz |
| MS | : Mutans streptokokları |
| mg | : miligram |
| mL | : mililitre |
| L | : litre |
| µg | : mikrogram |
| µm | : mikrometre |
| µl | : mikrolitre |
| M | : mol |
| nm | : nanometre |
| mm | : milimetre |
| N₂ | : Nitrojen (Azot) |
| NaF | : Sodyum florid |
| OD | : optik yoğunluk |
| PMN | : Polimorfonükleer |
| PRP | : Prolinden zengin protein |
| Qs | : Gerektiği kadar kullanılan miktar |

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| SEM | : Scanning Electron Mikroskobu |
| <i>S. mutans</i> | : <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>S. sobrinus</i> | : <i>Streptococcus sobrinus</i> |
| <i>S. sanguinis</i> | : <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| <i>S. mitis</i> | : <i>Streptococcus mitis</i> |
| <i>S. salivarius</i> | : <i>Streptococcus salivarius</i> |
| <i>S. oralis</i> | : <i>Streptococcus oralis</i> |
| <i>S. gordonii</i> | : <i>Streptococcus gordonii</i> |
| <i>S. aureus</i> | : <i>Staphylococcus aureus</i> |
| °C | : santigrat derece |
| s | : saniye |
| SCN ⁻ | : Tiosiyanat |
| TPO | : Tükürük peroksidazı |
| TSB | : triptik soy brot besi yeri |
| W | : watt |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|-----------|
| Tablo 1. İnsan tükürüğünde bulunan büyük antimikrobiyal proteinler (33) | 9 |
| Tablo 2. Tükürük bezlerinden salgılanan antimikrobiyal proteinler (35)..... | 11 |
| Tablo 3. Tükürüğün fonksiyonları ve içeriğindeki maddeler ile ilişkisi (35)..... | 13 |
| Tablo 4. İnsanlarda diş çürüğü ile ilgili bulunan bakteri türleri (46)..... | 17 |
| Tablo 5. Formulasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları ve üretici firmaları .. | 48 |
| Tablo 6. Laktoferrin ve Lizozim içeren dört farklı taşıyıcı sistem şeklindeki formülasyonlar, içerikleri ve kodları | 54 |
| Tablo 7. Sekiz farklı formülasyonun ve klorheksidin kontrol grubunun <i>S. sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> ve <i>L. acidophilus</i> suşlarına karşı etkisinin görüldüğü minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri (MİK) | 65 |
| Tablo 8. Deney ve kontrol grupları üzerinde oluşturulan <i>S. sobrinus</i> biyofilmindeki canlı bakteri miktarı (cfu/mL). Kruskal Wallis testi ile deney ve kontrol gruplarının karşılaştırılması. | 68 |
| Tablo 9. Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre <i>S. sobrinus</i> biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının gruplar arası ikili karşılaştırılması. | 70 |
| Tablo 10. Deney ve kontrol grupları üzerinde oluşturulan <i>S. mutans</i> biyofilmindeki canlı bakteri miktarı (cfu/mL). Kruskal Wallis testi ile deney ve kontrol gruplarının karşılaştırılması. | 74 |
| Tablo 11. Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre <i>S. mutans</i> biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının grupların kendi aralarında ikili karşılaştırılması..... | 76 |

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. Deney ve kontrol gruplarının *S. sobrinus* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının geometrik ortalamaları. 69

Grafik 2. Deney ve kontrol gruplarının *S. mutans* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının geometrik ortalamaları. 75

ŞEMA VE ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|-----------|
| Şekil 1. LF'nin antibakteriyel etki mekanizması. (A) Gram pozitif bakteri: LF, hücre zarının lipotekhoik asit gibi negatif yüklü moleküllerine bağlanarak hücre zarını nötralize eder ve lizozim gibi antibakteriyel ürünlerin hareketine izin verir. (B) Gram negatif bakteri: LF, lipopolisakkaritin A lipidine bağlanarak, bu yağın serbest kalmasına neden olur ve bunun neticesinde hücre zarı zarar görür | 23 |
| Şekil 2. Klorheksidinin molekül formülü | 30 |
| Şekil 3. Membranın Sıvı – Mozaik Modeli | 44 |
| Şekil 4. Lipozom Modeli | 45 |
| Şekil 5. Elektron mikroskobunda lipozomun görünümü | 45 |
| Şekil 6. DOTAP yapısı | 46 |
| Şema 1. Çalışmanın akış şeması..... | 55 |

RESİMLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Resim 1. Pluronic® F-127 (SIGMA®-ALDRICH, BASF Corp, USA)..... | 49 |
| Resim 2. Tavuk yumurtasından elde edilen Lizozim (L6876-1G, SIGMA®-ALDRICH, USA) ve insan sütünden elde edilen Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA®-ALDRICH, USA)..... | 50 |
| Resim 3. DOTAP Chloride D6182, SIGMA®-ALDRICH, USA. | 51 |
| Resim 4. Uçan maddenin yoğunlaşarak toplanmasını sağlamak amacıyla Rotavaporda (Heidolph® Rotavapor, Lauda Alpha RA8) oda sıcaklığında azot vakum altında uçurma işlemi. | 52 |
| Resim 5. Tip Sonikasyon (BANDELİN® electronic D-12207, Berlin, Germany). | 52 |
| Resim 6. Lipozomun liyofilizasyonu..... | 53 |
| Resim 7. 37°C'lik etüv | 56 |
| Resim 8, 9. 96 kuyucuklu steril mikropleyt kuyucuklarında çalışma grupları için ikişer sıra BHI buyyon kullanılarak 200 µl'lik hacimde iki katlı sulandırılmaları | 57 |
| Resim 10. % 0,2'lik klorheksidin glukonat içeren 400 mg/200 mL (Klorhex® , Drogsan)..... | 58 |
| Resim 11, 12, 13. Mikropleyt Spektrofotometresi (Uniquely Tecan Freedom EVO®, Mannedorf, Switzerland) ile 620 nm dalga boyunda Magellan Programı kullanımıyla optik yoğunluk (OD) ölçülerek bakteriyel üremenin değerlendirilmesi | 58 |
| Resim 14. Klorheksidin jel (Cervitec® Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)..... | 59 |
| Resim 15, 16, 17. Mikropleytlar içerisinde 12 mm çapında ve 1 mm kalınlığında hazır olarak alınan seramik kaplı hidroksiapatit diskleri | 60 |
| Resim 18. İn vitro biyofilm oluşumu için % 4'lük sakkaroz ilave edilen 1,6 ml BHI buyyon ve 200 µl bakteri süspansiyonunun diskler üzerine eklenmesi | 60 |
| Resim 19, 20, 21. % 5 CO ₂ 'li ortama alınan örneklerin 24 saat etüvde 37°C'de inkübasyonu .. | 60 |
| Resim 22, 23, 24. 24 saatlik biyofilm incelemesi için diskler steril tuzlu su ile yıkanması sonucu yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması ile diske tutan bakterilerin görünür hale gelmesi..... | 61 |
| Resim 25, 26. Hidroksiapatit disklere yapışık bakterileri elde etmek için her bir diskin 1,5 mL steril tuzlu su ve cam boncuklar içeren bir cam tüpe aktarılması | 61 |
| Resim 27. Cam tüpe aktarılan hidroksiapatit disklerin 1 dakika boyunca vortexlenmesi (Elektro.mag MIG)..... | 62 |
| Resim 28. Solusyonların, steril tuzlu su ile 8 katlı (10 ⁻⁸) seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra BHI agara ekimi | 62 |
| Resim 29. Deney ve kontrol gruplarının uygulandığı 24 saatlik <i>S. sobrinus</i> (ATCC 33478) biyofilmlerinin Scanning Electron Mikroskopundaki (ZEISS®) görüntüleri: (A). 1. Grup'taki | |

formulasyonun; (B) 2. Grup'taki formulasyonun; (C) 3. Grup'taki formulasyonun; (D) 4. Grup'taki formulasyonun; (E) 5. Grup'taki formulasyonun; (F) 6. Grup'taki formulasyonun; (G) 7. Grup'taki formulasyonun; (H) 8. Grup'taki formulasyonun; (I) 9. Grup'taki formulasyonun; (İ) 10. Grup'taki formulasyonun *S. sobrinus* biyofilmi oluşumu üzerindeki etkisinin SEM'de x 5000 büyütmede 'Smart SEM User Interface' bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmesi..... **80**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız boşluğu, hem yumuşak hem katı yüzeyleri birlikte barındırması, yüzeyleri yıkayan tükürük ve dişeti oluk sıvısının varlığı ve dış ortama açık olması özellikleriyle eşsiz bir yapıdır. Ekolojik olarak çok farklı mikro çevrelerden oluşur; bu nedenle çok çeşitli mikrofloralar içerir. Yanak epitel, dil sırtı, supragingival ve subgingival bölgeler birbirinden belirgin olarak farklı dört ana ekosistemdir. Supragingival bölge (diş etinin üstünde kalan diş yüzeyleri) tükürük ve yiyecek içeceklerle yıkanır ve çiğneme gibi mekanik etkilere maruz kalırken; subgingival bölge (dişetin altında kalan dişeti olukları ya da periodontal cepler) dişeti oluk sıvısı ile yıkanır (1).

Ağızda bulunan mikroorganizmaların çoğu, biyofilm olarak adlandırılan bir yüzeye yapışık mikroorganizma topluluklarına aittir (1). Ağız boşluğu, yaşam süresince değişen karışık bir ekosistemde farklı türde mikroorganizma topluluklarından oluşmaktadır. Ağız mikroflorası bilinen en karmaşık bakteri türlerini barındırmaktadır (2). Ağız mikroflorasında normal olarak sürekli bulunan yüksek sayılardaki mikroorganizmalar topluluğu, büyük ölçüde konak üzerinde ya da içinde yaşayan ancak, konakçısına zarar vermeyen organizmalar olan kommensal bakterilerden ve az sayıdaki mayalardan oluşur. Bunlar içinde sayıca az ek mikroflora olarak tanımlanan türler de bulunur. Bu türler çevre kendilerine uygun olarak değiştiğinde mikrofloraya dahil olabilirler. Kommensal türler, çevredeki değişiklikler ya da kişinin yetersiz ağız hijyenine bağlı olarak patojen hale gelebilirler (1). Ağız ortamında en sık rastlanılan türler *Streptococcus*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Porphyromonas* ve *Haemophilus* 'tur. Kommensal streptokoklar zamanla daha karmaşık hale gelen ağız bakteri florasının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır (3). Ağızda bulunan kommensal bakteriler, çoğunlukla mukoza ve diş yüzeylerindeki biyofilmde yer alırlar. Bu flora, ayrıca organizmayı *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. Faecalis*), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria* türleri, Enterobacteriaceae ailesi, *Haemophilus influenzae* ve actinomycetes gibi patojen bakterilerin koloni oluşumlarından korumaktadır. Bakteri içeriği ağız boşluğunun farklı bölgelerinde beslenme koşullarına, tükürük akış hızına, konağın diş ve dişeti sağlığına, diyetine ve yaşına bağlı olarak farklılık göstermektedir (4).

Tükürük, çok çeşitli enzimleri, hormonları, antikorları, antimikrobiyal bileşenleri ve sitokinleri içeren kompleks bir sıvıdır. Tükürükte fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı ağız mukozası ve dişlerin bütünlüğünün sürdürülmesine yardımcı olan çeşitli proteinler bulunur. Bu proteinler, immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin G (IgG) ve immunoglobulin M (IgM) gibi immunoglobulinler; aglutinin ve müsinler, lizozim, laktoferrin (LF) ve laktoperoksidaz gibi immunoglobulin olmayan proteinler; histatinler, sistatinler, defensinler, katelisin gibi peptidler olarak sıralanmaktadır (5, 6).

Tükürüğün kendi savunma sistemlerinin yetmediği durumlarda, ağız boşluğunda görülen ülser, mantar ve bakteriyel enfeksiyonların ve diş çürüğü ile periodontal hastalıkların tedavisinde ilaçların lokal uygulamaları sıklıkla kullanılmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, bir ilacın vücuda kolayca alınmasını ve hedef bölgeye ulaşmasını sağlarlar. Bir ilacın taşıma sistemi, ilacın kontrollü salıverilmesinde, hedefe ulaşmasında ve onun etki göstermesinde önemli bir yere sahiptir. İlacın kaybını azaltmak, zararlı yan etkileri minimuma indirmektir. İlaçların biyoyararlanımını arttırmak amacıyla çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler bulunmakta ve bunların yeni örnekleri geliştirilmektedir (7). İlaç taşıyıcı sistemler, ağız boşluğundan kolayca geçebilmelerine karşın, ilaç moleküllerinin tükürük akışıyla hızlıca ortamdan uzaklaştırılması önemli bir problem oluşturmaktadır (8). Bu nedenle ağız mukozasına yerleştirilen ilaç taşıyıcı sistem yamaları yerine taşıyıcı sistem olarak jel sistemlerinden biri olan poloxamerler ve nanopartiküllerden lipozomlar yaygın olarak tercih edilmektedir (9).

Lipozomla kaplı ilaç moleküllerinin ağız mukozasındaki inflamasyonu azalttığı ve karyojenik mikroorganizmaların diş minesine tutunmasını engelleyerek mine yapısında bozulmaları önlediği bildirilmiştir (8).

Geleneksel sistemlerin (diş macunu, ağız gargaraları gibi) dezavantajlarından biri, tükürük akışı veya aralıklarla görülen yutkunma ile ağız boşluğundan kısa sürede uzaklaştırılmalarıdır. Yeni bir yaklaşım olan lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı diş hekimliğinde kabul görmektedir (10). Yapılan in vitro çalışmalarda, lipozomların diş minesinin hidroksiapatit (HA) yapısına tutunduğu görülmüştür. Lipozomların antibakteriyel etki gösteren ajanları kaplayabilme özelliğinin yanı sıra,

mine yüzeyini sararak fiziksel bozulmalara karşı yüzeyi koruyabilmesi de önemli bir avantaj olarak öne çıkmaktadır (8).

Lipozomların hidrofobik ve hidrofilik ilaçları uzun süre taşıyabilme özellikleri ve ilacın direkt diş yüzeyiyle temasını keserek ilaçların yan etkilerinden koruyabilmeleri nedeniyle diş hekimliğinde kullanımı tercih edilmektedir (11).

Triclosan içeren ve taşıyıcı sistem olarak lipozomun kullanıldığı bir ticari diş macununun *S. mutans* ve *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) suşlarına, serbest halde bulunan formuna oranla daha etkili olduğu görülmüştür (11).

Klorheksidin (CHX) içeren preparatların, diş biyofilmine ve ağız diş sağlığına etkisi diş hekimliği literatüründe önemli yer tutan bir araştırma konusu olmuştur. Ağızdaki farklı yüzeylere tutunabilme özelliği ve geniş bir pH aralığında yüksek antimikrobiyal etki göstermesi nedeniyle CHX'in kullanımı tercih edilmektedir. Katyonik olması negatif yüklü yüzeylerin karboksil, fosfat ve hidroksil gruplarına bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu özelliği ağız mukozasına bağlanmasını ve uzun süre ağız boşluğunda kalabilmesini sağlamaktadır (12). Yapılan çalışmalarda, CHX'in dişlerde biyofilm oluşumu üzerinde en etkili antimikrobiyal ajanlardan biri olduğu görülmüştür (13).

Klorheksidin ağız boşluğundaki MS'lerin ortamdan uzaklaştırılmasında etkili olan topikal antimikrobiyal bir ajandır. Yapılan çalışmalarda, CHX'in MS sayılarında azalmaya neden olduğu görülse de, CHX gargara kullanımında 2 hafta içinde, jel uygulandığında 4 hafta içinde, verni uygulandığında ise 12 hafta içinde bu sayılarda başlangıç değerlerine geri dönüş olduğu görülmüştür. Bu sonucun, dental biyofilmdeki MS'lerin antimikrobiyal ajanlara direnç göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (14).

CHX'in bir taşıyıcı sistem (3DS) ile uygulandığı bir çalışmada, bu sistemlerin ağız ortamında uygulamalarının ümit verici olduğu görülmüştür. Düşük konsantrasyonlu CHX ile kullanılan bu taşıyıcı sistemlerin ağız ortamındaki MS

değerlerinde etkili bir şekilde azalmaya neden olduğu ve yan etkilerinin bulunmadığı saptanmıştır (15).

Mikroorganizmalara karşı direnç gelişmesi ve ağızdaki ekolojik dengeyi tahmin edilemez yönde değiştirmesi nedeniyle antibiyotikler mekanik temizlemeye eşlik etmesi açısından önerilmemektedir (16). Tükürük peroksidaz sistemi in vivo koşullarda, küçük miktarda hidrojen peroksit meydana getiren enzimlerin diş macununa ilave edilmesiyle geliştirilebilmektedir (17).

Tükürük peroksidaz sisteminin bütün bileşenlerini peroksidaz enzimi [laktoperoksidaz (LPO), Tiosiyanat (SCN^-) iyonu ve sodyum monofluorofosfat ve ksilitol gibi diğer profilaktik ajanlarla bağlanan hidrojen peroksidi oluşturan enzimler], lizozim ve LF içeren bir diş macununun (Biotene®) ağızdaki mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada düşük tükürük akış hızının görüldüğü hastalarda tükürük Tiosiyanat (SCN^-) iyonunun konsantrasyonunda bir artış görülürken tükürük mikroflorasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (17).

Erken çocukluk çağı, süt dişlenme döneminde çürüğe neden olan bakterilerin kolonize olduğu önemli bir süreçtir. Bu dönemde tükürükte bulunan antimikrobiyal faktörler erken dönemde görülen bu kolonizasyonu etkileyebilmektedir (18). Bebeklerde ve küçük çocuklarda görülen erken çocukluk çağı çürükleri (EÇÇ), sosyoekonomik, davranışsal, beslenme ile ve ağızdaki ekoloji (ağız mikroflorası) ile ilgili etiyolojik faktörlerin bir araya gelmesi sonucu meydana gelmektedir. EÇÇ'nin, karyojenik besinlerin uzun süre ve sık tüketilmesi sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bununla birlikte beslenme etiyolojik faktörlerden yalnızca biridir. Mutans streptokokları (MS) EÇÇ'nin görüldüğü çocuklarda rastlandığı bilinen mikroorganizma grubudur. MS, çürük lezyonlarını başlatmakta ve Lactobasiller diş çürüklerini ilerletmektedir (19). EÇÇ'nin etiyolojisinde yatan temel faktörün dental plak olduğu bilinmektedir. Mekanik diş temizliğine ek olarak antimikrobiyal ajanlar içeren diş macunlarının kullanımı dental plağın kontrol altına alınmasında büyük katkıda bulunmaktadır. Lizozim ve LF gibi antimikrobiyal proteinler, ağız ve diş sağlığı için üretilen diş macunları ve ağız gargalarına ilave edilmektedir. Günümüzde bu proteinlerin bulunduğu bazı ticari ürünler piyasaya sunulmuştur (Biotene®, BioXtra® ve Zendium Saliva®) (20).

3 yaşın altındaki çocuklarda yutma refleksinin gelişmemiş olması nedeniyle floridli diş macunu kullanımı gelişmekte olan sürekli dişlerde fluorozis riski doğurmaktadır (21). Diğer taraftan, antimikrobiyal etkinliği yapılan çalışmalarda görülmüş olan CHX'in jel veya verni formu çocuklarda kullanılabilir. Ancak, CHX'in uzun süre kullanımının ağız mukozasında lokal olarak olumsuz yan etkiler bırakması, dişlerde renkleşmeye neden olması ve sitotoksik etkileri nedeniyle çocuklarda erken dönemde görülen çürüklerin önlenmesinde etkili olabilecek ve antibakteriyel etkiye sahip yeni ürünlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu dönemde tükürük proteinlerinden Lizozim ve Laktoferrin içeren bir preparat kullanımı erken çocukluk dönemi çürüklerinin önüne geçilmesi için bir çözüm getirebileceği düşünülmektedir (14, 22).

Piyasada içeriğine tükürük proteinlerinin eklendiği çeşitli ticari ürünler bulunmaktadır. Ancak, bu ürünlerin etkileri incelendiğinde diş çürüğünün oluşumunda rol oynayan temel patojen suşlar üzerine etkilerinin yetersiz kaldığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (20). Bu nedenle, daha çok geliştirilmeleri gerektiği düşünülmektedir. Son yıllarda yeni bir yaklaşım olarak antimikrobiyal ajanların ilaç taşıyıcı sistemler ile uygulanması gündeme gelmiştir (23). Bu konuda diş hekimliği literatüründe yayımlanmış çok sayıda çalışma olmamakla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda topikal olarak uygulanan poloxamer ve lipozom gibi taşıyıcı sistemlerin periodontal hastalıkların ve ağız boşluğunda görülen enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Bu sistemlerin en önemli avantajı, biyoaktif ajanı direkt olarak gerekli bölgeye taşınmaları ve uzun süre o bölgede ihtiyaç olan konsantrasyonu koruyabilmeleri olarak bildirilmektedir (24).

Günümüzde, diş hekimliği literatüründe Lizozim ve/veya Laktoferrin içeren, diş macunları dışında farklı taşıyıcı sistemlerin antimikrobiyal etkisinin karşılaştırıldığı yayımlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Lizozim ile Laktoferrin içeren ve taşıyıcı sistem olarak Pluronic F-127 isimli Poloxamer 407 polimeri ve/veya lipozomun (DLD) kullanıldığı farklı formülasyonların, mikrobiyal dental plakta bulunan ve diş çürüğüne neden olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans*, ve *L. acidophilus* bakteri suşları üzerindeki

antibakteriyel etkilerinin % 0,2'lik klorheksidin jel/gargara ile karşılaştirmalı olarak in vitro koşullarda değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürük

Bileşiminin % 99'u su, % 1'i ise büyük organik moleküller olan tükürük kompleks bir sekresyondur. Toplam organik bileşikler litrede 5 g, inorganik bileşikler ise bunu yarısı kadardır. Büyük organik moleküller proteinler, glikoproteinler, lipitler; küçük organik moleküller ise glikoz ve üredir. Bundan başka kalsiyum, klor, fosfat, SCN^- başta olmak üzere diğer elementler de tükürüğün inorganik maddeleridir (25).

Organik moleküllerin çoğu asiner hücrelerinde bir bölümü kanallarda sentezlenir, bir bölümü ise kandan tükürük içine transport edilir. Tükürük sekresyonuna kandan transport edilen moleküller büyük elektrolitler, albumin, IgA, IgG, IgM; vitaminler, ilaçlar, hormonlar ve sudur (25).

Ağız sıvılarının karışımının tümü 'miks tükürük' olarak adlandırılır. İnsan tükürüğü parotid, submandilar, sublingual ve diğer küçük tükürük bezlerinden elde edilen salgıların karışımından oluşan hafif oranda asidik pH'ya (pH: 6,0-7,0) sahip biyolojik bir sıvıdır. Tükürüğün yaklaşık % 65'i submandibular bezlerden, % 23'ü parotis bezinden, % 8'i minör müköz bezlerden, % 4'ü ise sublingual bezlerden salgılanır. Bu büyük ve küçük tükürük bezlerinin salgılarına ek olarak, dişeti eksudası mikroorganizmalar ve onların ürünleri, deskuame epitelyum hücreleri ve hücresel komponentleri, yiyecek artıkları, virüsler ve mantarlar, serum ve kan hücreleri ve hatta nazal eksuda gibi tükürük orijinli olmayan sıvılar ve elemanlar da tükürüğün içeriğine karışır. Bu karışım halindeki ağız sıvısı, birçok fizyolojik fonksiyonu (tad alma, besinlerin yutulması ve sindirimi, doku kayganlığı, diş dokularının korunması, antibakteriyel ve antiviral koruma) yerine getirmektedir (26).

Tükürük, çok çeşitli enzimleri, hormonları, antikorları, antimikrobiyal bileşenleri ve sitokinleri içeren kompleks bir sıvıdır (27, 28). Bunların birçoğu pasif hücre içi difüzyonu ve aktif taşıma ile hücrelerden veya hücre dışı ultra filtrasyon ile hücreler arası yollarla kandan tükürük bezlerine ve dişeti oluşuna doğru ilerleyerek tükürüğe geçiş göstermektedir (29, 30, 31). Dolayısıyla, kanda bulunan birçok içerik tükürükte de

görülmektedir. Buna bağlı olarak, tükürük vücudun duygusal, hormonal, besinsel ve metabolik değişikliklerini içeren fizyolojik durumunu yansıtabilmektedir. Sonuç olarak, bu sıvı ağız ve sistemik sağlık durumu hakkında bir bilgi verebilmektedir (32).

Ağız boşluğında çok sayıda görevi bulunan tükürüğün fonksiyonlarından biri sert ve yumuşak dokuların korunmasıdır (33). Bu fonksiyon içeriğindeki proteinler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu proteinler, IgA, IgG ve IgM gibi immunoglobulinler; aglutinin ve müsinler, lizozim, LF ve LPO gibi immunoglobulin olmayan proteinler; histatinler, sistatinler, defensinler, katelisidin gibi peptidler olarak sıralanmaktadır (Tablo 1) (5, 6).

Tablo 1. İnsan tükürüğünde bulunan büyük antimikrobiyal proteinler (33)

| Protein | Temel hedef/ fonksiyon |
|---|--|
| Immunoglobulin olmayan proteinler | |
| Lizozim | Gram pozitif bakteriler, Candida türleri |
| Laktoferrin | Gram pozitif ve negatif bakteriler |
| Tükürük peroksidazı ve miyeloperoksidaz | Antimikrobiyal, hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) ayrışması |
| Agglutininler | Mikroorganizmaların agglutinasyonu ve agregasyonu |
| Tükürük glikoproteinleri | |
| Müsinler | |
| Fibronektin | |
| Histidinden zengin proteinler (histatinler) | Antibakteriyel, antifungal |
| Sistatinler | Antiviral |
| Immunoglobulinler | |
| IgA | Adezyonun inhibe edilmesi |
| IgG | Fagositozun arttırılması |
| IgM | Fagositozun arttırılması |

Tükürüğün varlığı ağız boşluğundaki dokuların sağlığının korunmasında hayati önem taşır. Tükürük salgısının ciddi şekilde azalması sadece oral dokuların korunmasında olumsuzluk yaratmakla kalmaz, hastanın yaşam kalitesini ileri derecede olumsuz etkiler. Ağız kuruluğundan şikayet eden hastalarda yemek yeme, yutkunma, konuşma gibi normal faaliyetler zorlaşır, protezlerin tutuculuğu zayıflar, tat alma hassasiyeti geriler, ağız hijyeni kötüleşir, oral mukozanın travmatize olma ve ülserasyon

gelişme sıklığı, ağızda yanma hissi, mantar enfeksiyonları diş çürüklerinde hızlanma gibi rahatsızlıklar artar (34).

Ağız boşluğu, çok sayıda farklı mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Bir bölümü hala tanımlanamamış olan bu mikroorganizmalardan bazıları da ağızda geçici olarak bulunmaktadır. Bu kadar çeşitli potansiyel patojene karşı ağızda da farklı savunma mekanizmalarının hazır bulunması gerekmektedir. Farklı tipteki tükürük bezlerinin herbiri, kendilerine özel salgılama özelliğine sahiptir. Böylece, tüm tükürükte antimikrobiyal proteinlerden oluşan savunma gücü, farklı bezlerin katılımı ile tamamlanmaktadır. Sonuç olarak, tek bir antimikrobiyal proteinin konsantrasyonu gün içerisinde salgı bezlerinin aktivitesine bağlı olarak değişmektedir (Tablo 2) (35).

Tükürüğün ağızdaki koruyucu etkisini bir takım savunma sistemleri oluşturmaktadır. Bu sistemlere örnek olarak, asidi nötralize eden bikarbonat/karbonat tamponlama sistemi, diş minesinin yüzeyinde koruyucu bir örtü oluşturarak asidin diffüzyonunu önleyen spesifik proteinler ve bunların yanısıra, enfeksiyonları önleyen antimikrobiyal proteinler ve peptidler sayılabilmektedir (35).

Tablo 2. Tükürük bezlerinden salgılanan antimikrobiyal proteinler (35)

| TÜKÜRÜK (GLİKO) PROTEİNLERİ | KAYNAĞINI ALDIĞI DOKU | ORANI % |
|--------------------------------|---|---------|
| MUC5B (müsin MG1) | bütün muköz tükürük bezlerinden | 5-20 |
| MUC7 (müsin MG2) | bütün muköz tükürük bezlerinden | 5-20 |
| Immunoglobulinler | B lenfositleri: bütün muköz tükürük bezlerinden | 5-15 |
| Prolinden zengin glikoprotein | parotis bezi | 1-10 |
| Sistatinler | submandibular > sublingual | 10 |
| Histatinler | parotis ve submandibular bezler | 5 |
| EP-GP | submandibular ve sublingual bezler | 1-2 |
| Agglutinin | parotis > submandibular > sublingual | 1-2 |
| Lizozim | sublingual > submandibular, parotis | 1-2 |
| LF | bütün tükürük bezlerinden: muköz > seröz | 1-2 |
| LPO | parotis > submandibular | < 1 |
| Kathelisidin | tükürük bezlerinden, nötrofillerden | < 1 |
| Defensinler | tükürük bezlerinden, nötrofillerden | < 1 |

2.1.1. Tükürüğün Fonksiyonları

2.1.1.1. Sindirim

Tükürükte bulunan amilaz enzimi nişastanın sindirimini sağlar. Bu mekanizmanın etkinliği, besinlerin özellikleri, içeriğindeki karbohidrat miktarı, enzimlerin yıkım derecesi, bakterilerin şekeri kullanım oranı, tükürük akış hızı ve tükürük hacmi ile belirlenmektedir (36).

2.1.1.2. Nemlendirme-kayganlaştırma

Tükürük viskoelastik özellikleri ile lokmanın oluşturulması, çiğneme, konuşma ve yutma işlevlerini kolaylaştırır. İçerdiği su ve glikoproteinlerin yardımı ile sert ve yumuşak dokuları örter, nemli tutar, besinlerin hasar vermesini ve hassas ağız mukozasının dehidrate olmasını önler (36).

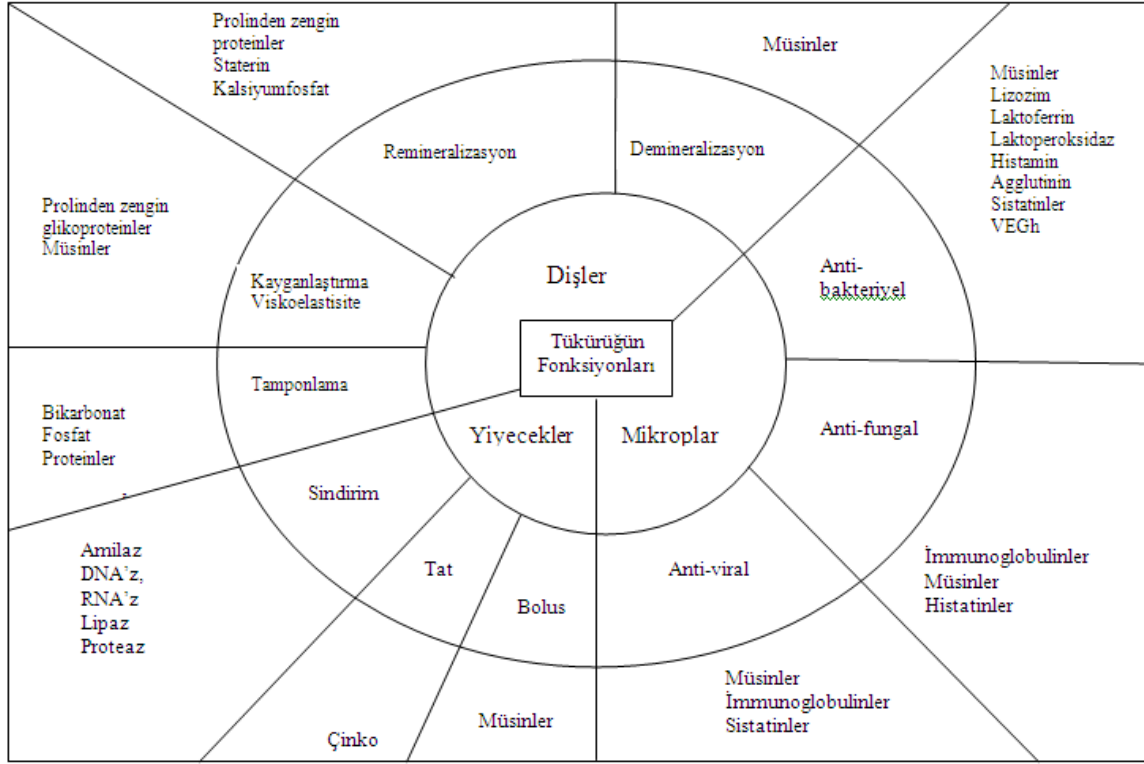
2.1.1.3. Yıkayıcı- dilüe edici- maddeleri uzaklaştırıcı etkisi

Tükürük, dil, dudaklar ve yanakların ulaşılabilir alanlarda yaptığı mekanik temizliği kolaylaştırır. Tükürüğün çiğnemeyi ve yutmayı kolaylaştırması ile bakteriler ve toksinler inaktive edilmek üzere sindirim kanalına gönderilerek ağızdan uzaklaştırılır. Ayrıca tükürüğün ağız boşluğunu yıkamak üzere sürekli salgılanması, immunolojik olan ve olmayan tükürük faktörlerinin de ağızda sürekli bulunmasını sağlar. Tükürük 10 µg/mL ile 500 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda çok sayıda (gliko)proteinleri ve peptidleri içermektedir (Tablo 3) (37).

Uyarılmamış tükürük akışı, dış uyarı olmaksızın, tükürüğün yavaş bir biçimde salgılanmasıdır ve ağızda çoğu zaman bu tip tükürük bulunur. Uyarılmamış tükürük ağız sağlığı için çok önemlidir. Bu akış karanlık, dehidratasyon, egzersiz ve stres gibi faktörler ile değişebilir. Tükürük akış hızının artmasının koruyucu bileşenlerin artmasını sağladığı bilinmektedir (37).

Tükürük içindeki su tükürüğün dilüsyonundan sorumludur. Bu açıdan uyarılmamış tükürük akış hızı da önemlidir (37).

Tablo 3. Tükürüğün fonksiyonları ve içeriğindeki maddeler ile ilişkisi (35)



2.1.1.4. Nötralizasyon-tamponlama

Tükürük alkale ve etkili tamponlayıcı özellikleri olan bir sıvıdır. Tükürük diş çürüklerini ağız içinde ve mikrobiyal plakta ortamın pH'sını nötr hale getirerek önler. Plaktaki bakterilerin karyojenik beslenmeyi takiben oluşturduğu asit sonucunda ortamın pH'sı düşmektedir. Tükürük pH'daki değişiklikleri en aza indirmede etkili bir tampondur. Tükürük içinde bulunan tamponlayıcı elemanlar en kısa zamanda tükürük pH'sını eski haline getirmeye çalışır. Uyarılmamış tükürükte en önemli tamponlayıcı elemanlar inorganik fosfatlar, uyarılmış tükürükte karbonik asit- bikarbonat sistemi devreye girer. pH 4- 4,5'in altına düştüğünde tükürük proteinleri de tamponlama sistemine katkıda bulunmaya başlar (38). Tükürüğün tamponlama kapasitesinde bikarbonat iyonları çok etkilidir ve tükürük pH'sı bikarbonat (HCO_3^-) iyonu

konsantrasyonuna bağlıdır. Tükürük akış hızının artması ise bikarbonat konsantrasyonunu arttırarak tükürüğün pH'sını 8'e kadar yükseltir. Dental plaktaki pH 5,6 kritik değere düştüğünde HCO_3^- iyonu aktif hale geçmektedir. Az da olsa fosfat ve diğer proteinler de tamponlama kapasitesine, dokuların besinler ve bakterilerin asitlerine karşı korunması ve pH'nın fizyolojik sınırlar içinde tutulması işlevine katılırlar (39).

2.1.1.5. Diş dokularının çözünmesinin önlenmesi ve remineralizasyonu

Diş mineralleri (kalsiyum ve fosfat) yönünden tükürüğün aşırı doygunluğu, remineralizasyon için gerekli hidroksiapatit kristallerinin büyümesi ve dişin sert dokularının fizyolojik koşullarda çözünmemesi için gereklidir. Tükürük akışının artması, kalsiyum, fosfat ve diğer hidroksil iyonlarını arttırır ve uyarılmış tükürük daha da doygun hale gelir. Bu yüzden, tükürük akışının uyarılması, remineralizasyon için gerekli iyonları sağlar (39).

2.1.1.6. Tat duyusu algılanması

Tükürük tat maddelerini çözer, tat alma reseptörlerine difüzyon ile ulaşmasını sağlar ve reseptörleri ağız kuruluğu, enfeksiyon ve fonksiyonsuzluk atrofisine karşı korur (36).

2.1.1.7. Antimikrobiyal etki

Tükürükteki Ig yapısında olan ve olmayan antimikrobiyal bileşenler; bireysel tükürük akış hızı, dişeti iltihabının şiddeti, enfeksiyonlar, antimikrobiyal proteinler arası etkileşim ve bu bileşenlerin mikroorganizmalar ile çok yönlü ilişkisi, bireyler arası ve birey içi varyasyonlar ve yaşa bağlı değişkenlik gösterebilir. Asidik prolinen zengin proteinler (PRP) ve histatinler tükürüğe özgü iken, diğer tükürük bileşenleri tüm mukozal sekresyonlarda bulunmaktadır. İmmunoglobulin yapısında olmayan antimikrobiyal bileşenlerin (LF ve miyeloperoksidaz (MPO) dışındakiler) çocuklukta düzeyleri, erişkin tükürük düzeylerine ulaşmaktadır. Çocukta koruyucu antikor sistemleri hala tam olgunlaşmamıştır. Bu özellik, tükürük savunma sisteminde henüz

diğer savunma sistemleri yeterince olgunlaşmamışken bakteristatik ve bakterisid etkilerin var olduğunu ve patojen mikroorganizmalara karşı ağız dokularının savunmasında tükürüğün yaşamın erken dönemlerinde de önemli rol oynadığını göstermektedir (33).

2.1.2. Tükürük ve Diş Çürüğü

Diş çürüğü, dünya popülasyonunun büyük bir çoğunluğunu etkilemektedir. Tükürük; salgılanmasında kişiden kişiye önemli farklılıklar görülen ve hipofonksiyonunda çürük oluşumu gibi birçok sorunun ortaya çıkmasına da yol açabilen vücudumuzun önemli salgılarından biridir (40).

Tükürük 3 çift büyük tükürük bezi (Parotis, Submandibular, Sublingual) ve yanak, dudak, sert ve yumuşak damak ve dil mukozasına dağılmış küçük tükürük bezleri tarafından salgılanır ve dişeti oluşu sıvısı da bu salgıya katılır. Tükürüğün büyük bir kısmı parotis bezinden gelir. Bu bezin ürettiği tükürük diğer bezlere oranla daha fazla immunoglobulin içerir, Sekretuar membran olarak kabul edilmiştir. Kanın biyokimyasındaki bazı değişimler bu bezin salgılarına yansır. Örneğin, parotisten salgılanan parotin isimli bir maddenin diabetiklerde daha fazla bulunuyor olması, kan şekerinin parametresi olarak kullanılmıştır. Parotis, submandibular ve sublingual bezlerden gelen tükürük dilaltında bir havuz oluşturur. Burada tükürük ile temas eden diş yüzeylerinde genellikle daha az çürüğe rastlanması, tükürüğün yıkayıcı etkisinin bu bölgelerde daha fazla olmasındandır. Çok miktarda yaygın dişeti enfeksiyonu olan kişilerin tükürüğünün az salgılandığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, aradaki ilişkinin hangi yönde olduğu; tükürük azaldığı için mi çürük sayısının arttığı, yoksa yaygın çürüklerin mi tükürük hacmini azalttığı açıklık kazanmamıştır. Çürük miktarının artması ile tükürük akışının bozulması olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (41).

Tükürüğün içerisinde normal ağız florasında yüksek oranda bulunan bakteriler, epitel hücreleri ve gıda artıkları bulunur. Tükürüğün % 90'ından fazlası 3 büyük tükürük bezi tarafından salgılanır (42).

Çürüğün oluşması ve derecesinin:

- 1) Diş yapısı
- 2) Ağız içi bakterilerinin miktarı ve çeşidi
- 3) Fermente olabilen şekerlerin tüketilmesi
- 4) Şekerlerin ağızda bulunma süresi
- 5) Fluoridin ağızda bulunması veya bulunmaması
- 6) Tükürük akış hızı ve tükürüğün içeriği gibi birçok faktörün bir arada bulunmasına bağlı olarak değiştiği kabul edilmektedir (43).

Tükürük, sistemik patolojilerden ve nöral uyaranlardan çabuk ve fazla etkilenir. Örneğin ağızın herhangi bir bölgesinde enfeksiyon bulunduğu salgının hem hacmi hem de kalitesi değişir. Tükürük hacminin artışı sialore, azalması ise kserostomi adını alır. Tükürük salgılanmasında en önemli kontrol otonom sinir sistemi tarafından sağlanır (36). Tükürük nörotransmitter uyarana bir cevap olarak salgılanır. Günün büyük bir kısmında nörotransmitter salınım düşük seviyededir ve bu dönemde oluşan tükürük akışı stimüle olmamış tükürük akışıdır. Beslenme sırasında, besinlerin ve çiğnemenin yardımı ile nörotransmitter salınışında artış meydana gelir ve tükürük akışı uyarılır. Bu dönemde oluşan tükürük akışı ise stimüle olmuş tükürük akışıdır (25).

Tükürük akış hızı azaldığında tükürüğün antimikrobiyal, tamponlama, remineralizasyon ve yıkama özelliği de azalacağından çürük oluşumunun daha hızlı ve şiddetli ilerleyebileceği bildirilmektedir (44).

Diş çürüğünün etiolojisinde, deney hayvanları ve insanlarda, MS grubundan özellikle *Streptococcus sobrinus*'un (*S. sobrinus*) ve *S. mutans*'ın etkili olduğu bilinmektedir (Tablo 4) (45).

Tablo 4. İnsanlarda diş çürüğü ile ilgili bulunan bakteri türleri (46)

| KUVVETLİ İLİŞKİLİ | OLASI İLİŞKİ |
|---|---|
| <u>Mutans streptokokları</u> | <u>Diğer streptokoklar</u> |
| <i>S. mutans</i> | <i>Streptococcus mitis (S. mitis)</i> |
| <i>S. sobrinus</i> | <u>Aktinomiçesler</u> |
| <u>Laktobacilli</u> | <i>Actinomyces viscosus (A. viscosus)</i> |
| <i>Lactobacillus casei (L. casei)</i> | <u>Non-mutans streptokolar</u> |
| <i>Lactobacillus fermentum (L. fermentum)</i> | |
| <i>Lactobacillus acidophilus (L. acidophilus)</i> | |

S. mutans, çocuklarda ve genç erişkinlerde mine çürüğünün, yaşlılarda kök yüzeyi çürüğünün ve erken çocukluk dönemi çürüklerinin etiyolojisinde primer patojen olarak bulunmuştur (18).

MS'lerin çürük etiyolojisindeki rolü günümüzde belirlenmiştir ve tükürükte MS sayısının belirlenmesi diş çürüğünün diağnoz ve prognozunda önemli bir yer edinmiştir. Tükürük MS seviyesi $\geq 10^6$ cfu/mL ve Laktobasil seviyesi $\geq 10^5$ cfu/mL olanlar yeni çürük oluşturma açısından yüksek risk grubunda kabul edilmektedir (42).

Spesifik karyojenik mikroorganizma olarak belirlenen ilk mikroorganizma Laktobasil'dir (47). Diş çürüğünün patogeneğinde Laktobasil'in önemli rol oynadığı birçok araştırmada gösterilmiştir. Laktobasil derin dentin lezyonlarında yüksek sayıda saptanmaları nedeniyle çürüğün başlamasından çok çürüğün ilerlemesinde etkili oldukları düşünülmektedir. Fakat bazı hayvan çalışmaları Laktobasil'nin birkaç tipinin çürük oluşturma yeteneklerinin olduğunu göstermiştir (43). Azalmış tükürük akış hızında Laktobasil sayısı da artmaktadır (48).

Tükürüğün birçok mikroorganizmalar üzerine engelleyici etkisi bulunmuştur. Tükürükte bulunan antimikrobiyal maddelere topluca inhibitörler adı verilir. Tükürüğün içerisinde *Corynebacterium diphtheriae* üzerine engelleyici etkisi olan bir madde bulunduğu gösterilmiştir. Bu maddeye zidin adı verilmiştir. Bunlardan başka tükürüğün *Clostridium*'lar *α-hemolitik streptokoklar* ve *tifo basili* üzerine de engelleyici etkisi gösterilmiştir. Belki de bu nedenle ağızda bu bakterilere pek rastlanmamaktadır (41).

2.1.3. Tükürük İmmunolojisi

İmmün bir uyarı sonucu ortaya çıkan ve elektroforezde gamma zonunda yer alan globulin yapısındaki proteinlere immunoglobulin adı verilmektedir. Fiziksel ve kimyasal özellik yönünden farklılık gösteren immunoglobulin molekülleri antijenite ve immunolojik etkinlik yönünden de farklılıklar göstermektedir. İnsanda beş sınıf (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) immunoglobulin bulunmaktadır (49).

IgA serum immunoglobulinlerinin % 20 kadarını oluşturur. IgA esas olarak mukoza sekresyonlarının büyük immunoglobulinidir. Bu nedenle sekresyonla örtülü dış yüzeylerde organizmanın lokal immün savunmasından sorumludur. Gözyaşı, tükürük, trakeabronş, burun, vajina, bağırsak sekresyonları ve safrada yüksek oranda IgA bulunduğu bilinmektedir. Serumdaki normal değeri 1,4-4 mg/mL, uyarılmış parotis salgısında ise 3,95-1,37 mg/100'dir. IgA, labial tükürük bezi sekresyonlarında en sık rastlanan immunoglobulindir ve bu sekresyonlardaki ortalama değeri parotis bezi salgılarından 4 kat fazladır. Minör tükürük bezleri ağız boşluğunda bulunan IgA'nın 530-35'ini üretirler (49).

Tükürükteki IgA'nın %90'dan fazlası Sekretuar IgA'dır (sIgA). sIgA, mukozal yüzeylerin temel immunolojik savunmasıdır. sIgA proteolitik enzimlere dayanıklı olup aglutinasyon, bakteri penetrasyonunun önlenmesi ve nötralizasyon olaylarında önemli rol oynamaktadır. sIgA'nın asıl etkinliği bakteri ve virüs gibi mikroorganizmaların mukoza hücrelerine bağlanmalarını ve dolayısıyla onların dış yüzeylerde kolonizasyonunu veya epitelyum hücrelerini enfekte etmelerini engellemektir (49).

2.1.4. Tükürükte Bulunan Antimikrobiyal Proteinler

2.1.4.1. İmmunoglobulin Olmayan Proteinler

2.1.4.1.1. Lizozim

Lizozimin bulunması, birçok canlıda doğal savunma sistemine dahil olduğunu düşündürmektedir. Duktus hücreleri ve dişeti oluğu sıvısı (DOS) kaynaklıdır. Bakterileri, hücre duvarlarındaki peptidoglikanların muramik asit ve N-asetilglukozamin rezidüleri arasındaki *B(1-4)-glikozidik* bağları hidrolize ederek lizise uğratar. Ayrıca, katyonik özelliği nedeniyle enzimatik olmayan (muramidaz-bağımsız) mekanizmalar ile de bakterileri öldürdüğü bildirilmiştir (50).

Negatif yüklü lizozimin tükürük katyonları ile yaptığı bileşikler, bakteri hücre duvarını destabilize eder ve bakteri otolizininin aktivasyonu sonucu otolizis gerçekleşir. Duyarlı bakterilerde glukoz metabolizmasını bozarak, mikroorganizma agregasyonunu ve ağızdan tercihli bir uzaklaştırmayı da gerçekleştirmektedir (36).

Lizozimler direkt olarak antimikrobiyal özellik gösteren proteinlerdir. İlk olarak, 1922 yılında Alexander Fleming tarafından burun salgısında tesadüfen keşfedilmiştir (51). Fleming laboratuvarında çalışırken burun akıntısı kazara bakteri kültürünün bulunduğu petri kabının içine düşmüş ve *Micrococcus lysodeikticus*'u öldürdüğü görülmüştür. Mukopolisakkarit yapısında olan ve müramidaz olarak da bilinen lizozimin; insan gözyaşı, ter, burun salgısı, gastrointestinal kanal duvarındaki pek çok salgıda ve dişeti oluğu sıvısında bulunduğu gösterilmiştir (idrara ve beyin omurilik sıvısında bulunmaz). Kaynağını lökositlerden ve granülositlerden alır (51).

Lizozim, birçok bakterinin hücre duvarında bulunan polisakkaritlerin sindirilmesinde görev alarak antibakteriyel etki göstermektedir. Bu etkiyi, glikosidik bağına giriş yapan bir su molekülünü katalize ederek gerçekleştirmektedir ve bu olay hidroliz zinciri kırmaktadır (35). Böylece bakteri hücresi eğer gram pozitifse bir protoplast, eğer gram negatif ise steroplast haline dönüşür (bakterilerin bu defektif formlarına topluca L-formları adı verilir). Lizozimler ve bakteriler ağız florasında daima birlikte buldukları için herhangi bir zamanda ağız florasından bakterilerin L-

formlarını elde etmek mümkündür. Bakterilerin L-formları, bilhassa diş plağının tükürük ile temas eden diş yüzeyinde, çürük kavitetlerinde bulunur. Ancak, L-formlar dişeti enfeksiyonu veya diş çürüğünün primer sebebi değildir. Yapılan çalışmada her 100 kişiden 83'ünün ağızda L-formunda bakterilerin bulunduğu gösterilmiştir. Çürük diş sayısı azaldıkça ağız florasındaki bakterilerin L-formlarının sayısı artmaktadır. Bu da tükürükteki lizozimlerin antibakteriyel etkisini doğrulamaktadır. Ancak bunun pasif bir etki olduğu kabul edilmektedir (52).

Enzimlerin aktiviteleri pH ve sıcaklık değişikliklerinden etkilenmektedir. Her enzim kendi özel pH ve sıcaklığında iş görmektedir. Lizozimin sadece gram pozitif bakterilerin hücrelerine karşı etkili olduğu bilinmektedir. Gram negatif bakteriler ve mayalar bu enzime karşı tamamen direnç göstermektedir. *Veillonella* ve *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* hedef bakterilerden olmakla birlikte, etkisinin özellikle MS'lara karşı olduğu bildirilmiştir. *Klebsiella*, *Micrococcus*'lar, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Sarcinia*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*'lar üzerine de etkilidir. *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenicus*, *Peptostreptococcus*, *S. mitis*, *Streptococcus salivarius (S. salivarius)*, *Treponeme microdentium*, *Veillonella alcalescens* ve *Vibrio sputorum* üzerine etkisiz olduğu bildirilmiştir (52).

Tükürükteki tüm lizozim proteinleri büyük ve küçük tükürük bezlerinden, dişeti oluşu sıvısından ve tükürük lökositlerinden kaynağını almaktadır. Ağız koşulları ile uyumlu bakteriler ve kapsül içerenler lizozimin klasik etkilerine dirençlidir. Ancak, birçok bakteri lizozimin enzimatik etkisi ile direkt olarak lizise uğratamasa da, hücre duvarlarının zayıflamasına bağlı olarak, lizise uğrarlar. IgA, H₂O₂, peroksidaz ve kompleman bileşenleri lizozimin antibakteriyel etkisini arttırırlar. Lizozim, hidroksiapatite bağlanarak diş yüzeylerinde de antibakteriyel etki gösterir (36).

Yeni doğan bebeklerde tükürük lizozim seviyesinin yetişkinlerle aynı düzeyde olduğu ve böylece, antimikrobiyal etkilerinin dişler henüz sürmeden açığa çıkabildiği bildirilmektedir (53).

Lizozimin antimikrobiyal etkisinin müramidaz aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir. Gram negatif bakteriler, dış lipopolisakkarit tabakasının koruyucu fonksiyonundan dolayı lizozime daha dirençli hale gelmektedir. Müramidaz aktivitesine ek olarak, katyonik bir protein olma özelliği bakterilerin otolizini aktive ederek hücre duvarlarının parçalanmasına neden olmaktadır. Bu katyonik özelliğinden dolayı, sıcaklıkla inaktive olsa bile, bakterisidal etkilerini hala sürdürebilmektedir. Bu etki iki basamakta gerçekleşmektedir. Hücre duvarının enzimatik olarak parçalanmasından sonra, hücre zarının fiziksel-kimyasal düzensizliği sonucunda bakterinin ölümü gerçekleşmektedir (50).

2.1.4.1.2. Laktoferrin (LF)

Seröz hücrelerde üretilen ve antibakteriyel, antimikotik, antiviral, antineoplastik ve antienflamatuvar etkiye sahip bir proteindir. LF'den zengin polimorfonükleer (PMN) hücreler de tükürükteki LF düzeyini artırırlar (39). LF, ekzokrin bezlerin salgılarında ve bazı özel nötrofillerin granüllerinde bulunan ve enzimatik olmayan antimikrobiyal proteinlerden biridir. Büyük ve küçük tükürük bezlerinin seröz hücrelerinden salgılanan demir bağlayan bir glikoproteindir. Granülasyon sonucu, nötrofiller kan plazmasında LF'nin temel kaynağı haline gelmektedir. Lökositler bol miktarda LF içermekte ve dişeti oluşu sıvısına da salmaktadırlar (54).

LF, demir bağlı bir proteindir ve kanda bulunan demir bağlı transferin ile benzer özellikleri vardır. LF, molekül başına iki demir atomu bağlayarak, bakterilerin ortamdaki demiri kullanmalarına engel olur ve geniş bir mikroorganizma grubuna karşı bakteriostatik etki gösterir (39). Demir metabolizması, hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu ile antibakteriyel, antiviral ve antiparazitik aktivite gibi çok farklı türde biyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır. Bu fonksiyonlarının çoğunun kendisinin demire bağlanma yeteneğiyle ilgili olmadığı görülmektedir. LF'nin antimikrobiyal aktivitesi olduğu ve bu özelliğini ağız ortamında gösterdiği tespit edilmiştir. LF'nin biyolojik fonksiyonu demir iyonuna yüksek affinite göstermesi ile ve bunun sonucu olarak da, patojen mikroorganizmalardan bu metali alıkoyması ile ortaya çıkmaktadır. Bu da demir iyonuna doygun hale gelene kadar devam eden bir bakteriostatik etkinin görülmesine neden olmaktadır. Karboksi anyonunun direkt bakteriyel

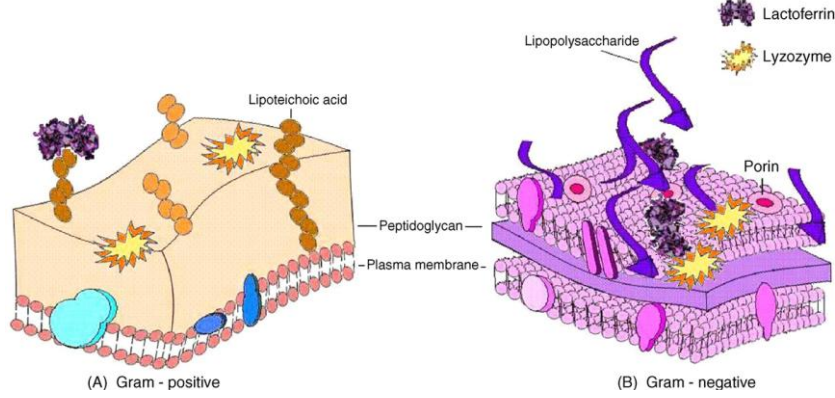
yüzeyi ile etkileşimine bağlı antibakteriyel etkisi de mevcuttur. Aerobik ve fakültatif anaerop bakteriler demir eksikliğine özellikle duyarlıdır ve LF'ye daha hassastırlar. LF demir bağlanma özelliğinden bağımsız olarak da antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Demirden bağımsız olduğu durumlarda (apo- laktoferrin) MS gibi bazı bakteri grupları üzerinde geri dönüşümsüz, bakterisidal etki göstermektedir. Apo-laktoferrin ayrıca, *S. mutans* ile de agglutine olabilmektedir. *S. mutans* LF'ye hassastırlar ve inhibisyon demire bağlı olmadan gelişir. *Actinomyces* türlerine de etkili olduğu bilinmektedir (36).

İnsan tükürüğünde, LF'nin demire doymuş ve demirden bağımsız formları eş zamanda bulunabilmektedir. LF geniş spektrumlu bakterisidal etkiye sahip katyonik bir peptittir (36).

Antimikrobiyal etkilerini gösterebilmeleri için hücre yüzeyindeki özelleşmiş bazı reseptörlere bağlanmaları ve bakteri hücre zarı geçirgenliğini etkilemeden DNA ve mitokondri gibi belirli hücre içi yapılarıyla etkileşime girmeleri gerekmektedir (55).

PMN'lerin endotelial hücrelere yapışmasını ve doğal öldürücü hücrelerinin fonksiyonlarını da arttırır. Lipopolisakkaritin lipid kısmına bağlanarak, endotoksinin makrofajlardan sitokin salınımını aktive etmesini önler. İltihaplı alanlar gibi asidik ortamlarda da işlev görebilir. PMN-kaynaklı LF demir iyonlarını bağlayıcı özelliği dolayısıyla bir ölçüde antioksidan gibi de davranabilir (Şekil 1) (56). Sıvılar ve iltihabi alanlardaki serbest demiri uzaklaştırarak, ağız ortamını aşırı serbest demirin, hidroksil veya ferrin radikalleri üretimini katalize etme, lökositik savunma mekanizmalarını baskılama ve mikrobiyal üremeyi stimüle etme gibi olumsuz özelliklerinden koruyarak, serbest radikal esaslı doku hasarını azaltır (57). Lactoferricin olarak isimlendirilen spesifik LF fragmanları (peptidler) bakteri, mantar ve protozoaların sitoplazmik membranlarında değişime yol açarak bakterisid ve fungisid etki gösterirler. Sitomegalo virüs, hepatit C, HSV, HIV ve polimyelitis gibi virüslerin replikasyonunu da önler. LF'ye karşı dirençli mikroorganizmaların demir bağlayıcı moleküller ürettikleri düşünülmektedir. LF-LPO kombinasyonu *S. mutans* üzerine ek antibakteriyel etki sağladığı bilinmektedir. LF ve sIgA streptokokların metabolizmasını modifiye etmek için birlikte işlev görürler. LF ve lizozimin de sinerjistik ve bakterisid etkileri olduğu bildirilmiştir (58).

Proteinin direkt antimikrobiyal aktivitesi olmasına rağmen, çürük insidansında azalma ile direkt ilişkisi gösterilememiştir. Tükürüğün çürük önleyici etkisinin içerdiği tek bir maddeye bağlı olarak değil, bir bütün olarak sağlandığı bilinmektedir (36).



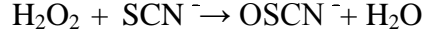
Şekil 1. LF'nin antibakteriyel etki mekanizması. (A) Gram pozitif bakteri: LF, hücre zarının lipoteichoik asit gibi negatif yüklü moleküllerine bağlanarak hücre zarını nötralize eder ve lizozim gibi antibakteriyel ürünlerin hareketine izin verir. (B) Gram negatif bakteri: LF, lipopolisakkaritin A lipidine bağlanarak, bu yağın serbest kalmasına neden olur ve bunun neticesinde hücre zarı zarar görür (56).

2.1.4.1.3. Peroksidaz

Peroksidaz sistemleri; tüm tükürükte, tükürük bezi sekresyonunda, pelikülda, DOS'da ve dental plakta bulunur. Tükürükte bulunan bu sistemler 'tükürük peroksidazı' (TPO) ve MPO gibi enzimlerden ve SCN⁻ iyonu ve H₂O₂ bileşiğinden oluşmaktadır (59).

TPO, parotis ve submandibular bezi gibi büyük tükürük bezlerinde üretilmektedirler. Yapısal ve katalitik özellikleri ile laktoperoksidaza benzer. MPO, lökositlerden kaynak alan bir proteindir. Tükürükteki konsantrasyonu dişeti ve mukozal inflamasyonu yansıtmaktadır. Tiosiyanat, serumdan filtre olur ve çoğu hidrojen peroksit iyonları ağızdaki aerobik bakterilerden kaynak almaktadır. Peroksidazlar, tiosiyanatın hidrojen peroksit ile antimikrobiyal bir parça olan hipotiosiyanite oksidasyonunu katalize etmektedirler (59).

Reaksiyon denklemi:



Hipotiosiyanat, parotis, submandibular bezlerin ve tüm tükürüğün normal bir parçasıdır ve henüz dişleri sürmemiş bebeklerde bile erişkin düzeyinde görülmektedir. (59)

Peroksidaz sistemlerinin 2 temel biyolojik fonksiyonu bulunmaktadır:

- a) antimikrobiyal aktivite
- b) konak proteinlerini ve hücrelerini toksik H_2O_2 'den korumak

pH'ya ve Hipotiosiyanit'in konsantrasyonuna bağlı olarak, peroksidaz sistemleri çok farklı türde mikroorganizmalara karşı etkilidirler [MS, Laktobacilli, mayalar, anaerobik mikroorganizmalar (periodontal patojenler) ve bazı virüsler (herpes simpleks tip 1, HIV)]. LPO, gram pozitif bakterilerin çoğalmasını ve asit üretimini geçici olarak inhibe ederken, gram negatif bakteriler inhibisyonu takiben öldürülür. Bu sistem *L. acidophilus*'u öldürürken, *S. mutans*'ı glikolitik enzimlerinin etkisini sınırlandırarak öldürür (59).

Ağız içinde, antimetabolik aktivitesi önemli olabilmektedir. Tükürükte ne kadar hipotiosiyanit bulunursa, dental plakta asit üretimi okadar az meydana gelmektedir. Eğer, SCN^- iyonları I iyonları ile yer değiştirdiğinde 'Peroksidaz- $\Gamma - \text{H}_2\text{O}_2$ ' sistemi ağızdaki anaeroblara karşı daha etkili olmaktadır (59).

IgA veya lizozim, peroksidaz sisteminin antibakteriyel etkisini artırır. Bu sistem ayrıca ağız dokularını H_2O_2 'in zararlı etkilerinden de korur (59).

2.1.4.1.4. Agglutininler

Agglutininler, yapışık olmayan bakterilerle etkileşime girebilme kapasitelerine sahiptirler. Bunun sonucunda büyük kütleler haline gelmiş bakteri kümeleri tükürük tarafından daha kolay yıkanır ve yutulur hale gelmektedir. Agglutininler parotis bezinden izole edilmektedirler. Ayrıca, submandibular ve sublingual bezlerinden de kaynak almaktadır (59).

2.1.4.1.4.1. Glikoproteinler

En etkili agglutinin, büyük molekül ağırlığına sahip glikoproteindir. Glikoprotein, parotis bezinden kaynak almaktadır. Parotisten kaynaklanan tükürükteki konsantrasyonu sadece, % 0,001 kadardır. Ancak, 0,1 µg kadar glikoproteinin 108- 109 tane bakterinin (MS da dahil) bir araya getirilebilmesinde yeterli olduğu bilinmektedir (59).

2.1.4.1.4.2. Müsinler

Müsin'ler büyük bir glikoprotein ailesinin üyesidirler ve ağız boşluğu, sindirim sistemi, solunum sistemi ve ürogenital sistemin salgılarının çok işlevli bir parçası olarak bilinmektedir (60). Tükürükteki müsinler ağız içi yumuşak ve sert dokuların üzerini kaplayan visköz tabakanın büyük kısmını teşkil eder. Biyofilm diye adlandırılan bu tabaka çiğnemeye, konuşmaya ve yutkunmaya yardımcı olmak için ıslatma görevini de üstlenir (61). Ayrıca, yarı geçirgen bir bariyer gibi işlev görerek, altındaki yüzeyleri olası zararlı faktörlere karşı korur (37). Müsinler ıslatma etkileriyle çiğneme, konuşma ve yutkunmaya yardımcı olurlar (61). Ayrıca, müsinler mikroorganizmaların ağız içi doku yüzeylerine adezyonunu seçici olarak ayarlayarak, bakteriyel ve fungal kolonizasyonu kontrol etmeye katkıda bulunur ve böylece antibakteriyel bir görevi yerine getirir. Düşük molekül ağırlığına sahip müsin formlarından biri olan MG2'nin, MG1'e göre bakterileri bir araya getirmede ve atılımında daha etkili olduğu görülmüştür. MG1 dişe sıkıca tutunarak mine pelikülünün oluşumuna katkıda bulunur. MG2 de mineye tutunur, ancak kolayca uzaklaştırılır. MG2 daha çok içinde *S. mutans*'in da bulunduğu oral bakterilerin yıkanarak atılmasında yararlı olur Bazı müsinler kan

gurubu tepkimelerinde yer almaktadır. İnsanların % 80'inde, uç kısımlarında karbohidrat bulunan zincirlere kan gurubu antijenlerini taşıyan, müsünlerin salgılanması gerçekleşmektedir. Müsünlerin ağızda bulunan yüzeylere yüksek affinite göstermesi nedeniyle, kan gurubu antijenleri kazanılmış pelikılda saptanabilmekte ve bakterilerin bir araya getirilmesini ve/veya yapışmasını etkileyebilmektedir (59).

2.1.4.1.4.3. Fibronektin

Plazmada ve diğer vücut sıvılarında bulunan bir glikoproteindir. Ayrıca, bağ dokusu matriksinde ve bununla ilişkili bazal membranda bulunan bir yapı proteindir. Ağızda bulunan MS'yi bir araya getirmektedir. Bununla birlikte, tükürükteki fibronektin bakterilerin proteaz enzimleri tarafından parçalanması nedeniyle ağızdaki etkisi engellenmektedir (59).

2.1.4.1.4.4. Sistatinler

Sistatinler (sistatin içeren fosfoproteinler), vücut sıvılarında ve dokularda bol miktarda bulunmaktadır. Proteolizi inhibe ederek koruyucu etki göstermektedirler. Tükürükte ve kazanılmış pelikılda bazı seçilmiş bakterilerin proteaz enzimlerini ve parçalanmış lökositlerden çıkan proteaz enzimlerini inhibe edebilirler. Bazı sistatinler antiviral aktiviteye de sahiptirler (59).

2.1.4.2. İmmunoglobulinler

Tükürük immunoglobulinlerinin % 85'inden daha fazlasını IgA ve en az kısmını IgG oluşturmaktadır. IgA ve IgG birlikte bütün tükürük proteinlerinin % 5-15'i kadarıdır. IgG dişeti oluşu sıvısından köken alarak ağız boşluğuna açılmaktadır. Yüksek bağlanma özelliğinden dolayı, tek bir immunoglobulin idyotipi bir çeşit mikrobiyal tür ile bağlanabildiği bildirilmektedir (59).

2.1.5. Tükürükte Bulunan Antimikrobiyal Proteinlerin Ağız Diş Sağlığı İle İlişkisi

Altman ve ark.'nın (2006), antibakteriyel peptidlerin (K₄-S₄(1-15), LL-37) bazı bakteriler üzerine etkilerini değerlendirdikleri in vitro çalışmalarında, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*), *A. Viscosus* gibi karyojenik bakterilerin LL-37'ye direnç gösterdiği görülmüştür. En dirençli türün ise *Porphyromonas gingivalis* olduğu belirlenmiştir. K₄-S₄(1-15)'in, yüzeye yapışık ve biyofilmde büyüyen *S. mutans*'lar üzerine aynı antibakteriyel etkiyi gösterdiği bildirilen bu çalışmanın sonucunda, antimikrobiyal peptidlerin ağız hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılması önerisi vurgulanmıştır (62).

Rudney ve ark. (1996), tükürük proteinlerinin ağızda bulunan streptokoklar ile tükürük proteinlerinin (amilaz, IgA, LF, lizozim) ağızda farklı bölgelerde bağlanmalarının incelendiği çalışmalarında, *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) *Blackburn* ve *Streptococcus oralis* (*S. Oralis*) 10557 suşlarını bakteri tabakaları oluşturmak amacıyla kullanmışlardır. Mine talaşları üzerindeki bu bakteri tabakaları, üst sağ ve sol küçük ve büyük azıların bukkal, üst orta kesicilerin labial ve alt orta kesicilerin lingual yüzeylerine yerleştirilmiştir. 10 dakika tükürük temasından sonra, bakterilerin amilaza, IgA'ya, LF'ye ve lizozime bağlanmaları değerlendirilmiştir. Üst sağ ve sol küçük ve büyük azılar bölgesinde istatistiksel olarak daha fazla bakterinin amilaz ile bağlandığı görülmüş ayrıca, üst orta kesiciler bölgesinde bağlanmanın anlamlı bir şekilde daha az olduğu belirtilmiştir. *S. gordonii*'nin, *S. Oralis*'e göre istatistiksel olarak daha çok amilaz ile bağlanma gösterdiği saptanmıştır. LF ve lizozimin alt orta kesiciler bölgesinde bağlanmasının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha çok olduğu görülmüştür. *S. Oralis*'in LF ve lizozim ile üst sağ ve sol küçük ve büyük azı bölgesinde daha çok bağlanma gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular ışığında, tükürük proteinlerinin oral ekolojiye etkisinin ağızdaki bölgeler arasında farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır (63).

Tenovuo ve ark. (1992), yapmış oldukları bir çalışmada, lizozim, LF, hipotiyosiyanat ve agglutinin gibi antimikrobiyal proteinler ile tükürükteki MS sayısı ve başlangıç çürük lezyonları arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Başlangıç çürük

lezyonlarının sayısı ile tükürük MS miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiş; bununla birlikte, diğer çürük indeksleri (DMFS, mevcut diş çürükleri), MS sayıları ve tükürük immunoglobulinleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (64).

Rudney ve ark. 'nın (1991) uyarılmamış tükürükteki antimikrobiyal proteinlerin birbirleriyle ve ağız sağlığı, dental plak birikimi ve bileşimi ile olan ilişkisini inceledikleri bir çalışmada, 216 katılımcının lizozim, LF, TPO ve IgA miktarları arasındaki ilişki değerlendirilmiş; tüm tükürük proteinleri ve sağlık durumu / plak birikimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *S. sanguinis* değerlerinin lizozim, LF, TPO, toplam protein miktarı ve tükürük akış hızı ile negatif bir korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (65).

Grahn ve ark. (1988), tükürükteki immunoglobulinler ve immunoglobulin olmayan tükürük proteinleri ile çürük, çekilmiş, dolgulu diş yüzeyleri (DMFS), mevcut diş çürükleri, dişeti iltihabı ve tükürükte bulunan *S. mutans* ve Laktobasil sayıları arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, 50 denizciden aldıkları tükürük örnekleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, *S. mutans* ve Laktobasil sayıları ile DMFS, mevcut diş çürüğü değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Mevcut diş çürükleri ile dişeti iltihabı arasında da pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, tükürük faktörlerinin erken dönem enfeksiyonlarının önlenmesinde *S. mutans* miktarının düzenlenmesinden daha etkili olduğu görülmüştür (66).

2.1.6. Ağızda Kullanıma Sunulan Çeşitli Preparatların Antimikrobiyal Etkisinin Değerlendirilmesi

2.1.6.1. Fluorid

Barbier ve ark. (2010), yapmış oldukları bir çalışmada bazı hücresel işlemlerden geçen inorganik floridin moleküler mekanizmasını incelemişlerdir. Hücreleri etkileyen floridlerin mekanizmalarını anlatmak amacıyla yapılan bu çalışmada, inorganik floridlerin bazı biyolojik sistemlerde görülen hücresel fonksiyonlar üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Floridlerin gen açılımı, hücre döngüsü, proliferasyon ve

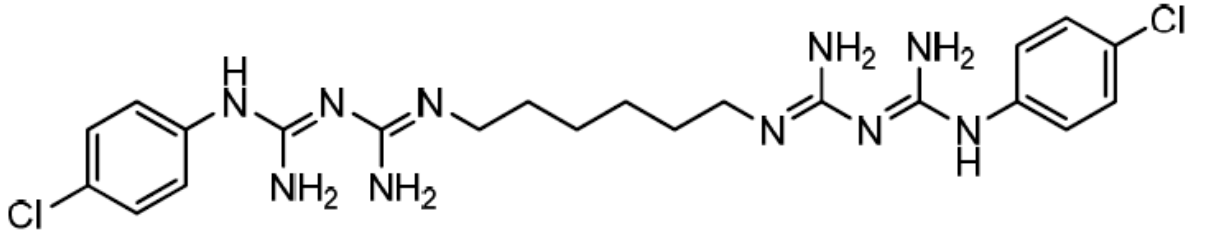
migrasyon, solunum, metabolizma, iyon transferi, salgılama, endositoz, apoptoz/nekroz gibi hücreler işlevler ile etkileşime girebildiği gösterilmiştir. G proteinlerinin aktivasyonu sonucu, floridin damar, hücre migrasyonu, hücre proliferasyonu, gen açılımı üzerine etkisi görülmüştür. Tüm bu süreçlerde floridin konsantrasyonunun çok önemli olduğu vurgulanmıştır (67).

Yoshihata ve ark. (2001), 7, 10 ve 12 yaş grubundaki çocuklar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada floridli ağız gargaralarının tükürükte bulunan MS ve Laktobasil üzerindeki antibakteriyel etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, 243 çocuk ağız gargarası kullanmış, 171 çocuk ise kullanmamıştır. 7 yaş grubundaki çocuklar iki yıl boyunca 500 ppm sodyum florid gargarayı günlük kullanmışlardır. 10 yaş grubundaki çocuklar iki yıl boyunca 500ppm sodyum florid gargarayı günlük, üç yıl boyunca ise 2000 ppm gargarayı haftalık kullanmışlardır. 12 yaş grubundaki çocuklar iki yıl boyunca 500 ppm sodyum florid gargarayı günlük, beş yıl boyunca ise 2000 ppm gargarayı haftalık kullanmışlardır. MS değerleri Dentocult SM Strip testi ile Laktobasil değerleri ise Dentocult LB Dip Slide testi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, floridli ağız gargarası kullanan bütün yaş gruplarındaki çocuklarda MS değerlerinin, kontrol grubundaki çocuklara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, Laktobasil sayılarında anlamlı bir fark görülmemiştir (68).

2.1.6.2. Klorheksidin

Son 10 yıldır diş çürüğünde önemli etiyolojik faktör olarak bilinen *S.mutans*'ı hedef alacak antimikrobiyal ajanlar geliştirilmektedir. CHX antifungal ve antibakteriyel etkisinden dolayı diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Molekül formülü $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ 'dir (Şekil 2) (69). En önemli etkilerinden biri dental plak birikimini kontrol altına almak olarak bilinmektedir. CHX beyazdan açık sarıya kadar değişen renklerde bulunabilmektedir ve kokusuzdur. Suda çok az, organik çözücülerde çok miktarda çözünebilmektedir. Pratikte, suda çözünemesinden dolayı bir glukuronik asit tuzu olan klorheksidin glukonat formu yaygın olarak kullanılmaktadır (69).

Klorheksidin glukonat ilk olarak, 1950 yılında İngiltere’de ICI ilaç firması tarafından sentezlenmiştir (69). Yüksek antimikrobiyal etkisi, deri ve mukozayla birleşme eğilimi ve insan hücrelerinde toksik etkisinin az olması nedeniyle topikal antimikrobiyal ajanlar arasında en sık tercih edilenler arasına girmiştir. Klorheksidin glukonat’ın antimikrobiyal etkisi pH’ya bağlı olarak değişmektedir. 5,5-7 pH aralığında en fazla etki göstermektedir. Bu pH aralığı, klorheksidin glukonatın sıklıkla kullanılacağı insan dokularının normal koşullardaki pH değerlerine karşılık gelmektedir (70).



Şekil 2. Klorheksidin molekül formülü (69)

2.1.6.2.1. Stabilitesi

% 1 konsantrasyonun altındaki seyreltilmiş CHX solüsyonları oldukça ısıya dayanıklıdır ve 123°C’de 15 dakika kadar otoklavda steril edilebilmektedir. % 1’in üzerindeki solüsyonların otoklavda steril edilmesi sonucunda çözünmemiş halde çökme meydana gelmektedir. CHX’in sulu solüsyonları 5-8 pH aralığında en uygun etkiyi göstermektedir. pH’nın 8’den fazla olduğu ortamda klorheksidin çökelmektedir. 5’ten düşük olduğu ortamda ise kademeli olarak bakterilerin yıkımı ve sayılarında azalma görülerek antibakteriyel etki ortaya çıkmaktadır (71).

2.1.6.2.2. Antimikrobiyal etkisi

CHX bakterilere, mantarlara, zarflı virüslere ve protozalara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (72).

Bakteri hücrelerinin üremesi 0,5-10 mg/mL konsantrasyon değerleri arasında önlenmekte ve 5 mg/mL konsantrasyonundan daha yüksek değerlerde bakterisidal etki görülmektedir (73).

CHX'in özellikle plak birikiminin azaltılmasında ve gingivitis tedavisinde etkili olduğu görülmektedir. Bu görevlerini, bakterilerin diş yüzeyine bağlanmasını önleyerek ve bakterilerin hücre duvarında değişikliklere neden olarak gerçekleştirmektedir (74). Antibakteriyel etkilerini, bakteri hücre duvarını CHX molekülleriyle bozarak hücre membranının geçirgenliğini arttırmak ve hücre parçalanması sonucu bakterinin ölümüne neden olmakla gerçekleştirmektedir (75).

CHX'in yüksek oranda katyonik özelliği, çok dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Katyonik olmasından dolayı, negatif yüklü yüzeylerin karboksil, fosfat ve hidroksil gruplarına bağlanabilmektedir. Bu özellikleri ağız mukoza yüzeylerine bağlanabilmesini ve uzun süre ağız boşluğunda kalabilmesini kolaylaştırmaktadır. Kimyasal yapısı, bir kere ağızda çalkalanmasından sonra ağız boşluğunda uzun süre kalabilmesini ve böylece yavaş salınarak görevini yerine getirmesini sağlamaktadır. CHX'in uzun dönem kullanımının periodontal cepteki flora üzerine etkisi uygulama süresine bağlı olarak değişmektedir. Dişeti cebinin klorheksidin ile irrigasyonu dişeti cebindeki floraya sadece kısa süreli bir etki göstermektedir (76).

Plağın önlenmesi sadece CHX'in diş yüzeyine tutunması ile sağlanmaktadır. Bu etki, CHX molekülünün katyonik kısmını diş pelikülüne bağlayıp diğer ucunu diş yüzeyinde bakterinin koloni oluşumunu bozacak şekilde etkileşime girmesini sağlamak için serbest bırakarak gerçekleşmektedir. Diş yüzeylerindeki biyofilmin kontrolü ağız diş sağlığının korunmasının temelini oluşturmaktadır. Bu yüzden, CHX içeren ağız gargaraları geleneksel mekanik diş temizliğini gerçekleştiremeyen olgularda yararlı bir tamamlayıcı faktör olarak kullanılabilir (12).

CHX'in periodontitis tedavisinde de etkili olduğu bildirilmiştir (77). CHX esas olarak ağız gargaralarında bulunmakta ve diş fırçalamaya ek olarak tedavinin ağız hijyenini kontrol altına alma evresinde kullanılması önerilmektedir. Ancak, son yıllarda birçok araştırmacının dikkatini operasyon sırasında ve cerrahi ya da cerrahi olmayan

periodontal tedavilerden hemen sonra CHX'in kullanılması çekmiştir (78). CHX'in potansiyel etkileri; yüzeyde bakteriyostatik etki göstermek, yara iyileşmesini hızlandırmak ve tedaviden hemen sonra en uygun plak kontrolünü sağlamaktır (79).

CHX'in ağız gargarası olarak kullanımı, çok farklı yüzeylerden emilebilmesi ve geniş pH aralığında antibakteriyel etkisini gösterebilmesi nedeniyle, tercih edilebilmektedir (76).

Bu görevlerinin aksine CHX'in bazı dezavantajları bulunmaktadır. Dişleri boyaması, tat alma bozuklukları ve diş taşı birikiminde artışa neden olması dezavantajları olarak sayılabilmektedir. Genel olarak, CHX ve diğer topikal ajanlar periodontal cebin içine penetre olamadığı için etkileri dişetin üzerindeki bölgelerde sınırlı kalmaktadır (80).

2.1.6.2.3. Klorheksidin etki mekanizması

CHX'in plak oluşumu üzerine etkisinin mekanizması şöyle ifade edilmektedir;

Bu antiseptik madde bakteri hücre zarına kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır. Bu bağlanma, düşük konsantrasyonda potasyum gibi maddelerin hücre içine geçişi ile sonuçlanmaktadır. Pozitif yüklü klorheksidin bakteri yüzeyindeki negatif yüklü proteinler ile bağlanmaktadır. Bu bağlanma, bakteri hücre zarının fiziksel olarak bozulmasına ve hücre zarı enzimlerinin inhibe edilmesine neden olmaktadır. Bakteriyostatik etkinin görüldüğü konsantrasyonda, klorheksidin hücre zarı enzimlerini inhibe etmekte ve hücre zarındaki yağ ve proteinler arasındaki bağlantının bozulmasına neden olmaktadır. Ağız boşluğunda klorheksidin pelikül ile kaplı diş yüzeylerine kolayca tutunabilmektedir. Bir kere yüzeye tutunduğunda, 12 saate varan süre boyunca bakteriyostatik etki gösterebilmektedir. Yüksek konsantrasyonda, klorheksidin bakteri stoplazmasının çökmesine ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Mantarlar üzerine etkiyi de bu şekilde göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda, virüslerin zarfı ile etkileşime girerek bu zarfın salıverilmesine neden olmaktadır (81).

2.1.6.2.4. Piyasada bulunan Klorheksidin preparatları

- a. **Ağız gargaraları:** % 0,2 ve % 0,12 gibi iki farklı konsantrasyonda bulunmaktadır. Genellikle alkolsüz gargaralar piyasada bulunmaktadır.
- b. **Jel:** % 1 konsantrasyonda bulunmaktadır. Ancak, son zamanlarda % 0,2 ve % 0,12 konsantrasyonları da piyasada bulunmaktadır.
- c. **Spreyler:** % 0,1 ve % 0,2 gibi iki farklı konsantrasyonda bulunmaktadır
- d. **Diş macunu:** % 1 konsantrasyonda klorheksidin diş macunları floridli veya floridsiz olarak piyasayada bulunmaktadır. Plak oluşumunun önlenmesi ve gingivitisin 6 aylık bir sürede kontrol altına alınmasında kontrol ürünü olarak baskın olduğu görülmüştür.
- e. **Verniler:** Çoğunlukla diş kök çürüklerinin profilaksisinde ve diş çürüğü açısından yüksek risk grubunda yer alan çocuklarda florid uygulamalarına ek olarak uygulanmaktadır.
- f. **Yavaş salınım apareyleri:** Küretaj ve diş kök yüzeyi temizliğine takviye olarak dişeti cebine yerleştirmek amacıyla üretilmiş klorheksidin apareyleridir (82).

CHX güçlü antimikrobiyal kimyasal bir ajan olmakla birlikte, kötü tadı, dişlerde renklemeye neden olması gibi özellikleri klinikte yararlanılmasını engellemektedir. Bu sebeple, daha az yan etkisi olan alternatif antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (55).

Oyanagi ve ark. (2012), dört farklı ağız gargarasının (klorheksidin glükonat, benzetonyum klorür, listerin, povidon iyot) karyojenik bakteriler (*S. sobrinus*, *S. mutans* ve *S. gordonii*) ve biyofilm üzerine etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, ağız gargaralarının istatistiksel olarak anlamlı oranda farklı bakterisidal etkilerinin görüldüğü

ve listerinin diş çürüğü ve ikincil çürüklerin önlenmesinde yararlı olabileceği sonucuna varmışlardır (83).

Baffone ve ark. (2011), klorheksidin diglukonat ve yaygın olarak kullanılan dört farklı ağız gargarasının (Curasept[®], Listerine[®], Meridol[®], Buccigel[®]) *S. mutans*, *S. aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerin yer aldığı biyofilmler üzerine etkilerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, tüm ağız gargaralarının bakteri tutulumunu azalttığı görülmüştür. En yüksek antibakteriyel etkinin ise Listerine[®] kullanımından sonra *S. mutans* sayıları üzerinde olduğu belirlenmiştir (84).

Corbin ve ark. (2011), 6 farklı ağız gargarasının (etanol, soydum lauril sülfat, triklosan, klorheksidin glukonat, setilpiridinyum klorür ve nisin) antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırdıkları in vitro çalışmalarında, hiçbir antimikrobiyal ajanın biyofilmin bozulmasında veya uzaklaştırılmasında etkili olmadığını görmüşlerdir. Ancak, bütün ajanların antimikrobiyal etkinliğinin belirlendiği ve bu etkinin CHX grubunda daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (85).

de Souza-Filho ve ark. 'nın (2008), % 2'lik klorheksidin glukonat jeli, kalsiyum hidroksit (KH) ve bunların iyodoform ve çinko oksit ile birlikte kombinasyonlarının kök kanallarındaki belirli mikroorganizmalar (*C. albicans*, *E. faecalis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*) üzerine antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında tüm materyallerin antibakteriyel etki gösterdikleri görülmüş ve bu mikroorganizmalara en çok etkiyi % 2'lik CHX jelinin gösterdiği belirtilmiştir (86).

Zanatta ve ark. (2007), yaptıkları çalışmalarında dental plak görülmeyen ve plağın görüldüğü yüzeylerde % 0,12'lik klorheksidin glukonatın etkisini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarında, klorheksidinli ağız gargaralarının kullanımına başlanmadan önce biyofilm yapısının bozulması gerektiği sonucuna varmışlardır (87).

Basrani ve ark. 'nın (2003), CHX (% 0,2 ve % 2 jeli veya solusyonu) ve KH'nın agar difüzyon testi ve in vitro kök kanal inokülasyon yöntemi kullanarak *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında agar difüzyon testinin sonuçlarına göre, CHX'in konsantrasyona bağlı olarak *E. faecalis*'e karşı etki

gösterdiği, fakat KH'nın tek başına bir etki göstermediği belirtilmiştir. Kök kanal inokülasyon testinde ise, CHX'in istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde KH'den daha etkili olduğu görülmüştür (88).

Twetman ve ark.'nın (1998), 3 farklı CHX [% 1'lik verni (Cervitec®), % 1'lik jel (Corsodyl®), % 0,4'lük diş macunu (Parosan®)] preparatlarının interdental plaktaki ve tüm tükürükteki MS üzerine antibakteriyel etkilerini değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, günlük fırçalama şeklinde uygulanan CHX diş macununun MS değerlerini düşürmede jel ve verniye oranla daha etkili olduğu görülmüştür (89).

Grönroos ve ark.'nın (1995), CHX jelinin MS üzerine antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında CHX- NaF jel ile perodik olarak yapılan diş fırçalaması sonucunda tükürük MS sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldüğünü bildirmişlerdir (90).

Lundström ve ark.'nın (1987), ortodontik tedavi görmekte olan bir grup hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarında, CHX jel uygulanması sonucunda *S. mutans* ve laktobasil üzerinde görülen antibakteriyel etkiyi değerlendirmişlerdir. Bu antibakteriyel tedavi sonucunda *S. mutans* sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiş, ancak laktobasil değerlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (91).

2.1.6.3. Sanguinarine

Yapılan in vitro çalışmalarda sanguinarine'in geniş spektrumlu antiseptik özelliği olan bir benzofenantridin alkaloidi olduğu görülmüştür. *Sanguinaria Canadensis* bitkisinden elde edilmektedir. Kısa süreli çalışmalarda, plak birikimini ve gingivitisini azalttığı görülmüştür. Ancak, uzun dönem çalışmalarda bu bulgulara rastlanmamıştır. Bazı çalışmalarda, ağız gargaralarıyla beraber kullanımının bu etkilere neden olduğunu göstermiştir. Etki mekanizmasının bakteri duvarında değişikliklere neden olarak yıkımı ve bağlanmayı azaltmak olduğu bildirilmektedir (92).

2.1.6.4. Histatinler

Histatinler, histidinden zengin küçük katyonik peptidlerdir. Doğal savunma sistemine katkıda bulunan tükürük proteinleridir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğu görülmüştür (93, 94). Parotid ve submandibular tükürük bezlerinden salgılanmaktadırlar. Bu peptidler, hidroksiapatitlere bağlanarak kazanılmış mine pelikülünün oluşumunda görev almakta ve ağız boşluğunun zararlı faktörlerden korunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Histatinler, antifungal, bakterisidal ve *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella Intermedia* ve *Bacteriodes forsitus* gibi patojenlere bakteriostatik etki göstermektedirler. Düşük stabiliteleri başlıca sorunlarını oluşturmaktadır (92). LF'ler gibi, antimikrobiyal etkilerini gösterebilmeleri için hücre yüzeyindeki özelleşmiş bazı reseptörlere bağlanmaları ve bakteri hücre zarı geçirgenliğini etkilemeden DNA ve mitokondri gibi belirli hücre içi yapılarıyla etkileşime girmeleri gerekmektedir (55).

2.1.6.5. Lizozim, Laktoferrin ve Laktoperoksidaz

Jyoti ve ark. (2009), 3-5 yaş grubu çocuklar üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmalarında, laktoperoksidaz sistemini içeren bir diş macununun erken çocukluk dönemi çürükleri saptanan çocuklardaki karyojenik bakteriler üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. 15'er kişilik 2 farklı gruptan deney grubunun Biotene diş macunu, kontrol grubunun ise Colgate Active diş macunu kullanmaları sağlanmıştır. Biotene kullanan gruptaki çocukların tükürük örneklerinde MS ve Laktobasil miktarında 4., 6. ve 8. haftalarda istatistiksel olarak azalma olduğu görülmüş; bunun yanı sıra, tiosiyanat iyon miktarının da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha fazla yükseldiği belirlenmiştir. Ancak ürünler birlikte kullanıldığında MS ve Laktobasil sayılarında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (18).

Gil-Montaya ve ark.'nın (2008), ağız kuruluğu görülen yaşlı hastalar üzerinde yaptıkları bir pilot çalışmada, laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrin gibi antimikrobiyal proteinleri içeren ağız gargarası (Biotene® Mouthwash) ve ağız jelinin (Oral Balance Gel®) klinik etkinliğini değerlendirmişlerdir. Ağız gargarası (deney grubu) ve ağız jeli (kontrol grubu) kullanan iki hasta grubunda da subjektif ve klinik

belirtilerin (ağız kuruluğu, kuru ve parlak ağız mukozası, protez retansiyonunda problemler, kuru yiyeceklerin tüketimi sırasında zorluklar, kuru ve çatlamış dudaklar, yarık ve yapışkan bir dil) azaldığı görülmüştür. Plasebo etkisini tamamen göz ardı etmemek gerektiği bildirilmiştir (95).

Hatti ve ark.'nın (2007), tükürük proteinlerini içeren bir diş macununun (Bioextra®) plak oluşumu üzerindeki etkisini başka bir diş macunu (Colgate-Palmolive®) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmek ve bu diş macununun ağızdaki mikroorganizma sayılarına etkisini incelemek amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, gün sonunda 2 grup arasında plak oluşum miktarı karşılaştırıldığında, Bioextra® kullanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az plak oluştuğu gözlemlenmiştir. Mikroorganizma sayıları karşılaştırıldığında, 4 gün sonunda, deney grubundaki tükürük örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma görüldüğü belirlenmiştir (96).

Mulligan ve ark. (1992) yaptıkları bir in vivo çalışmada, Biotene® ticari ağız gargarasının düzenli kullanımından sonra tükürükteki tüm mikroorganizma sayılarını azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak, yapılan in vitro çalışmalarda bu gargaraların önceden yumuşamış yüzeylerde ve sağlıklı diş minesinde demineralizasyona neden olduğu görülmüştür. Bu olumsuz özellik asidik içeriğinden ve gargalarda florid bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (97, 98).

2.1.6.6. Aloe Vera

George ve ark.'nın (2009), Aloe Vera içeren diş jeli (Forever Bright®) ve yaygın olarak kullanılan 2 farklı diş macununun (Pepsodent® ve Colgate®) antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırmalı olarak değerlendirdikleri in vitro çalışmada, *S. mutans*, *Candida albicans* (*C. albicans*), *L. acidophilus*, *E. faecalis*, *Prevotella intermedia* gibi mikroorganizmalar üzerindeki etkisi kuyu yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İnkübe edildikten sonra bakterilerin üremediğini gösteren kuyuların etrafında görülen inhibisyon zonları incelenmiştir. Aloe Vera içeren diş jelinin diğer 2 diş macunuyla benzer etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Tüm diş macunlarında, en yüksek antimikrobiyal etkinin *C. albicans* üzerine olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, deney

grubunun *S. mitis* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin kontrol grubundaki diş macunlarından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (99).

2.2. Çeşitli İlaçların Verilmesinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler, bir ilacın vücuda kolayca alınmasını ve hedef bölgeye ulaşmasını sağlarlar. Bir ilacın taşıma sistemi, ilacın kontrollü salınmasında, hedefe ulaşmasında ve onun etki göstermesinde önemli bir yere sahiptir. İlaç taşıyıcı sistemlerin bu avantajları doğal ya da sentetik farklı ilaç taşıyıcı sistemlerin preparatlarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu sistemlerin çoğu klinik çalışmalarda etkilerini göstermede başarısız olmaktadır. Bu nedenle, tedavi edilecek olan dokuya tedavi için gerekli olan ilaçların geçişinde kısıtlanma, toksik etki gibi problemlerin dikkate alınması gereklidir. Sentetik polimerler farmakolojik ve biyolojik gereksinimler için tam aranan maddeler olmalarından dolayı dikkat çekmektedir (100).

İlaç taşıyıcı sistemler, ilaç salınımını kontrol eden mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Buna göre, çözücü ile kontrol edilen matris sistemleri, depo sistemleri ve kimyasal olarak kontrol edilen sistemler olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Bütün bu sistemlerde, temel polimer proteinler ve kollajen gibi doğal, selüloz türevleri gibi yarı sentetik veya sentetik olabilmektedir. Doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilen taşıyıcılar olarak düşünülmektedir (92).

Günümüz teknolojisinde, enfeksiyon sürecinde ve biyofilm oluşumunda etkisinin değerlendirildiği çok çeşitli yeni elementler ve ilaç taşıyıcı sistemler denenmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin kolonizasyonu, biyofilm oluşumunu ve biyofilmin oluşacağı yüzeylerde birikimi önlediği ve ilacın biyofilme penetre olmasını sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (101).

İlacın kaybını azaltmak, zararlı yan etkileri minimuma indirmek ve ilacın biyoyararlanımını arttırmak amacıyla çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler bulunmakta ve bunların yeni örnekleri geliştirilmektedir. (7). Bu taşıyıcı sistemlerden en yaygın kullanılanı jel sistemlerinden biri olan poloxamerler ve nanopartiküllerden lipozomlardır (9).

2.2.1. Topikal İlaç Taşıyıcı Sistemleri

2.2.1.1. Cilt içinden

İlaçların cilt içinden geçerek taşınması tıpta çok yaygın olarak kullanılmakta ve topikal ilaç sistemleri arasında en sık üzerinde araştırma yapılan konu haline gelmektedir. Bireyin kendisinin uygulayabilmesi ve ağrısız olması nedeniyle hastalar tarafından da sıklıkla tercih edilmektedir. Derinin geniş yüzey alanı ve kolay geçirgenliği taşıyıcı sistemler için uygun bir alan oluşturmaktadır (102). Deriden geçebilen ilaçlar, düşük molekül ağırlığına ve optimal hidrofilik/lipofilik özelliklere sahiptir (103). Deriye yerleştirilen yamalar, nikotin yer değiştirme tedavisinde, hormonal kontraseptiflerde, opioid analjeziklerde, psikolojik uyarıcılarda, taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır (104).

2.2.1.2. Mukozadan

Birçok mukozal yüzey (oral, nazal, rektal, vajinal ve oküler), ilaçların taşınması amacıyla taşıyıcı sistemler başlığı altında incelenmiştir. Mukoza zarının keratinizasyon derecesi ve geçirgenlik bariyeri derideki stratum corneum oranla maddelerin geçişine daha fazla izin vermektedir. Yapılan çalışmalarda, ağız mukozasının deriye oranla 4-4000 kere daha fazla geçirgen olduğu görülmüştür. Mukozal alanlar taşınan ilaçların doğrudan kan dolaşımına girmesini sağlaması ve karaciğerde ilk ilaç metabolizamasından geçmesini engellemesi ve ilk sistemik atılımının mide ve bağırsaklarda gerçekleşmesini sağlaması gibi birçok avantaja sahiptir (105). Rektal, vajinal ve oküler taşıyıcı sistemlerde hasta uyumunu zorlaştırmaktadır. Nazal mukoza yoluyla ilaçların uzun dönem alınımı burun silialarının geri dönüşümsüz hasarına neden olmaktadır. Buna karşın, ağız mukozası daha kolayca geçirgen olan ve ilaç taşınmasında kullanılan bir alan olarak daha çok kabul edilmektedir. Kendini tamir edebilme özelliğinin daha iyi olması, daha damarsal yapıda olması, alerjik aktiviteye daha az cevap vermesi ve ilacın çözünürlüğünde daha hidrate bir çevre oluşturması gibi birçok avantajı söz konusudur (106).

2.2.2. Güncel Olarak kullanılan Formulasyonlar

2.2.2.1. Tabletler

Mukozadan geçiş gösteren pastiller, haplar ve tabletler ticari olarak nitrogliserin ve fentanil içeren ilaçlar olarak bulunmaktadır. Tablet ve pastil gibi katı formulasyonları tükürükte çözünerek emilim için tüm ağız mukozasının yüzey alanını kullanmaktadır. Tablet ve pastillerin etkileri tükürüğün miktarındaki farklılıklara ve emme gücüne bağlı olarak değişmekte ve kazara yutulması ve 30 dakika kadar kısa temas etme süresi gibi dezavantajları bulunmaktadır (107).

2.2.2.2. Spreyler

Gliseril trinitrat sprej formunda kullanılan ve dilaltı mukozasından kolayca geçebilen küçük bir moleküldür. Genere Biyoteknoloji Firmasının geliştirdiği Rapid Mist™ spreji ağız mukozasından insülin gibi büyük moleküllerin geçişini sağlamaktadır (108).

2.2.2.3. Antibakteriyel etki gösterenler

2.2.2.3.1. Ağız gargaraları

Ağız gargaralarının antibakteriyel etkilerinin değerlendirildiği güncel çalışmalarda ağız mukozasından lokal olarak taşınmasına odaklanılmıştır. Bu çalışmalarda araştırmalarda klorheksidin glukonat, dişeti ve periodontal hastalıklarda, çürüklerde ve profilaktik amaçlı kullanımlarının ele alındığı antimikrobiyal ajanlardan biri olarak bilinmektedir (109).

Antimikrobiyal etkilerinin görüldüğü laktoperoksidaz, lizozim ve laktoferrinin ağız gargaralarındaki formları incelenmiştir. Bu çalışmalarda antimikrobiyal gargaraların etkinliğinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (20).

2.2.2.3.2. Jeller

Jeller 1980'li yıllardan beri kontrollü ilaç taşıyıcı sistemleri olarak araştırılmaktadır. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerinin ilk hedefi bir ilacı vücudun özel bir bölgesine lokalize ederek o bölgeye özel alanda ilacın emilimini arttırmaktır. Bu tedavi edici ajanların ve apareylerin yarısından fazlası gelişim evresindedir. Diğerleri ise hayvan ve ex-vivo çalışmalarındaki aşamalarda. Birkaç klinik başarı elde edilmiş olmakla birlikte, genellikle küçük boyutlardadır (110).

2.2.2.3.2.1. Poloxamer (Pluronic F- 127)

Poloxamerler (piyasada bulunan ismiyle Pluronic[®]), polioksietilen ve polioksipropilen'in polimerleridir. Poloxamer 407, piyasada Pluronic F 127[®] ticari ismiyle bulunmaktadır (BASF laboratories, Wyandoote, USA) (111). Poloxamerler biyoyumlu polimerlerdir ve ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. % 15-50 konsantrasyonlarında kullanılırlar ve termoreversible (ısı ile dönüşebilen) jelleri oluştururlar (112). *Liu ve Chu (2000)*, % 50'den yüksek konsantrasyondaki Poloxamerin daha visköz bir yapı aldığı, kısmi sertlikte olduğu ve daha yavaş sıvı formuna çözündüğünü bildirmişlerdir. % 20-30 a/a konsantrasyonlarında bir Poloxamer 407'nin hazırlanmasının daha kolay olduğunu bildirmişlerdir (113). Düşük ısıda (buzdolabında) sıvı halde, fakat oda veya vücut sıcaklığında yarı katı (jel) halde bulunurlar. Bu özellikleri nedeniyle ilaçların mukozal uygulamalarında tercih edilmektedirler. Poloxamer polimerleri beyaz, mumsu granül yapıdadırlar. Bu polimerler soğuk suda koloidal dispersiyon oluştururlar ve 37° C'de (vücut ısısı ile) jel formuna dönerler. Vücut sıcaklığında sıvıdan yarı katı forma geçmeleri nedeniyle doku altına enjekte edilebilen implantlar olarak da kullanılırlar. Bu özelliklerinden dolayı, sıcaklıkla geri dönüşebilen jeller olarak sınıflandırılmaktadırlar. Poloxamerlerin bu özellikleri nedeniyle, ağız mukozasında kalış süresi ve mukoza ile teması artar, buna bağlı olarak da ilacın biyoyararlanımı artabilir (112).

Poloxamer 407 ile birlikte uygulanabilecek yeni kopolimerler son yıllarda yapılan çalışmalarda denenmektedir. Poloxamer jellere lipozomların veya nanopartiküllerin entegre edilmesi yeni bir bakış açısı oluşturmaktadır (112).

2.2.2.4. Macunlar

Macunların ilaç taşıyıcı apareyi olarak kullanımı, endodontide antimikrobiyal ajanların kanal içine taşınmasında kullanılımlarına odaklanan birçok çalışmayla birlikte, halen araştırma halindedir. İlaç taşıyıcı sistemlerinden biri olan lipozomların solusyon ve macun formulasyonları üzerindeki araştırmalarda sürmektedir. Bir çalışmada, lipozomla kaplı kortikosteroidlerin macun formunda topikal uygulamalarının oral liken planus tedavisinde semptomların hafifletilmesinde yardımcı olabildiği gösterilmiştir (114).

2.2.2.5. Yamalar

Ağız mukozasına yapıştırılan bazı farklı yama sistemleri ilaçların taşımacılığı amacıyla dizayn edilmiştir (107).

2.2.2.6. Filmler

İnce şerit halinde polimerik filmler, 20 mg kadar ilaç yüklenebilir ve 30sn'den daha az zamanda dil üzerinde çözünebilir. Bu ilaçlar, doğrudan kan dolaşımına geçerek hızlı tedavi gereken durumlarda etkili olmaktadır (107).

2.2.3. İlaç taşıyıcı vektörleri

İlaç taşıyıcı vektörleri taşıyıcı bir apareyin içinde ilaç moleküllerini kaplayarak biyolojik çevreden zarar görmesini önler, mukozal yüzeylerden geçişini arttırır ve hedef ilaçları özel bir bölgeye yönlendirir. Bu ilerleme, ilacın yapısında ve aktivitesinde herhangi bir değişiklik oluşturmadan gerçekleşmektedir. Bu vektörler ayrıca, kontrollü salınım sağlamakta, dolaşım zamanını iletmekte ve epitelden daha iyi bir geçiş sağlamaktadır. Polipeptid ve nükleik asit gibi hidrofilik özelliği yüksek olan ve enzimatik yıkıma hassas olan maddeler, epitelden sınırlı oranda diffüze olurlar ve uygun ilaç taşıyıcılarında fayda sağlarlar (115).

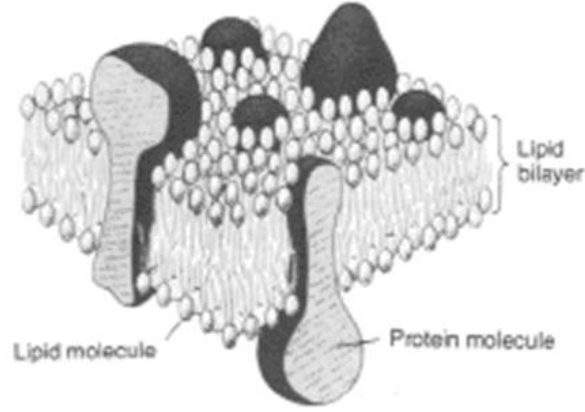
İlaç taşıyıcı vektörleri hem lokal hem de sistemik taşıyıcı sistem olarak araştırılmaktadır. İlaçların, t rapatik dozda ağız epitelinden vasküler bağ dokusuna taşıyabileceği bir vektöre ihtiyaç vardır (116).

İki çeşit ilaç taşıyıcı vektör bulunmaktadır: hidrofobik ve hidrofilik. Hidrofobik ilaç taşıyıcıları yavaş salınım göstermeleri gibi avantajlara sahip olmakla birlikte, biyolojik sıvılarda stabil kalamaması, biyolojik y zelerle temasının zayıf olması ve hidrofilik makromerleri kaplamasında zorlanması dezavantajlarını oluşturmaktadır. Diğer bir taraftan, hidrofilik ilaç taşıyıcıları, biyolojik y zelerle iyi yapışır ve hidrofilik makromoleküllerle güçlü bir bağı vardır. Ancak, hızlı bir salınım sergilemektedir. Bu  zellik, hidrofobik nanopartiküllerdeki hidrofilik kaplamanın gelişimine neden olarak mukozal y zelerden geçişi arttırmaktadır (115).

2.2.3.1. Lipozomlar

Lipozomlar nano ilaç taşıyıcı sistemleri arasında üzerinde ilk araştırma yapılandır. Günümüzde hidrofobik ilaçların taşıyıcı sistemleri olarak bilinmektedir. Lipozomlar, su kompartmanlarını eviren lipit tabakalarından oluşan, mikroskopik boyutlara sahip (0,02-10  m) küresel veziküller (oluşumlar) olarak tanımlanmaktadır. Lipozomlar ilk defa Bangham ve arkadaşları tarafından model membran olarak kullanılmışlardır (117). Lipozomlar potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok yaygın bir şekilde faklı ilaçlar için geliştirilmektedir (117, 118).

Lipozomlar canlı dokulardaki hücre membranlarının bilayer (ift tabakalı) fosfolipit yapılarına benzerler. şekil 3'de hücre membranındaki fosfolipid ve proteinlerin dizilişi (sıvı-mozaik modeli) görülmektedir (119, 120).

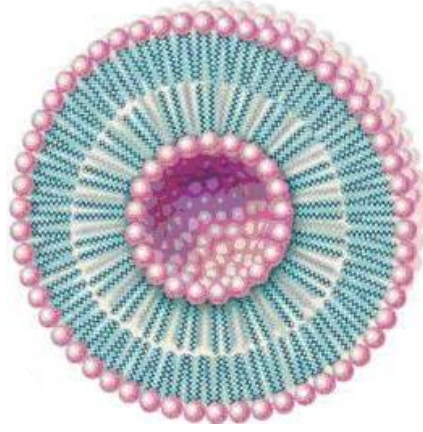


Şekil 3. Membranın Sıvı – Mozaik Modeli (119, 120)

Lipozomlar biyolojik ortamda kolayca parçalanabilir, geçimlidir, düşük toksisiteye sahiptirler ve hem lipofilik hem hidrofilik ilaçları taşıyabilirler (121). Etken maddelerin (ilaçların) kontrollü bir şekilde salınması mümkündür ve dokudaki dağılımı partikül büyüklüğü, yüzey yükü modifiye edilerek değiştirilebilir. Ayrıca lipozom hazırlanmasında kullanılan farklı fosfolipidlerin seçimi ve oranları değiştirilip, amaca uygun lipozom formülü hazırlanabilmektedir (122). Lipozomların oluşum mekanizması esas olarak, kutup başlarının sulu ortama maruz kaldığı ve hidrofobik hidrokarbonların her iki tabakayla yüzleşmek zorunda kaldığı su molekülleri ve fosfolipitler arasında görülen olumsuz etkileşime dayanmaktadır. Bağlanmış fosfolipitlere enerji girişi, organize olmuş, yakınlaşmış çift katmanlı tabakalar (lipozomlar) ile sonuçlanmasına neden olur. Yağ ve sulu fazın yağ tabakalarının yapısında bulunmasına bağlı olarak lipozomlardan, taşıyıcı sistemde ve suda, yağda çözünen ve amfifilik maddelerin salınımında faydalanılabilmektedir (123).

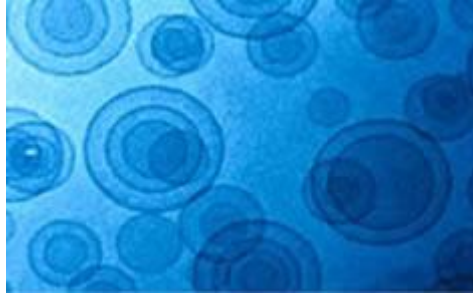
Lipozomların diğer teknolojilere oranla avantajı, yüksek su aktivitesinin görüldüğü uygulamalarda suda çözünen maddelere karşı stabilitesini koruması olarak bildirilmektedir (123).

Lipozomların çift tabakalı yapıları amfifilik moleküllerden oluşur. Hidrofilik uçları lipozomun dışında ve içinde, lipofilik uçları ise lipozomun ortasına gelecek şekilde düzenlenmiştir (Şekil 4) (119).



Şekil 4. Lipozom Modeli (119)

Lipozomların karakterizasyonunda elektron mikroskobu kullanılmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Elektron mikroskobunda lipozomun görünümü (124)

2.2.3.2. Lipozom karakterizasyonu

Kimyasal adı N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate olan DOTAP molekülünün molekül formülünün $C_{43}H_{83}NO_8S$ ve molekül ağırlığının 774,21 g/mol olduğu bilinmektedir. Polarize mikroskop görüntüsü ile DOTAP yapısı şekil 6'de görülmektedir (125).

Jaafari ve ark. (2009), lipozomla kaplı paromomisin sülfatın topikal uygulamalarının % 10 ve 15 PM (Lip-PM-10 ve Lip-PM-15) Leishmania ile enfekte edilmiş BALB/c fareleri üzerinde antileishmanial etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları in vitro çalışmalarında, bütün formülasyonlarda, LPMF uygulamalarının fare derisinden % 15'inin penetre olduğu ve % 60'nın deriden geçemediği görülmüştür. Sonuç olarak, topikal lipozomal PM uygulamaları leishmanianın sebep olduğu deri lezyonlarında etkili olabileceği görülmüştür (130).

Martinez-Gomis ve ark. (1999), serbest ve lipozomla kaplı laktoferrin ve laktoperoksidazın topikal uygulamalarının ağızdaki mikroorganizmalar üzerine etkisini ve dişlerde çürük gelişimini değerlendirmek amacıyla tavşanlar üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Lipozomla kaplı laktoferrin + laktoperoksidaz grubundan alınan tükürük örneklerinde, distile su veya laktoferrin ve laktoperoksidaz ile tedavi edilen gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde *S. sobrinus* sayısının daha fazla olduğu saptanmıştır. % 0,2 NaF ile veya lipozomla kaplı laktoferrin+ laktoperoksidaz ile tedavi edilen hayvanlarda distile su ile tedavi edilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde birinci büyük azılarında daha az miktarda lezyon görüldüğü bildirilmiştir. Lipozomla kaplı kombinasyonların topikal uygulamaları sonucunda toplam çürük miktarında azalmanın % 40 oranında, florid uygulamaları sonucunda ise % 31 oranında olduğu belirlenmiştir. Serbest laktoferrin ve serbest laktoperoksidazın çürük oranında istatistiksel olarak bir azalmaya neden olmadığı gözlemlenmiştir (131).

Harsanyi ve ark. (1986), çalışmalarında büyük çok lamelli lipozomların ağız ülserlerinde retansiyonlarının artırılması amacıyla kullanılımlarını araştırmışlardır. Lipozomla kaplandığında, triamkinolon'un ülserli mukoza bölgesine istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla taşındığı görülmüştür. Sonuçta, lipozomla kaplı ilaçların oral mukozadan daha iyi taşındığı görülmektedir (132).

Ayrıca oral kaviteye (ağız boşluğuna) uygulanan farklı lipozom formülasyonları da geliştirilmiştir (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılacak Olan Formülasyonların Hazırlanması

Çalışmada antibakteriyel etkisi değerlendirilecek olan, lizozim, laktoferrin ve lipozom içeren jel formülasyonları Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ve Farmakognozi ABD Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır. Formülasyonun içeriğinde yer alan materyaller ve üretici firma isimleri Tablo 5.'de görülmektedir.

Tablo 5. Formülasyonda yer alan materyallerin miktarları, fonksiyonları ve üretici firmaları

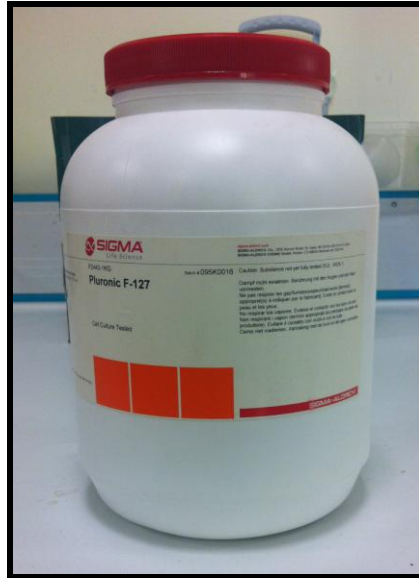
| FORMULASYON | TOPLAM MİKTAR % wt | FONKSİYON | ÜRETİCİ FİRMA |
|---|--|--------------------------------------|--|
| Lizozim | 4 mg/2mL | Antibakteriyel | SIGMA [®] -ALDRICH, USA |
| Laktoferrin | 2 mg/2mL | Antibakteriyel | SIGMA [®] -ALDRICH, USA |
| Sorensen's Çözeltisi (pH 5.0) | Qs | Tamponlayıcı ve stabilize edici ajan | NaH ₂ PO ₄ (SIGMA [®]) Na ₂ HPO ₄ (FLUKA [®]) |
| Pluronic F- 127 (Poloxamer) | 20 a/a | Taşıyıcı ve çözücü ajan | SIGMA [®] -ALDRICH, USA |
| DOTAP içeren Dondurularak kurutulmuş Lipozomal Formülasyon (DLD) | 2,5 mg/2 ml | Taşıyıcı sistem | SIGMA [®] -ALDRICH, USA |

3.1.1. Sorensen's Fosfat Çözeltisinin Hazırlanması (fosfat ile sodyum tuzları karışımı)

0,8 g/100 mL Sodyum Fosfat dibazik, Anhidroz ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (SIGMA[®], ACS reagent grade, USA) ve 0,947 g/100 mL Sodyum Fosfat monobazik, Monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (SIGMA[®], ACS reagent grade, USA) distile su ile ayrı ayrı karıştırıldıktan sonra 0,2 M, pH'sı 5,0 olan bu çözelti sodyum klorür (SIGMA[®], ultra pure grade, USA) ile birleştirilmiştir. 100 mL 5,0 pH'da Sorensen's Fosfat Çözeltisi (tampon çözeltisi) elde edilmiştir (Tablo 6).

3.1.2. Pluronic[®] F- 127 (Poloxamer) Hazırlanması

20 g Pluronic[®] F-127 (SIGMA[®]-ALDRICH, BASF Corp, USA) ilk önce 20 mL tampon çözeltisi ile çözüp +4 °C'de birkaç saat bekletildikten sonra geri kalan tampon çözeltisi ilave edilerek 100 mL'ye tamamlandıktan sonra % 20 g/100 mL a/a Pluronic[®] F- 127 (Poloxamer) jel formülasyonu elde edilmiştir (Tablo 6) (Resim 1).

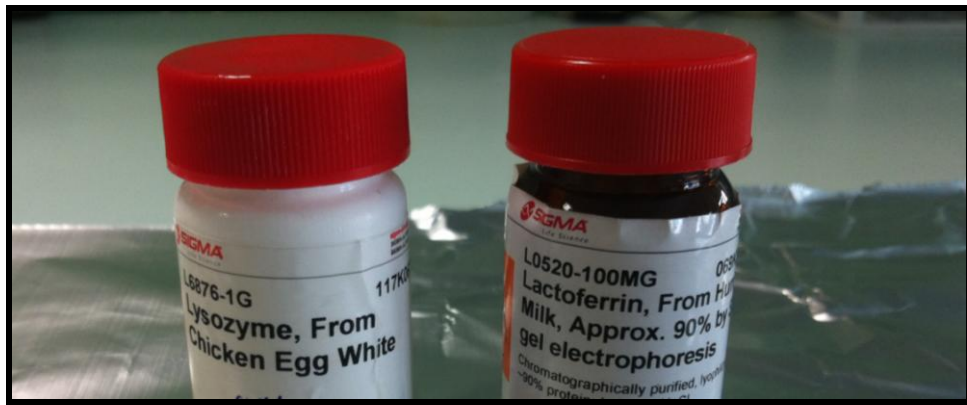


Resim 1. Pluronic[®] F-127 (SIGMA[®]-ALDRICH, BASF Corp, USA).

3.1.3. Lizozim ve Laktoferrinin Tampon Solusyonunda Hazırlanması

4 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®]-ALDRICH, USA), 2 mL 5,0 pH'da Sorensen's Fosfat Çözeltisi (tampon çözeltisi) içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır (Resim 2).

2 mg Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®]-ALDRICH, USA), 2 mL 5,0 pH'da Sorensen's Fosfat Çözeltisi (tampon çözeltisi) içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır (Resim 2).



Resim 2. Tavuk yumurtasından elde edilen Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ve insan sütünden elde edilen Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®]-ALDRICH, USA).

3.1.4. Lizozim ve Laktoferrinin Pluronic[®] 127 (Poloxamer) ile Hazırlanması

4 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ve 2 mg LF (L0520-100 MG, SIGMA[®]-ALDRICH, USA), 2 mL tampon solusyonu içerisinde çözdürüldükten sonra % 20 g/mL a/a Poloxamer 407 polimeri (SIGMA[®]-ALDRICH, BASF Corp, USA) ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.5. Lipozom Formulasyonu

Bu çalışmada kullanılacak olan fosfolipid DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) (DOTAP Chloride D6182, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) 100 mg kadar tartılıp, 2 mL kloroformda çözülerek, film tekniği ile lipozom şeklinde

veziküller hazırlanmaktadır (Tablo 6) (Resim 3). Kloroformda çözme işlemi gerçekleştirdikten sonra azot gazından geçirilmiştir. Uçan maddenin yoğunlaşarak toplanmasını sağlamak amacıyla Rotavaporda (Heidolph® Rotavapor, Lauda Alpha RA8) oda sıcaklığında azot vakum altında uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir (Resim 4). Organik çözücü kalmayınca kadar gerçekleştirilen uçurma işlemi sonucunda ince bir film tabakası elde edilmiştir. Tekrar azot gazından geçirildikten sonra Vakumlu etüvde (BINDER®) 24 saat bekletilmiştir. 5 mL tampon ve 20 tane cam boncuk ilave edilip tekrar azot gazından geçirildikten sonra 1 dakika boyunca Vorteksleme yapılmıştır. Daha sonra üçer dakikadan 3 kez Tip Sonikasyon yapılmıştır (BANDELİN® electronic D-12207, Berlin, Germany) (Resim 5). 800 nm'lik filtreden süzme/eleme (Whatman® polycarbonat membrane filtre) işlemi yapılmıştır. En son olarak lipozomun dondurularak kurutulma işlemi (liyofilizasyon) gerçekleştirilmiştir (CHRIST® LCG, ALPH 1-4 LSC) (Resim 6).



Resim 3. DOTAP Chloride D6182, SIGMA®-ALDRICH, USA.



Resim 4. Uçan maddenin yoğunlaşarak toplanmasını sağlamak amacıyla Rotavaporda (Heidolph® Rotavapor, Lauda Alpha RA8) oda sıcaklığında azot vakum altında uçurma işlemi.



Resim 5. Tip Sonikasyon (BANDELİN® electronic D-12207, Berlin, Germany).

3.1.6. Lipozomal jel sistemler

Hazırlanan lipozomlar pH 5,0'daki tampon çözeltisi içerisinde hidrate edilmiştir. Dondurularak kurutulduktan sonra hazırlamış olduğumuz Pluronic® F127 (Poloxamer) (SIGMA®-ALDRICH, BASF Corp, USA) sistemine entegre edilmiştir (Tablo 6).



Resim 6. Lipozomun liyofilizasyonu.

3.1.7. Lipozomal Lizozim ve Laktoferrin içeren Formülasyonun Hazırlanması

4 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ve 2 mg Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) 2 mL tampon solusyonu içerisinde çözdürüldükten sonra 2,5 mg/2mL DOTAP (DOTAP Chloride D6182, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ile karıştırılmıştır.

3.1.8. Lizozim ve Laktoferrinin Lipozomal Jel Sistemler ile Hazırlanması

4 mg Lizozim (L6876-1G, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ve 2 mg Laktoferrin (L0520-100 MG, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) 2 mL tampon solusyonu içerisinde çözdürüldükten sonra % 20 g/mL a/a Poloxamer 407 polimeri (SIGMA[®]-ALDRICH, BASF Corp, USA) ile karıştırılmıştır. Daha sonra 2,5 mg/2mL DOTAP (DOTAP Chloride D6182, SIGMA[®]-ALDRICH, USA) ile entegre edilmiştir.

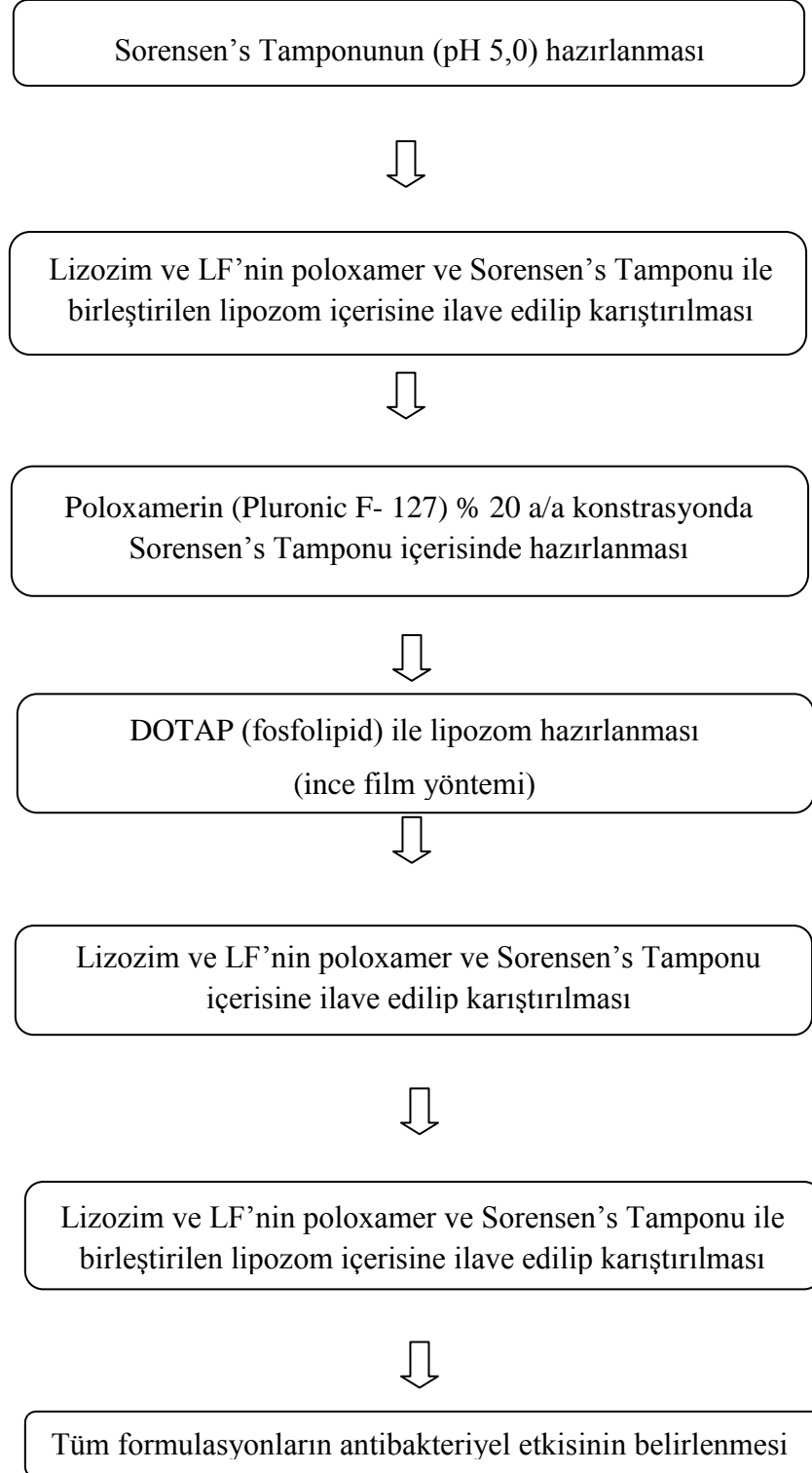
Tablo 6. Laktoferrin ve Lizozim içeren dört farklı taşıyıcı sistem şeklindeki formülasyonlar, içerikleri ve kodları

| KODLAR | FORMULASYONLAR | İÇERİKLERİ |
|----------|---|---|
| 1. Grup | Sorensen's Çözeltisi (pH:5.0 Tampon) | NaH ₂ PO ₄ : 0,8 g/100Ml Na ₂ HPO ₄ : 0,947 g/100mL |
| 2. Grup | Pluronic F- 127® (Jel) | Poloxamer 407 polimer tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. (20 g polimer /100 mL a/a) |
| 3. Grup | Lizozim +Laktoferrin | Lizozim (4mg/2mL) + LF (2 mg/2mL) tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. |
| 4. Grup | Lizozim+Laktoferrin+ Pluronic F-127® (Jel) | Lizozim (4mg/2mL) + LF (2 mg/2mL) tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. Poloxamer 407 polimeri ile karıştırılır (20 g polimer /100mL). |
| 5. Grup | Lipozom (DLD) | DLD (2,5 mg/2mL) tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. |
| 6. Grup | Pluronic F- 127® (Jel)+ Lipozom (DLD) | Poloxamer 407 polimeri, tampon solusyonu içerisinde dağıtılır (20 g polimer /100mL a/a). DLD (2,5 mg/2mL) ile karıştırılır. |
| 7. Grup | Lizozim+Laktoferrin+ Lipozom (DLD) | Lizozim (4 mg/2mL)+ LF (2 mg/2ml) tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. DLD (2,5 mg/2mL) ile karıştırılır. |
| 8. Grup | Lizozim+Laktoferrin+ Pluronic F-127® (Jel)+ Lipozom (DLD) | Lizozim (4 mg/2mL)+ LF (2 mg/2mL) tampon solusyonu içerisinde çözdürülür. Poloxamer 407 polimeri içerisinde dağıtılır (20 g polimer /100ml a/a). DLD (2,5 mg/2mL) ile karıştırılır. |
| 9. Grup | Klorheksidin (CHX) Kontrol Grubu Jel / Gargara | % 0,2 klorheksidin glukonat |
| 10. Grup | Pozitif Kontrol Grubu | Boş Hidroksiapatit Diskleri |

Çalışma basamakları aşağıdaki akış şemasında belirtilmiştir (Şema 1).

Çalışmanın Akış Şeması

Şema 1. Çalışmanın akış şeması

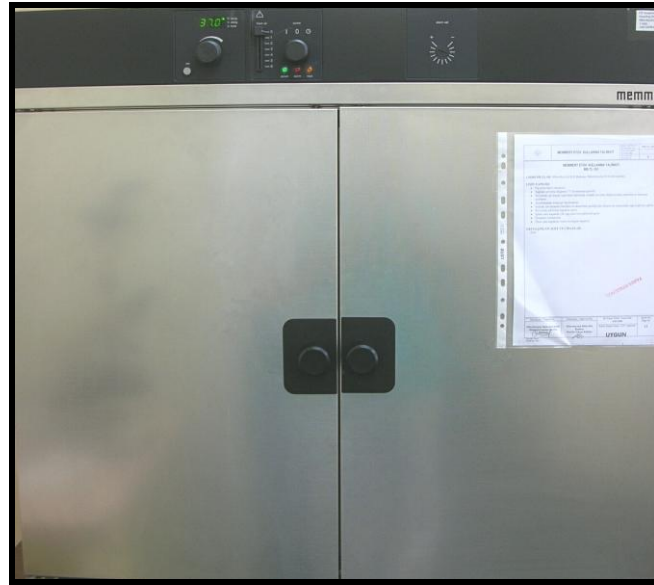


3.2. Antibakteriyel etkinin değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonlarının antibakteriyel etkisi, mikrobiyal dental plakta bulunan ve diş çürüğüne neden olduğu bilinen mikroorganizmalardan *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4646 suşları üzerinde İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda değerlendirilmiştir.

3.2.1. İnokulumun Hazırlanması

S. sobrinus (ATCC 33478), *S. mutans* (ATCC 25175) ve *L. acidophilus* (ATCC 4646) standart suşları Brain Heart Infusion (BHI) buyyonda % 80 N₂, % 10 H₂, % 10 CO₂'li anaerop sistemde (Anaerogen, Oxoid Ltd, Basingstone, Hampshire, England) 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Resim 7). Taze BHI buyyonda 1:20 sulandırılarak % 5 CO₂'li ortamda 2,5 saat daha inkübe edilmiştir. Aynı inkübasyon koşullarında, *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. Acidophilus* kültürlerinin bulanıklığı (1,5 x 10⁸ cfu/ml) No. 0,5 Mc Farland Standard'ına göre ayarlanmıştır. Kontrolü için 10 katlı sulandırımı yapılarak BHI agara ekilmiştir.



Resim 7. 37°C'lik etüv

3.2.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Deneyi

Çalışma gruplarının, *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* kültürlerine karşı antibakteriyel etkilerini değerlendirmek amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu steril mikropleyt kuyucuklarına ilk kuyucuk boş bırakılarak ikişer sıra 100 µl'lik BHI buyyon konulmuştur. İlk kuyucuklara 200 µl çalışma formülasyonları konulup 100 µl alınarak yan kuyucuklarda bulunan BHI buyyon ile son kuyucuk hariç seri halinde iki katlı sulandırma yapılarak konsantrasyonları azaltılmıştır (Resim 8, 9). Kontrol grubu olarak, % 0,2'lik klorheksidin glukonat içeren 400 mg/200 mL CHX gargara (Klorhex[®], DrogSan) kullanılmıştır (Resim 10). Kuyucuklara 20 µl bakteri süspansiyonu (son konsantrasyon: 1×10^5 cfu/mL) eklendikten sonra 37°C'de 24 saat boyunca anaerop ortamda inkübe edilmiştir. Bakteriyel üremenin değerlendirilmesi, Mikropleyt Spektrofotometresi (Uniquely Tecan Freedom EVO[®], Mannedorf, Switzerland) ile 620 nm dalga boyunda Magellan Programı kullanımıyla optik yoğunluk (OD) ölçülerek yapılmıştır (Resim 11, 12, 13). Yapılan üç bağımsız deneyin medyan değeri, MİK değeri olarak belirlenmiştir.



Resim 8, 9. 96 kuyucuklu steril mikropleyt kuyucuklarında çalışma grupları için ikişer sıra BHI buyyon kullanılarak 200 µl'lik hacimde iki katlı sulandırmaları



Resim 10. % 0,2'lik klorheksidin glukonat içeren 400 mg/200 mL (Klorhex[®], DrogSan)



Resim 11, 12, 13. Mikropleyt Spektrofotometresi (Uniquely Tecan Freedom EVO[®], Mannedorf, Switzerland) ile 620 nm dalga boyunda Magellan Programı kullanımıyla optik yoğunluk (OD) ölçülerek bakteriyel üremenin değerlendirilmesi

3.2.3. İn vitro Biyofilm Oluşumunun İnhibisyonu Çalışması

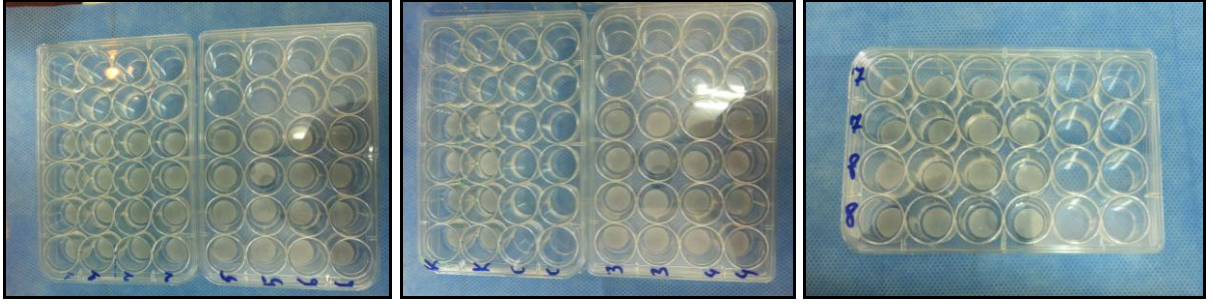
Çalışmamızın bu bölümünde seramik kaplı hidroksiapatit disklerle (Captal[®], Plasma Biotall Ltd, Tideswell, UK) deney gruplarında yer alan formülasyonlar ve kontrol grubu olarak klorheksidin jeli (Cervitec[®] Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) (Resim 14) uygulandıktan sonra *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilm oluşturma çalışmaları 24 saatte değerlendirilmiştir.

Deney gruplarını oluşturan sekiz farklı formülasyon, bir klorheksidin jel kontrol grubu ve bir boş diskin bulunduğu pozitif kontrol grubu ve her bir grupta sekiz adet olmak üzere toplam 160 adet seramik kaplı hidroksiapatit diski temin edilmiştir

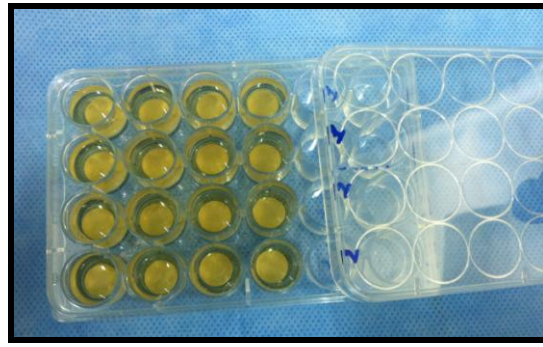
(Captal[®], Plasma Biotall Ltd, Tideswell, UK). 12 mm çapında ve 1 mm kalınlığında hazır olarak alınan hidroksiapatit diskleri (Resim 15, 16, 17) otoklavda steril edildikten sonra bir yüzeylerine sekiz farklı deney grubu formülasyonu ve klorheksidin jeli uygulanmıştır. Bu diskler 37°C’de 1 saat etüvde kurutulmak üzere bekletildikten sonra 24 kuyucuklu steril mikropleytlere yerleştirilmiştir. % 4’lk sakkaroz ilave edilen 1,6 mL BHI buyyon ve 200 µl bakteri süspansiyonu diskler üzerine eklendikten sonra (Resim 18); % 5 CO₂’li ortama (mum söndürme kavanozuna) alınarak 24 saat etüvde 37°C’de inkübe edilmiştir (Resim 19, 20, 21). 24 saatlik biyofilm incelemesi için diskler steril tuzlu su ile yıkanarak yapışmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır (Resim 22, 23, 24) ve yapışık hücreleri elde etmek için her bir disk 1,5 mL steril tuzlu su ve cam boncuklar içeren bir cam tüpe aktarılmıştır ve 1 dakika vortekslenmiştir (Elektro.mag MIG) (Resim 25, 26, 27). Süspansiyonlar yeni tüplere aktarılarak 5 s 30 W’da sonifiye edilmiştir. Solusyonlar, steril tuzlu su ile 8 katlı (10⁻⁸) seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra BHI agara ekim yapılmıştır ve 48 saat 37°C’de % 5 CO₂ ‘de inkübe edilmiştir (Resim 28). Oluşan koloniler sayılarak ortalama cfu/mL hesaplanmıştır.



Resim 14. Klorheksidin jel (Cervitec[®] Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)



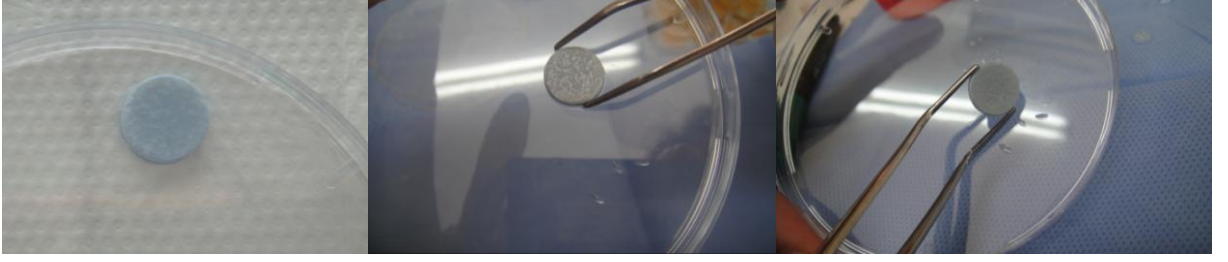
Resim 15, 16, 17. Mikropleytlar içerisinde 12 mm çapında ve 1 mm kalınlığında hazır olarak alınan seramik kaplı hidroksiapatit diskleri



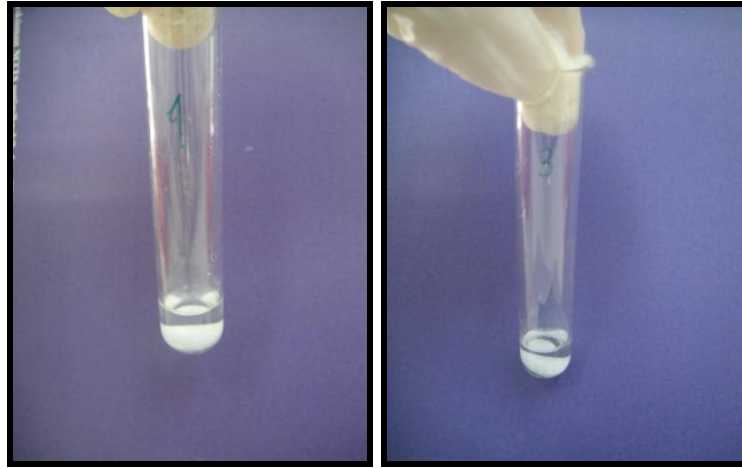
Resim 18. İn vitro biyofilm oluşumu için % 4'lük sakkaroz ilave edilen 1,6 ml BHI buyyon ve 200 µl bakteri süspansiyonunun diskler üzerine eklenmesi



Resim 19, 20, 21. % 5 CO₂'li ortama alınan örneklerin 24 saat etüvde 37°C'de inkübasyonu



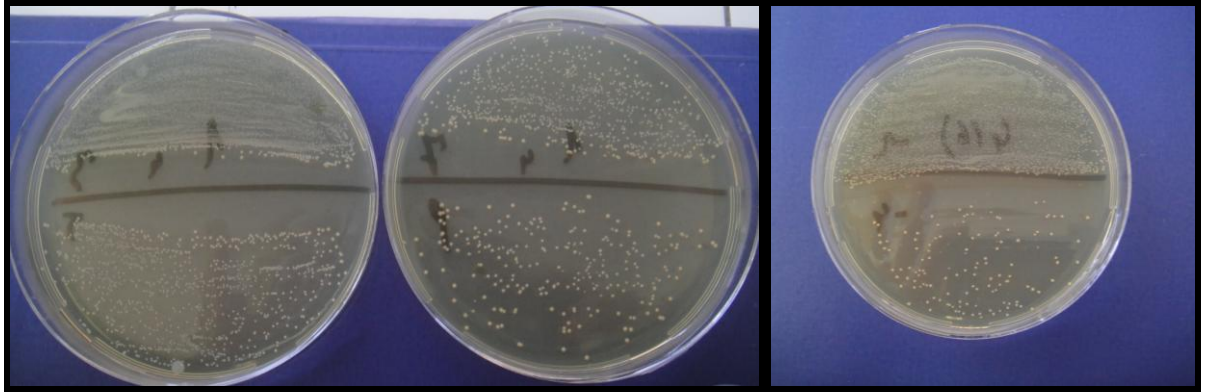
Resim 22, 23, 24. 24 saatlik biyofilm incelemesi için diskler steril tuzlu su ile yıkanması sonucu yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması ile diske tutan bakterilerin görünür hale gelmesi



Resim 25, 26. Hidroksiapatit disklere yapışık bakterileri elde etmek için her bir diskin 1,5 mL steril tuzlu su ve cam boncuklar içeren bir cam tüpe aktarılması



Resim 27. Cam tüpe aktarılan hidroksiapatit disklerin 1 dakika boyunca vortexlenmesi (Elektro.mag MIG)



Resim 28. Solusyonların, steril tuzlu su ile 8 katlı (10^{-8}) seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra BHI agara ekimi

3.2.3.1. Biyofilmlerin Scanning Electron Mikroskopunda (SEM'de) İncelenmesi

Seramik kaplı hidroksiapatit disklere uygulanan deney grubu formülasyonları ve klorheksidin jeli, 24 saat sonra *S. sobrinus* biyofilmleri oluşturulmuştur. Biyofilm oluşturulan bu HA diskler 1 saat boyunca 37 °C'de bekletildikten sonra örnekler fikse edilmek üzere 15 nm altın ile kaplanarak (Baltec® SCD005) 10 kV'da, SEM'de (ZEISS®) x 5000 büyütmede 'Smart SEM User Interface' bilgisayar programı kullanılarak incelenmiştir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır. *S. sobrinus* x 10⁶ ve *S. mutans* x 10⁹ değerlerinin normal dağılıma uymadığı gözlenmiş ve logaritmik transformasyonu alınmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma, median, interquartil range, geometrik ortalama) yanı sıra çoklu grupların gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi alt grup karşılaştırmalarında Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Minimal İnhibitör Konsantrasyon Deneyinin Bulguları

Çalışmamızın birinci bölümünde, *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* kültürlerine karşı antibakteriyel etkilerin değerlendirilmesi amacıyla sekiz deney grubunun ve CHX kontrol grubunun minimal inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir (MİK). Yapılan üç bağımsız deneyin medyan değeri, MİK olarak belirtilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Sekiz farklı formülasyonun ve klorheksidin kontrol grubunun *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı etkisinin görüldüğü minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri (MİK)

| MİK | <i>S.sobrinus</i> | <i>S.mutans</i> | <i>L.acidophilus</i> |
|----------------|--|---|---|
| 1. Grup | Yok | Yok | Yok |
| 2. Grup | % 2,5 g/mL Poloxamer 407 polimeri | % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri | % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri |
| 3. Grup | Yok | Yok | Yok |
| 4. Grup | 0,5 mg/mL Lizozim 0,25 mg/mL Laktoferrin % 5 g/mL Poloxamer 407 polimeri | 1 mg/mL Lizozim 0,5 mg/mL Laktoferrin % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri | 1 mg/mL Lizozim 0,5 mg/mL Laktoferrin % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri |
| 5. Grup | Yok | Yok | Yok |
| 6. Grup | % 5 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,3125 mg/mL DLD | % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,625 mg/mL DLD | % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,625 mg/mL DLD |
| 7. Grup | Yok | Yok | Yok |
| 8. Grup | 0,5 mg/mL Lizozim 0,25 mg/mL Laktoferrin % 5 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,3125 mg/mL DLD | 1 mg/mL Lizozim 0,5 mg/mL Laktoferrin % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,625 mg/mL DLD | 1 mg/mL Lizozim 0,5 mg/mL Laktoferrin % 10 g/mL Poloxamer 407 polimeri 0,625 mg/mL DLD |
| 9. Grup | 0,000096 mg/mL | 0,000078 mg/mL | 0,000048 mg/mL |

Çalışmamızda 5,0 pH'da çözücü olarak kullanılan Sorensen's tampon çözeltisi (**1. Grup**) *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı etkili bulunmamıştır.

Yalnız Pluronic F-127[®] marka poloxamer 407'nin kullanıldığı jel formülasyonunun (**2. Grup**) *S. sobrinus*'a antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyon % 2,5 g/mL, *S. mutans*'a ve *L. acidophilus*'a etki gösterdiği en düşük konsantrasyon ise % 10 g/mL olarak belirlenmiştir.

Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözündürülerek oluşturulan formülasyonun (**3. Grup**), *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir.

Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten sonra Pluronic F-127[®] marka poloxamer 407 polimeri ile birleştirilerek hazırlanan formülasyonun (**4. Grup**), *S. sobrinus*'a antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonların lizozim için 0,5 mg/mL, Laktoferrin için 0,25 mg/mL ve poloxamer 407 polimer için % 5 g/mL olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına etki eden en düşük konsantrasyonların ise Lizozim için 1 mg/mL, LF için 0,5 mg/mL ve poloxamer 407 polimer için % 10 g/mL olduğu gözlemlenmiştir.

DLD'nin tampon solusyonu içerisinde çözünmesi ile hazırlanan lipozom formülasyonu (**5. Grup**) *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı etkili bulunmamıştır.

Poloxamer 407 polimeri, tampon solusyonu içerisinde dağıtıldıktan sonra DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonun (**6. Grup**), *S. sobrinus*'a antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonların poloxamer 407 polimeri için % 5 g/mL, DLD için 0,3125 mg/mL olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonların ise poloxamer 407 polimeri için % 10 g/mL, DLD için 0,625 mg/mL olduğu gözlemlenmiştir.

Lizozim ve Laktoferrinin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten sonra, DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyon (**7. Grup**), *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı etkili bulunmamıştır.

Lizozim ve Laktoferrinin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten ve poloxamer 407 polimeri ile karıştırıldıktan sonra DLD'nin ilave edilmesiyle oluşturulan formülasyon (**8. Grup**) *S. sobrinus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonların; Lizozim için 0,5 mg/mL, Laktoferrin için 0,25 mg/mL, poloxamer 407 polimer için % 5 g/mL ve DLD için 0,3125 mg/mL olduğu belirlenmiştir. *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyonların ise Lizozim için 1 mg/mL, Laktoferrin için 0,5 mg/mL, poloxamer 407 polimer için % 10 g/mL ve DLD için 0,625 mg/mL olduğu gözlemlenmiştir.

Kontrol grubu (**9. Grup**) olarak kullanılan % 0,2'lik CHX gargaranın, *S. sobrinus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyon 0,000096 mg/mL, *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyon 0,000078 mg/mL, *L. acidophilus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği en düşük konsantrasyon ise 0,000048 mg/mL olarak belirlenmiştir.

4.2. Biyofilm Deneyinin Bulguları

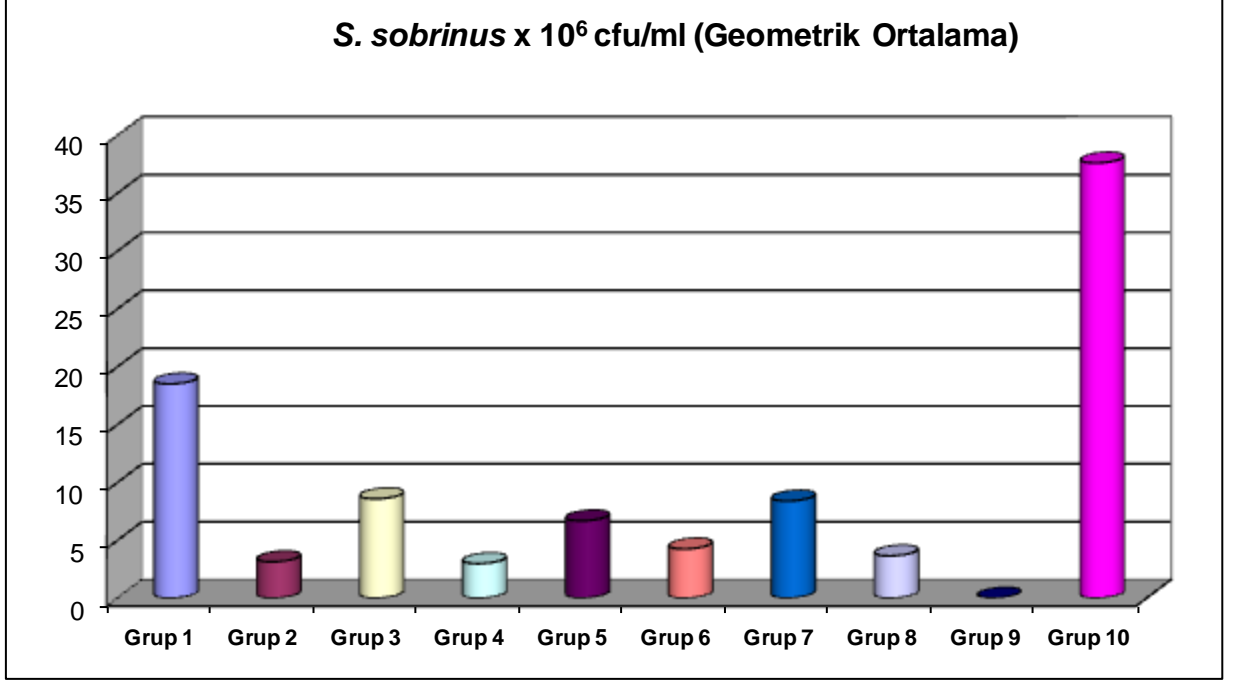
Çalışmamızın ikinci bölümünde, sekiz farklı formülasyondan oluşan deney grupları, klorheksidin jel (Cervitec® Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) kontrol grubu ve hiçbir işlem uygulanmayan örneklerin yer aldığı pozitif kontrol grubundaki hidroksiapatit diskleri üzerinde oluşturulan *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmlerinde belirlenen ve cfu/mL olarak hesaplanan değerlerin ortalamaları, geometrik ortalamaları (Grafik 1, 2), standart sapma ve median değerleri Tablo 8 ve 10'da görülmektedir.

Tablo 8. Deney ve kontrol grupları üzerinde oluşturulan *S. sobrinus* biyofilmindeki canlı bakteri miktarı (cfu/mL). Kruskal Wallis testi ile deney ve kontrol gruplarının karşılaştırılması.

| <i>S. sobrinus</i> x 10 ⁶ cfu/MI | Ort±SS | Median (IQR) | Geometrik Ortalama |
|---|------------|----------------|--------------------|
| 1. Grup | 21±11,21 | 18 (10,5-31) | 18,51 |
| 2. Grup | 5,63±5,83 | 4,7 (0,8-7,75) | 3,14 |
| 3. Grup | 14,2±13,62 | 10,3 (3,55-25) | 8,58 |
| 4. Grup | 4,23±4,87 | 2,4 (1,75-4,1) | 2,98 |
| 5. Grup | 8,35±4,73 | 8,2 (4,35-13) | 6,68 |
| 6. Grup | 5,9±5,86 | 3 (2,55-9,95) | 4,25 |
| 7. Grup | 11,7±11,99 | 8,4 (4,85-12) | 8,39 |
| 8. Grup | 4,33±2,28 | 3,8 (3,1-6,6) | 3,65 |
| 9. Grup | 0±0 | 0 (0-0) | 0,00 |
| 10. Grup | 46,25±25,6 | 53 (18,5-65) | 37,61 |
| KW | | 48,37 | |
| | | 0,0001 | |

24 saatlik biyofilmden, tüm grupların *S. sobrinus* x 10⁶ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (KW= 48,37, p=0,0001) (Tablo 8). Tüm grupların bakteri miktarları incelendiğinde en yüksek değer pozitif kontrol grubunda (Grup 10) ve en düşük değer ise klorheksidin jel grubunda (grup 9) olduğu görülmüştür. Buna göre, 24 saatlik *S. sobrinus* biyofilm oluşumuna en yüksek inhibisyon aktivitesi klorheksidin jel uygulaması sonrasında sağlanmıştır. Klorheksidin

jel grubunu (9. Grup), jel içeren formülasyonlardan sırası ile 4., 2., 8. ve 6. Grupların izlediği belirlenmiştir. Deney ve kontrol gruplarının Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre ikili karşılaştırmaları Tablo 9'da görülmektedir.



Grafik 1. Deney ve kontrol gruplarının *S. sobrinus* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının geometrik ortalamaları.

Tablo 9. Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre *S. sobrinus* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının gruplar arası ikili karşılaştırılması.

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi | P |
|---|---------------|
| 1. Grup / 2. Grup | 0,003 |
| 1. Grup / 3. Grup | 0,188 |
| 1. Grup / 4. Grup | 0,003 |
| 1. Grup / 5. Grup | 0,008 |
| 1. Grup / 6. Grup | 0,007 |
| 1. Grup / 7. Grup | 0,065 |
| 1. Grup / 8. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 1. Grup / 10. Grup | 0,049 |
| 2. Grup / 3. Grup | 0,189 |
| 2. Grup / 4. Grup | 0,752 |
| 2. Grup / 5. Grup | 0,189 |
| 2. Grup / 6. Grup | 0,635 |
| 2. Grup / 7. Grup | 0,207 |
| 2. Grup / 8. Grup | 0,834 |
| 2. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 2. Grup / 10. Grup | 0,002 |
| 3. Grup / 4. Grup | 0,058 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| 3. Grup / 5.Grup | 0,636 |
| 3. Grup / 6. Grup | 0,114 |
| 3. Grup / 7. Grup | 0,752 |
| 3. Grup / 8. Grup | 0,141 |
| 3. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 3. Grup / 10. Grup | 0,013 |
| 4. Grup / 5.Grup | 0,103 |
| 4. Grup / 6. Grup | 0,316 |
| 4. Grup / 7. Grup | 0,018 |
| 4. Grup / 8.Grup | 0,293 |
| 4. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 4. Grup /10. Grup | 0,002 |
| 5. Grup / 6. Grup | 0,247 |
| 5. Grup / 7. Grup | 0,916 |
| 5. Grup / 8. Grup | 0,066 |
| 5. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 5. Grup / 10. Grup | 0,003 |
| 6. Grup / 7.Grup | 0,113 |
| 6. Grup / 8.Grup | 0,561 |
| 6. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 6. Grup / 10. Grup | 0,002 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| 7. Grup / 8.Grup | 0,059 |
| 7. Grup / 9.Grup | 0,0001 |
| 7. Grup / 10. Grup | 0,006 |
| 8. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 8.Grup / 10. Grup | 0,001 |
| 9. Grup / 10. Grup | 0,0001 |

[Koyu renkli değerler istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$)]

Hiçbir işlem uygulanmayan örneklerin yer aldığı pozitif kontrol grubu ile diğer tüm grupların ikili karşılaştırılmalarında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$), pozitif kontrol grubunda yer alan örneklerde diğer tüm gruplardan anlamlı düzeyde daha yüksek miktarda mikroorganizma bulunduğu görülmüştür (Geometrik ort. $37,61 \times 10^6$ cfu/mL).

Klorheksidin jel kontrol grubunun, tüm deney grupları ile ikili karşılaştırmalarında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p = 0,0001$) ve bu grupta yer alan örneklerde hiç mikroorganizma üremediği belirlenmiştir.

S. sobrinus biyofilmi oluşumu üzerindeki etkisi Klorheksidin jel kontrol grubundan sonra en yüksek olan Lizozim ve Laktoferrin içeren Poloxamer 407 (jel) formülasyonunun bulunduğu **4. Grup'un** (Geometrik ort. $2,98 \times 10^6$ cfu/mL) yalnızca Sorensen Çözeltisi içeren Tampon solüsyonunun bulunduğu **1. Grup** (Geometrik ort. $18,51 \times 10^6$ cfu/mL) ile ($p = 0,03$), Lizozim ve Laktoferrinin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten sonra, DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonun bulunduğu **7. Gruba** (Geometrik ort. $8,39 \times 10^6$ cfu/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek etki gösterdiği ($p = 0,018$), diğer deney grupları (**2., 3., 5., 6. ve 8. Gruplar**) ile arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

4. Grup'tan sonra *S. sobrinus* biyofilmi oluşumu üzerindeki en yüksek etkiyi gösterdiği belirlenen Lizozim ve Laktoferrinin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten ve Poloxamer 407 polimeri ile karıştırıldıktan sonra DLD'nin ilave edilmesiyle oluşturulan formülasyonun yer aldığı **8. Grubun** (Geometrik ort. $3,65 \times 10^6$ cfu/mL) yalnız Sorensen's Çözeltisi içeren Tampon solusyonunun bulunduğu **1. Grup** (Geometrik ort. $18,51 \times 10^6$ cfu/mL) ile arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,001$), diğer deney grupları ile arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

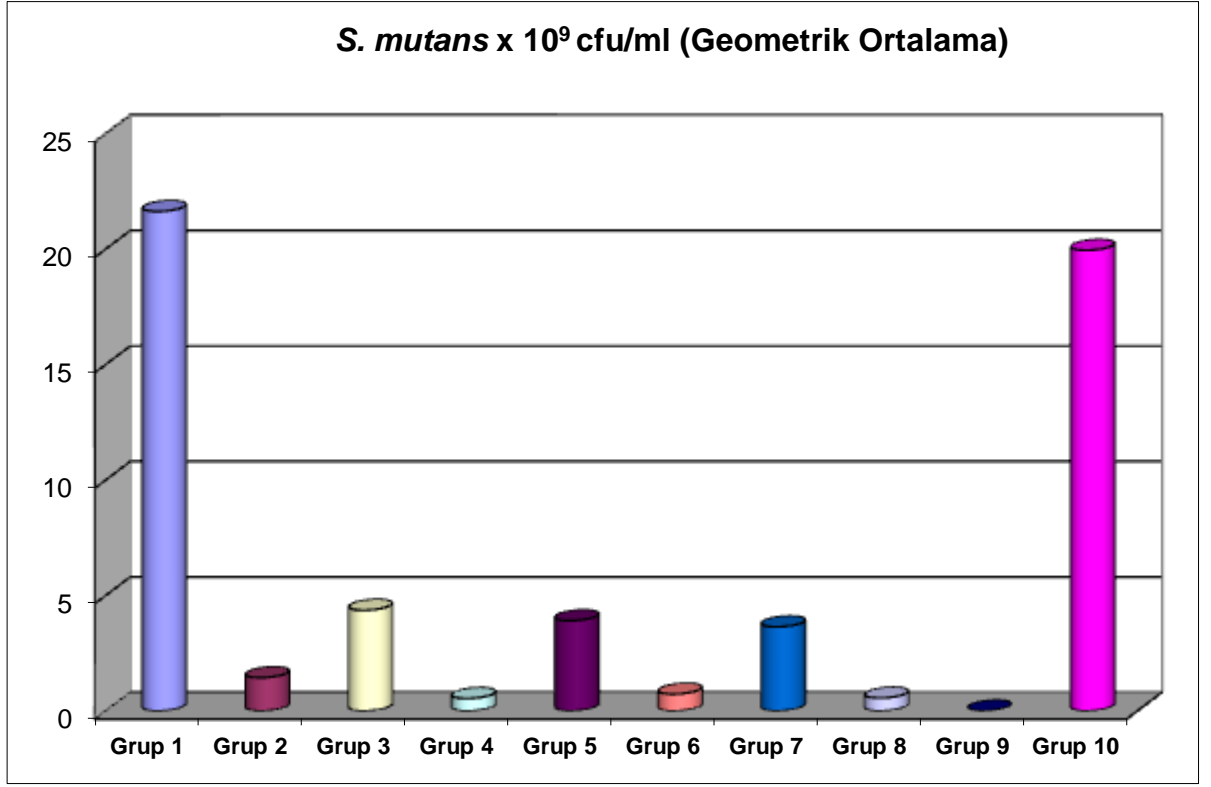
Aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan, yalnız Pluronic F-127® marka poloxamer 407'nin kullanıldığı jel formülasyonunun yer aldığı **2. Grup** (Geometrik ort. $3,14 \times 10^6$ cfu/mL) ve Poloxamer 407 polimeri, tampon solusyonu içerisinde dağıtıldıktan sonra DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonun yer aldığı **6. Grubun** (Geometrik ort. $4,25 \times 10^6$ cfu/mL) yalnız Sorensen Çözeltisi içeren Tampon solusyonunun bulunduğu **1. Grup** (Geometrik ort. $18,51 \times 10^6$ cfu/mL) ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,003$, $p=0,007$), diğer deney grupları ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Tablo 10. Deney ve kontrol grupları üzerinde oluşturulan *S. mutans* biyofilmdeki canlı bakteri miktarı (cfu/mL). Kruskal Wallis testi ile deney ve kontrol gruplarının karşılaştırılması.

| <i>S. mutans</i> x 10 ⁹ cfu/mL | Ort±SS | Median (IQR) | Geometrik Ortalama |
|--|-------------|------------------|-----------------------|
| Grup 1 | 23,29±10,01 | 18 (16-33) | 21,63 |
| Grup 2 | 1,64±0,87 | 1,45 (0,95-2,55) | 1,44 |
| Grup 3 | 5,25±4,15 | 3,6 (2,85-5,9) | 4,36 |
| Grup 4 | 0,59±0,25 | 0,51 (0,46-0,84) | 0,54 |
| Grup 5 | 5,73±5,24 | 3,3 (1,6-8) | 3,91 |
| Grup 6 | 0,85±0,48 | 0,68 (0,5-1,2) | 0,73 |
| Grup 7 | 4,2±2,21 | 4,05 (2,03-6,53) | 3,64 |
| Grup 8 | 0,71±0,49 | 0,59 (0,26-1,16) | 0,56 |
| Grup 9 | 0±0 | 0 (0-0) | 0,00 |
| Grup 10 | 22,05±9,72 | 21 (13,25-30,75) | 19,95 |
| KW | | 66,94 | |
| P | | 0,0001 | |

24 saatlik biyofilmde, tüm grupların *S. mutans* x 10⁹ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (KW= 66,94, p=0,0001) (Tablo 10). Tüm grupların bakteri miktarları incelendiğinde en yüksek değer Sorensen's Tampon Çözeltilisinin bulunduğu formülasyonda (**1. Grup**) ve en düşük değer ise klorheksidin jel grubunda (**9. Grup**) olduğu görülmüştür. Buna göre, 24 saatlik *S. mutans* biyofilm oluşumuna en yüksek inhibisyon aktivitesi klorheksidin jel uygulaması sonrasında sağlanmıştır. Klorheksidin jel grubunu (**9. Grup**), jel içeren formülasyonlardan sırası ile

4., 8., 6. ve 2. Grupların izlediği belirlenmiştir. Deney ve kontrol gruplarının Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre ikili karşılaştırmaları Tablo 11'de görölmektedir.



Grafik 2. Deney ve kontrol gruplarının *S. mutans* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının geometrik ortalamaları.

Tablo 11. Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre *S. mutans* biyofilmindeki canlı bakteri sayılarının grupların kendi aralarında ikili karşılaştırılması.

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi | P |
|---|---------------|
| 1.Grup / 2. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 3. Grup | 0,002 |
| 1. Grup / 4. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 5. Grup | 0,004 |
| 1. Grup / 6. Grup | 0,002 |
| 1. Grup / 7. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 8. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 9. Grup | 0,001 |
| 1. Grup / 10. Grup | 0,908 |
| 2. Grup / 3. Grup | 0,003 |
| 2. Grup / 4. Grup | 0,003 |
| 2. Grup / 5. Grup | 0,037 |
| 2. Grup / 6. Grup | 0,064 |
| 2.Grup / 7. Grup | 0,012 |
| 2. Grup / 8. Grup | 0,021 |
| 2. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 2. Grup /10. Grup | 0,001 |
| 3. Grup / 4. Grup | 0,001 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| 3. Grup / 5. Grup | 0,817 |
| 3. Grup / 6. Grup | 0,001 |
| 3. Grup / 7. Grup | 0,833 |
| 3. Grup / 8. Grup | 0,001 |
| 3. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 3. Grup / 10. Grup | 0,002 |
| 4. Grup / 5. Grup | 0,003 |
| 4. Grup / 6. Grup | 0,183 |
| 4. Grup / 7. Grup | 0,001 |
| 4. Grup / 8. Grup | 0,916 |
| 4. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 4. Grup / 10. Grup | 0,001 |
| 5. Grup / 6. Grup | 0,009 |
| 5. Grup / 7. Grup | 0,772 |
| 5. Grup / 8. Grup | 0,004 |
| 5. Grup / 9. Grup | 0,001 |
| 5. Grup / 10. Grup | 0,003 |
| 6. Grup / 7. Grup | 0,002 |
| 6. Grup / 8. Grup | 0,523 |
| 6. Grup / 9. Grup | 0,001 |
| 6. Grup / 10. Grup | 0,001 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| 7. Grup / 8. Grup | 0,001 |
| 7. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 7. Grup / 10. Grup | 0,001 |
| 8. Grup / 9. Grup | 0,0001 |
| 8. Grup / 10. Grup | 0,001 |
| 9. Grup / 10. Grup | 0,0001 |

[Koyu renkli değerler istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05)]

Hiçbir işlem uygulanmayan örneklerin yer aldığı pozitif kontrol grubu (**10. Grup**) ile yalnız Sorensen's Çözeltisi içeren Tampon solusyonunun bulunduğu **1. Grup** (Geometrik ort. $21,63 \times 10^9$ cfu/mL) dışında kalan diğer tüm grupların ikili karşılaştırılmalarında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,05), pozitif kontrol grubunda yer alan örneklerde diğer tüm gruplardan anlamlı düzeyde daha yüksek miktarda mikroorganizma bulunduğu görülmüştür (Geometrik ort. $19,95 \times 10^9$ cfu/mL).

Klorheksidin jel kontrol grubunun, tüm deney grupları ile ikili karşılaştırmalarında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p=0,0001) ve bu grupta yer alan örneklerde hiç mikroorganizma üremediği belirlenmiştir.

S. mutans biyofilmi oluşumu üzerindeki etkisi CHX jel kontrol grubundan sonra en yüksek olan Lizozim ve Laktoferrin içeren Poloxamer 407 (jel) formulasyonunun bulunduğu **4. Grup'un** (Geometrik ort. $0,54 \times 10^9$ cfu/mL) 1., 2., 3., 5., 7. Gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (p<0,05).

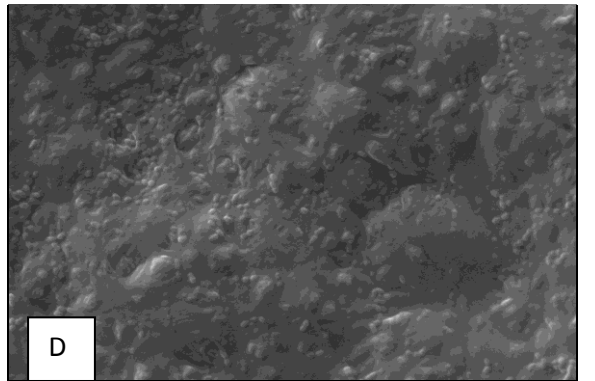
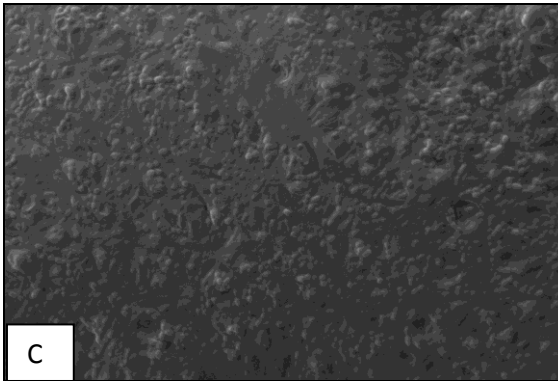
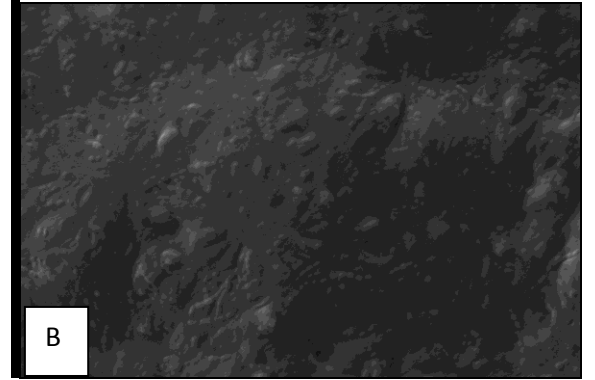
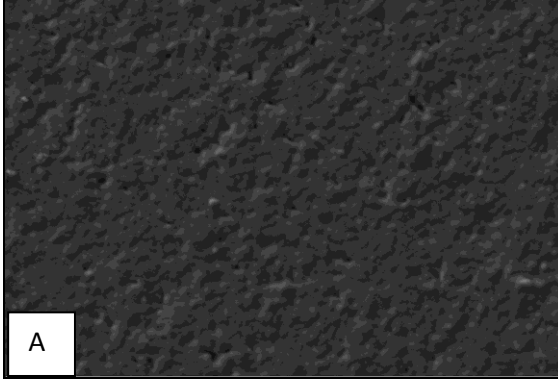
4. Grup'tan sonra *S. mutans* biyofilmi oluşumu üzerindeki en yüksek etkiyi gösterdiği belirlenen Lizozim ve Laktoferrinin tampon çözeltisi içinde çözdürüldükten ve Poloxamer 407 polimeri ile karıştırıldıktan sonra DLD'nin ilave edilmesiyle

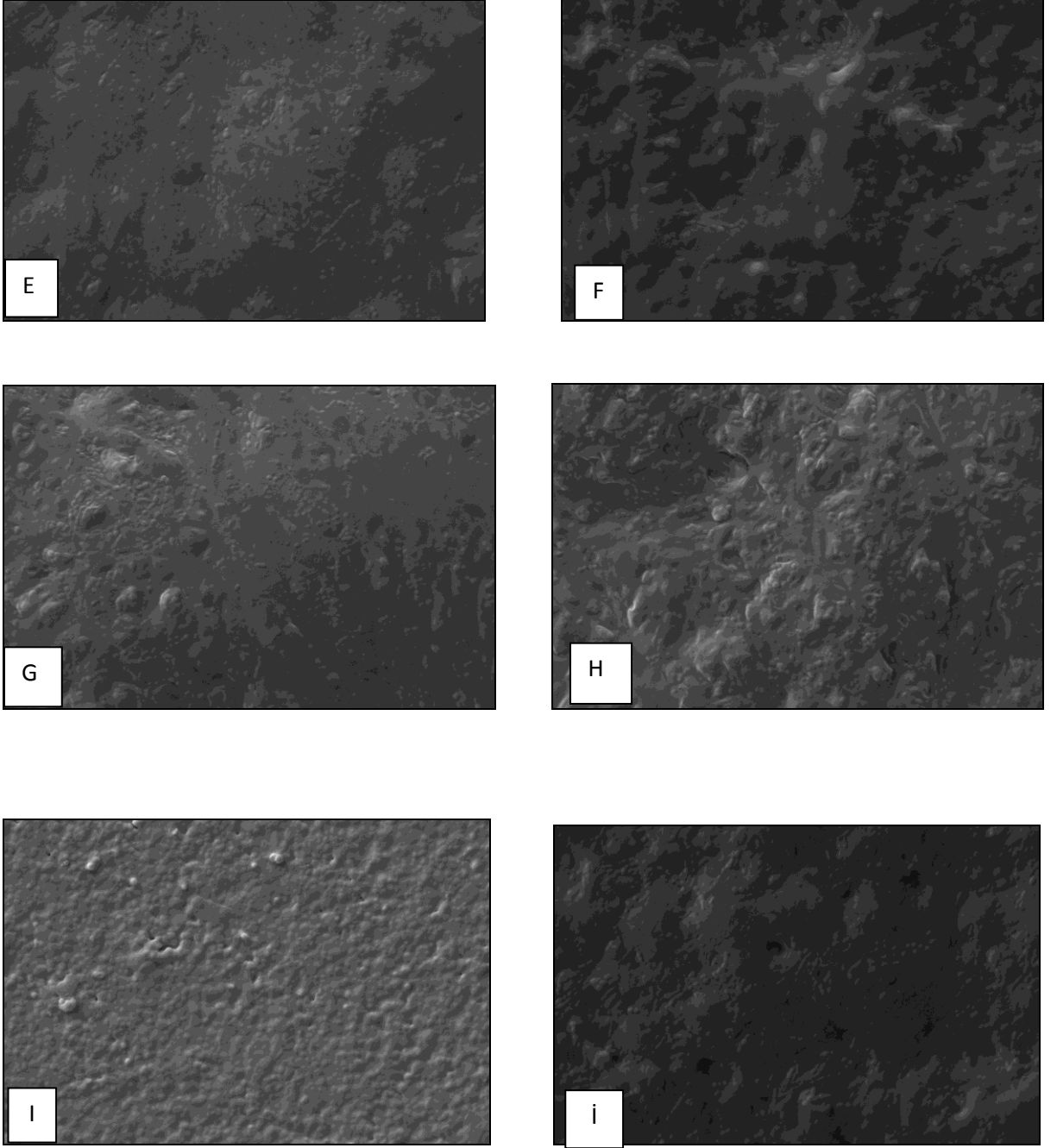
oluşturulan formülasyonun yer aldığı **8. Grup'taki** örneklerde belirlenen mikroorganizma miktarının (Geometrik ort. $0,56 \times 10^9$ cfu/mL) 1., 2., 3., 5. ve 7. Gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ($p < 0,05$), 4. Grup ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Poloxamer 407 polimeri, tampon solüsyonu içerisinde dağıtıldıktan sonra DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonun yer aldığı **6. Grubun** (Geometrik ort. $0,73 \times 10^9$ cfu/mL) **1., 3., 5. ve 7. Gruplara** göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Yalnız Pluronic F-127® marka poloxamer 407'nin kullanıldığı jel formülasyonunun yer aldığı **2. Grubun** (Geometrik ort. $1,44 \times 10^9$ cfu/mL) *S. mutans* biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkisi 1., 3., 5., 7. ve 8. Gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

4.3. Scanning Electron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri





Resim 29. Deney ve kontrol gruplarının uygulandığı 24 saatlik *S. sobrinus* (ATCC 33478) biyofilmlerinin Scanning Electron Mikroskopundaki (ZEISS®) görüntüleri: (A). 1. Grup'taki formulasyonun; (B) 2. Grup'taki formulasyonun; (C) 3. Grup'taki formulasyonun; (D) 4. Grup'taki formulasyonun; (E) 5. Grup'taki formulasyonun; (F) 6. Grup'taki formulasyonun; (G). 7. Grup'taki formulasyonun; (H)

8. Grup'taki formülasyonun; (I) 9. Grup'taki formülasyonun; (İ) 10. Grup'taki formülasyonun *S. sobrinus* biyofilmi oluşumu üzerindeki etkisinin SEM'de x 5000 büyütmede 'Smart SEM User Interface' bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmesi.

Sekiz farklı formülasyonun, klorheksidin kontrol grubunun (9. Grup) ve pozitif kontrol grubunun (10. Grup), *S. sobrinus* (ATCC 33478) biyofilmi oluşumu üzerine etkisinin Scanning Electron Mikroskopunda (ZEISS®) x 5000 büyütmede incelendiği görüntülerde, yalnızca 9. Grup'ta bakteriye rastlanmamıştır. 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. ve 10. Gruplarda bakterilerin zincir şeklinde koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, SEM görüntüleri incelendiğinde 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. ve 10. Gruplar arasında *S. sobrinus* (ATCC 33478) biyofilmi oluşumu üzerine etkilerinin karşılaştırılması yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

5.1. Dental Biyofilmde Bulunan *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* ve *Laktobasillus acidophilus*'un Diş Çürüğü Oluşumundaki Etkilerinin Tartışılması

MS, insanlarda diş çürüğüne neden olan en önemli etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir. MS'nin sabit kolonizasyonları için dişlerin ya da başka sert yüzeylerin varlığı gerekmektedir. Bu nedenle çocuklarda dişlerin sürmesinden sonra yerleşim göstermektedirler (133).

Diş çürüklerinin başlangıcında MS minede fissürlere, hatta dentine invaze olabilmektedirler. Çocukların ağız mikroflorasında MS yaşamın erken dönemlerinde saptanmaktadır. Yapılan çalışmalara göre çocuklar 1,5-3 yaş arası MS ile enfekte olmaktadır. Enfekte oldukları dönem, çürüğün yaygın olduğu toplumlarda 1 yaş, çürüğün az görüldüğü toplumlarda 2,5-3 yaş olarak bildirilmektedir. Erken dönemlerde enfekte olan çocuklarda yüksek çürük riski söz konusu olmaktadır (134).

Epidemiyolojik çalışmalara göre çocuklarda ve gençlerde mine çürüğünün, yaşlılarda kök çürüğünün ve bebeklerde biberon çürüğünün etiyojisinde MS'nin birincil patojen olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalara göre *S. mutans*'ın fissürlerde *S. sobrinus*'dan daha fazla bulunduğu bildirilmektedir (135).

Yapılan araştırmalarda *S. sobrinus* sıklığı ile çürük aktivitesi arasında bir ilişki kurulmuştur. *S. sobrinus* ve *S. mutans*'ın ağızda lokalize olduğu bölgeleri inceleyen çalışmalarda, *S. mutans*'ın sıklıkla fissürlerde bulunmasına karşın, *S. sobrinus*'un aproksimal bölgelerden, fissürlere oranla daha fazla miktarda izole edildiği ve ağızda farklı yerleşim bölgelerini tercih ettikleri gösterilmiştir (136).

Diş hekimliği tarihçesine bakıldığında Laktobasiller'in diş çürüğü oluşumunda etkili olduğu bilinen ilk mikroorganizmalar olduğu görülmektedir. Dental plak ile kaplı sağlıklı yüzeylerde farklı miktarlarda Laktobasiller'e rastlanıldığı çalışmalarda bildirilmiştir (137, 138, 139). Bununla birlikte, *Beighton ve ark. (2004)* 3-4 yaş grubu

çocuklarda yaptıkları çalışmalarında, tükürük örneklerinde Laktobasiller'in bulunduğu belirlenen çocukların % 54'ünde diş çürüğüne rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu çocukların % 7'sinde diş çürüğüne rastlanmamıştır (140).

Filoché ve ark. (2004), Laktobacilli'nin tek başına biyofilm oluşturma yeteneklerinin zayıf olduğunu yaptıkları çalışmalarında bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus*'un monobiyofilmlerinin, *Actinomyces* suşlarıyla oluşturduğu çoklu biyofilme göre 7-20 kat daha zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar Laktobacilli'nin, farklı türden bakteriler ile birlikte oluşturdukları çoklu biyofilme patojenik özellik kazandıklarını belirtmişlerdir (141).

Çalışmamızda, lizozim ve laktoferrin içeren jel ve/veya solüsyon şeklinde veya bu solüsyon ve/veya jellere lipozomların ilave edilmesiyle oluşturulan formülasyonların, *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilm oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Laktobasil biyofilmi oluşumu üzerinde etkileri değerlendirilmemiştir.

5.2. Çalışma Yöntemlerinin Tartışılması

Çok sayıda mikroorganizma kolonilerinin bulunduğu ağız boşluğu, karmaşık ekolojik dengesinin korunmasında rol oynayan antibakteriyel peptidleri içermektedir. Yapılan çalışmalarda, diş çürüğü ve periodontal hastalıkların dental plak veya daha geniş bir tanımlama ile diş yüzeylerine bağlanan ve kendi ürettikleri polimerik matriks ile korunan çok sayıda mikroorganizma türlerini içeren bir biyofilm varlığı ile ilişkili olduğu görülmektedir. Dental plakta bulunan bakterilerin kontrol altına alınmasının, ağız hastalıklarından korunmada ve bu hastalıkların tedavisinde önem taşıdığı görülmektedir (142, 143).

Antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bir mikroorganizmanın gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu "Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK)" olarak belirlenir. Dilüsyon testleri sonucunda elde

edilen MİK değerleri, diş urğne neden olan mikroorganizmayı inhibe etmek için gerekli olan antimikrobiyal ilaç konsantrasyonunu vermektedir (144).

İlgili literatür incelendiğinde peptidlerin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda MİK değerlerinin belirlendiği, bakteriyel üremenin değerlendirilmesi için mikrodilüsyon yönteminin kullanıldığı ve ölçümler için Mikropleyt Spektrofotometresi kullanıldığı görülmektedir (62, 55). Çalışmamızda daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemlerle uyumlu olarak, MİK değerlerini belirlemek amacıyla, mikrodilüsyon yöntemini kullanmıştır. Bakteriyel üremenin değerlendirilmesi, Mikropleyt Spektrofotometresi (Uniquely Tecan Freedom EVO[®], Mannedorf, Switzerland) ile 620 nm dalga boyunda Magellan Programı kullanımıyla OD ölçülerek yapılmıştır.

Çalışmamızda sekiz farklı formülasyonun ve % 0,2'lik klorheksidin glukonat gargaranın (Klorhex[®], Drogosan), *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 33478, *L. acidophilus* ATCC 4646 suşlarına karşı antibakteriyel etkileri değerlendirilmiştir. Altman H (2006) ve Huo L (2011) isimli araştırmacıların çalışmalarına benzer şekilde MİK belirlemek amacıyla, mikrodilüsyon yöntemini kullanmıştır. Bakteriyel üremenin değerlendirilmesi, Mikropleyt Spektrofotometresi (Uniquely Tecan Freedom EVO[®], Mannedorf, Switzerland) ile 620 nm dalga boyunda Magellan Programı kullanımıyla OD ölçülerek yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak, % 0,2'lik klorheksidin glukonat gargara (Klorhex[®], Drogosan) kullanılmıştır. Birbirinden bağımsız şekilde 3 kez tekrarlanan çalışmaların median değerleri bu çalışmamızın MİK değerleri olarak belirlenmiştir.

Diş biyofilmini yüzlerce bakteri içermesinden dolayı biyofilm yapısında hala araştırılması gereken konular bulunmaktadır. Bu karmaşık yapının anlaşılabilmesi için in vitro koşullarda tek bir bakteri cinsiyle biyofilm oluşturulabildiği gibi birçok bakterinin bir arada bulunduğu biyofilm sistemleri üzerinde de çalışılmaktadır. Biyofilm gelişim aşamalarının doğadaki birçok değişkene rağmen in vitro koşullarda oluşan biyofilmle benzerlik gösterdiği bildirilmektedir (145).

Biyofilm çalışmalarının in vitro koşullarda gerçekleştirilmesi, bu çalışmaların geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. Ancak, in vitro koşullarda hazırlanan biyofilm modelleri, sınırlı sayıda ve türde mikroorganizmanın bulundurmada ve ağız ortamını birebir yansıtamamaktadır (145). Ağız boşluğunu ilgilendiren, tükürük akış hızı, antibakteriyel ajanın diş yüzeyine veya yumuşak dokulara bağlanma yeteneği gibi faktörleri, in vitro çalışmalarda gözlemlemek mümkün olmamaktadır (146).

Antibakteriyel etki gösteren çeşitli uygulamaların diş biyofilmi oluşumuna etkilerinin değerlendirildiği in vitro çalışmalarda, diş minesi yüzeyinin taklit edilmesi amacı ile hidroksiapatit disklerinin kullanıldığı görülmektedir (147, 148, 149). **Chen F ve ark (2010)**, farklı taşıyıcı Pluronic polimerler (Pluronic P 123 ve Pluronic F 127) ile yeni formülasyonlar geliştirdikleri çalışmalarında, bu taşıyıcı sistemler ile uygulanan antibakteriyel bir ajan olduğu bilinen triklosanın, *S. mutans* biyofilmi oluşumuna ve *S. mutans* ile oluşturulan biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla hidroksi apatit diskleri (Clarkson Chromatography Products, Inc. (South Williamsport, PA) kullanmışlardır (149).

Çalışmamızda da geliştirilen formülasyonların *S. mutans* ve *S. sobrinus* biyofilmi oluşumuna etkisinin değerlendirilmesinde seramik kaplı hidroksiapatit diskler (Captal[®], Plasma Biotall Ltd, Tideswell, UK) kullanılmıştır.

5.3. Etken Maddelerin (Lizozim ve Laktoferin'in) Antibakteriyel Etkilerinin Tartışılması

Antibiyotiklere karşı gelişen mikrobiyal direnç, yeni ürünlerin ve yeni yaklaşımların geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Antimikrobiyal peptidlerin, patojen mikroorganizmalarla savaşta ümit verici olduğu bildirilmektedir. Dirençli suşlarda antimikrobiyal peptidlere karşı direnç kazanma diğer antimikrobiyal ajanlara kıyasla daha yavaş ve az sıklıkla görülmektedir. Pozitif yüklü olması ve amfipatik yapı kazanabilme yeteneği peptidlerin, bakteri hücre zarının dış yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfolipidlerle bağlanabilmesini sağlamaktadır (62).

Tenovuo ve ark. (1989), lizozimin antibakteriyel etkisini, muramidaz aktivitesi ile yani peptidoglikan tabakanın parçalanmasını sağlayarak, dış yüzeyine bakteriyel bağlanmayı inhibe ederek, bakteri aggregasyonunu sağlayarak, bakterilerin glikoz alınımını inhibe ederek ve bu sayede asit üretimini engelleyerek ve son olarak *Streptococci* zincirlerini parçalayarak gösterdiğini bildirmişlerdir (5).

Lassiter ve ark. (1987) yaptıkları çalışmalarında laktoferrinin bakteriostatik veya bakterisidal etkisini göstermişlerdir (150). **Nikawa ve ark. ve Soukka ve ark. (1993)** laktoferrinin bakteriostatik etki mekanizmasının demir iyonuna yüksek ilgisine bağlı olarak ortaya çıktığını, ayrıca bakteri hücre duvarına direkt etki ettiğini ve özellikle apolaktoferrinin bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir (151, 152). Yapılan bazı çalışmalarda, demirden bağımsız Apo-LF ve demire bağlı Fe-LF şekline iki farklı formda bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, LF'nin bakteriyel tutunmayı demire bağlanarak sağladığı görülmüş ve Apo-LF'nin bazı bakteri türlerinin üremesini geri dönüşümsüz olarak önlediği bildirilmiştir (153). **Berlutti ve ark. (1989 ve 2004)**, hem Apo-LF'nin hem de Fe-LF'nin *S. mutans*'ların serbest veya LF ile kaplı dental polimere ve hidroksiapatitlere bağlanmasını önlediğini göstermişlerdir (154, 155).

Bir literatür derlemesinde, insan sütünde 1-3 mg/mL, inek sütünde ise 0,1- 0,4 mg/mL bulunan ve ağız yoluyla verilen LF'nin, çeşitli hayvan çalışmaları ve insanlarda yapılan klinik çalışmalarda, bağırsaklardaki yararlı bakterilerin sayısının artmasını, enfeksiyonların iyileşmesini, oral candida enfeksiyonlarının baskılanmasını sağlamak gibi sağlığa yararlı etkileri olduğunun gösterildiği bildirilmiştir (156). **Teraguchi ve ark. (2004)** tarafından da, fareler % 2 LF içeren inek sütüyle beslendiklerinde *S. mutans* 'ların istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılandığı gösterilmiştir (157).

Tenovuo ve ark. (1989), LF'nin antimikrobiyal mekanizmasının, bakteriyi demirden yoksun bırakarak durdurucu bir etki göstermesi, dış yüzeyinde bakteriyel yapışmayı inhibe etmesi ve fagositik hücreleri aktive etmesi ile ortaya çıktığını bildirmişlerdir (5).

Çalışmamızda, daha önce vücudun çeşitli bölgelerindeki mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu gösterilmiş olan lizozim ve laktoferrinin ağız ortamında yerel

olarak uygulanmasını sağlayabilecek çeşitli taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu formülasyonların, ağızda çürük yapıcı olduğu iyi bilinen *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus* üzerindeki etkinliğini değerlendirerek, en etkili taşıyıcı sistem ve formülasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

5.4. Taşıyıcı Sistemlerin Tartışılması

5.4.1. Lipozomal Taşıyıcı Sistemlerin Tartışılması

Lipozomal taşıyıcı sistemler ile hazırlanan ilaçların son yıllarda popülerite kazandığını bilinmektedir (158). *Pol ve ark. ve Childers ve ark. (1996)* yaptıkları çalışmalarında, etken maddelerin fosfolipid yapıdaki lipozom sisteminden yavaşça salıverilmesinin penetrasyon kapasitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir (159, 160).

Termoreversible hidrojeller ile ve başka ilaç taşıyıcı sistemler ile birlikte uygulanan antibiyotik içeren formülasyonların, bakteriyel yapışmayı azaltarak kolonizasyonu ve biyofilm gelişimini önlediği bildirilmiştir (101).

Rudney ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, proteinlerin tek başına hiçbir bakteri grubuna tam olarak yapışmayı sağlayamadığını ve etkisiz hale getirmede gücünün yetmediğini bildirmişler ve bütün proteinlerin birlikte kümülatif bir etki oluşturabileceğini göstermişlerdir (161).

Jones ve ark. (1993) triklosanın lipozomlar ile taşınarak kullanıldığında, ağızdaki *S. sanguinis* ve *S. mutans*'a karşı serbest ilaç olarak kullanıldığından daha etkili olduğunu göstermişlerdir (11). *Kim ve ark. (1999)* ise, çok toksik antibakteriyel bir ajan olan vankomisin katyonik lipozom ile taşındığında *S. aureus*'a etkili olduğunu göstermişlerdir (162).

Aralarında su fazının bulunduğu lipid tabakalarından oluşan küresel ve mikron boyutunda veziküller olan lipozomların içeriğinin, bakteri hücre duvarıyla aynı özelliklere sahip olması nedeniyle bakteri hücrelerine doğal olarak taşındığı bilinmektedir (162, 11, 163). *Jones ve Chapman (1994)*, lipozomal taşıyıcı sistemlerin, hidrofilik ve hidrofobik yapıdaki ilaçların uzun süreli taşınmasında kullanılmasının uygun olduğunu

bildirmişlerdir. Bunun yanısıra, çalışmalarında bu sistemlerin ilacın yan etkilerini azaltarak ilacın etkinliğinin artmasına katkıda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Lipozomların, hidrofilik ve hidrofobik yapıları nedeniyle, ilacın mikroorganizmaların hücre zarına kolaylıkla taşınabilmesi ve bakteri hücre zarıyla aynı özellikte olması etken maddelerin lipozoma ilgisini arttıracığından kontrollü salınımının gerçekleşebileceğini bildirmişlerdir (164).

5.4.2. Poloxamer 407 (jel) Polimer Sistemlerinin Tartışılması

Ağız boşluğunda enfeksiyon, enflamasyon ve kanserin tedavisinde topikal olarak uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasının kolay olması, uygulandığı alanda iyi tutunması, istenmektedir. Uygulama sonrasında bu formulasyonların elastik özellikler göstererek, ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlamaları gerekmektedir (24, 165).

Çeşitli ilaçların kontrollü olarak vücuda verilmesinde ilacın aktivitesinin korunması, organizma tarafından iyi tolere edilmesi, uygulamanın kolay olması gibi nedenlerle taşıyıcı sistem olarak termoreversible özelliğe sahip (ısıyla form değiştiren) Poloxamer 407 polimerinin kullanılması önerilmektedir (166).

Çalışmamızda geliştirilen jel formulasyonlarda da taşıyıcı sistem olarak Poloxamer 407 polimeri kullanılmıştır. Bu polimerin % 10, % 15 ve % 20 a/a konsantrasyonlarda kullanımının tercih edildiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. *Jones ve ark. (2009)* yaptıkları çalışmalarında, vücut sıcaklığında mukoadesiv özellikler gösteren % 20 a/a konsantrasyondaki Poloxamer 407 polimerinin ağız boşluğunda kontrollü olarak ilaç verilmesi için potansiyel olarak uygun olduğunu bildirmişlerdir (167).

Çalışmamızda da Poloxamer 407 polimeri % 20 a/a konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu oranda uygulanan Poloxamer 407 polimeri çalışmamız sırasında, oda sıcaklığında sol, vücut sıcaklığında (37°C'de) jel formuna (termoreversible) dönüşmüştür. % 20 a/a konsantrasyonundaki Poloxamer 407, 37°C'de deformasyona dayanıklı bir haldedir. Yani yüksek elastisiteye sahiptir ve viskoelastik bir özellik göstermesi beklenmektedir.

Nilsen IW ve ark. (1999), soğukla aktive olan lizozim benzeri enzim yapısındaki Chlamysin'in gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, bu enzimin düşük pH'da (4,5-6,2) ve düşük sıcaklıkta (4-35 °C'de) bakterileri inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (168).

Poloxamer 407 polimeri ile hazırlanan jel sistemine Lizozim ve LF entegre edilerek hazırlanan jel formülasyonları çalışmamızda, ağız mukozasının pH'sının 7,4 olmasına karşın, etken maddelerden Lizozimin enzim yapısında olması ve asidik pH'da daha yüksek etki göstermesi nedeniyle pH 5,0'da hazırlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan Lizozim ve LF gibi etken maddelerin protein yapıda olmaları nedeniyle bu maddelerin lipozomal taşıyıcı sistemler tarafından taşınmasının uygun olabileceği ve lipozomal taşıyıcı sistemlerle birleştirilen etken maddelerin Poloxamer 407 polimeri ile entegre edildiği gruplarımızda, ilacın hem ağız boşluğunda daha uzun süre kalabileceği hem de daha kontrollü salınımı ile antibakteriyel etkinliğinin bir miktar daha arttırılabileceği düşünülmüştür.

5.5. Klorheksidin Antibakteriyel Etkisinin Tartışılması

Klorheksidin, ağızdaki biyofilmin kontrolünde etkisi görülen bir altın standart olarak kabul edilmektedir. *Verkaik MJ ve ark. (2011)* yaptıkları biyofilm çalışmalarında antimikrobiyal diş macunlarının ağız mikroorganizmaları üzerine etkisini % 0,2'lik CHX gargara ile karşılaştırmışlar ve kontrol grubu olarak tampon çözeltisi kullanmışlardır (169). CHX, kapsamlı bir şekilde üzerinde çalışılan ve plak oluşumunu, gingivitis önleyen ve antimikrobiyal ajanlar arasında sıklıkla tercih edilen bir preparattır. Antibakteriyel etkisi çok yüksek olan ve bu etkiyi uzun süre devam ettirebilen ikinci jenerasyon bir ağız antiseptiğidir (170). CHX'nin, çok güçlü bir antimikrobiyal ajan olmasının yanında en önemli avantajlarından biri antibakteriyel aktivitesini koruyarak çok farklı yüzeylere bağlanabilme yeteneğidir. Yavaş salınım yaparak etkili konsantrasyonda devam edebilmesi söz konusu olmaktadır. Bu özelliği 'etki süresini uzun süre devam ettirebilme kapasitesi' olarak bilinmektedir. CHX'in, ağız boşluğunda bağlandığı yüzeylerde uzun süre antiseptik etkisi kalabilmekte ve etkili dozlarda yavaş salınım yaparak antimikrobiyal etkisini garanti altına almaktadır (171).

Agar kültürü teknikleriyle yapılan bazı çalışmalarda, CHX'li ağız gargarasıyla çalkalama yapıldıktan hemen sonra görülen antibakteriyel etki ve 7 saat sonra biyofilm üzerine görülen etki değerlendirilmiştir. Hemen sonrasında yapılan değerlendirmelerde % 72-87 oranında başarı görülürken, 7 saat sonrasında % 58-88 başarı görülmüştür (172, 173). Buna karşın, *Cousido ve ark. (2010)* yaptıkları ve farklı konsantrasyonda CHX gargaraların (0,12 ve 0,2) hemen ve 3 ve 7 saat sonrasındaki etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmalarında hemen değerlendirme sonrasında % 90 oranında başarı görülürken, 3 saat sonrasındaki başarının % 20 olduğu, 7 saat sonrasındaki başarının % 14 olduğu görülmüştür (22).

Çalışmalarda çeşitli ajanların antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesinde kontrol grubu olarak altın standart olarak kabul edilen klorheksidin glukonat kullanıldığı görülmektedir (62, 55). Çalışmamızda da geliştirilen ve Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonların MİK değerleri % 0,2'lik klorheksidin glukonat gargara (Klorhex[®], Drogosan) ile karşılaştırılmıştır. *S. mutans* ve *S. sobrinus* biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde ise, kontrol grubu olarak 900 ppm F⁻ içeren % 0,2'lik klorheksidin diglukonat jeli (Cervitec[®] Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) kullanılmıştır.

5.6. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu Deneyinin Bulgularının Tartışılması

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Deneyinin bulguları 5,0 pH'da çözücü olarak kullanılan Sorensen's tampon çözeltisinin (1. Grup), Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözündürülerek oluşturulan 3. Grup'taki formülasyonun, DLD'nin tampon solusyonu içerisinde çözünmesi ile hazırlanan lipozom formülasyonunun (5. Grup) ve Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözündürüldükten sonra, DLD ile karıştırılarak hazırlanan 7. Grup'taki formülasyonun *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı etkili olmadığını göstermiştir.

Yalnız Pluronic F-127[®] marka poloxamer 407 polimerinin kullanıldığı jel formülasyonunun (2. Grup), Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözündürüldükten sonra Pluronic F-127[®] marka poloxamer 407 polimeri ile

birleştirilerek hazırlanan 4. Grup'taki formülasyonun, poloxamer 407 polimeri, tampon solusyonu içerisinde çözündürüldükten sonra DLD ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonun (6. Grup) ve Lizozim ve LF'nin tampon çözeltisi içinde çözündürüldükten ve poloxamer 407 polimeri ile karıştırıldıktan sonra DLD'nin ilave edilmesiyle oluşturulan formülasyonların (8.Grup) da, bakteri suşları üzerinde inhibisyon gösterebilmesi için klorheksidine oranla daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaları gerektiği görülmüştür.

İnhibisyon etkisi gösterdiği belirlenen 2., 4., 6. ve 8. Grup'taki formülasyonların içerisinde bulunan lizozim, LF, poloxamer 407 polimeri ve DLD (lipozom) *S. sobrinus*'a etki gösterebildiği konsantrasyonların da *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına etki edebilen konsantrasyonlara oranla % 50 daha düşük olduğu görülmüştür.

Lizozim, LF gibi tükürük proteinlerinin ve poloxamer 407 polimeri, lipozom gibi taşıyıcı sistemlerin katyonik yapıda olmaları nedeniyle bakterilerin hücre zarındaki por yapılarına veya hücre içine doğru geçiş gösterebilme özellikleriyle bakterilerin parçalanmasına neden oldukları bilinmektedir (174). Yapılan çalışmalarda, LF'nin *S. aureus* ve *C. albicans*'ın sitoplazmik zarından geçerek hücresel içeriklerini parçaladığı bildirilmiştir (175, 176). Çalışmamızın bu sistemleri içeren formülasyonların bakteri suşları üzerine gösterdiği inhibisyon etkisini gösteren bulguları bu çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir.

Huo L ve ark. (2011), tükürük peptidlerinin *S. sanguinis*, *S. gordonii* ve *S. mutans*'a karşı antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri in vitro çalışmalarında, *S. mutans*'ın tükürük peptidlerinin antibakteriyel etkilerinden en çok etkilenen bakteri suşu olduğunu bildirmişlerdir. *S. sanguinis* 'un diğer suşlara oranla 2-4 kat daha yüksek minimal inhibisyon konsantrasyonunda etki olduğunu gözlemlemişlerdir (55).

MİK deneyi sonuçlarına bakıldığında, tüm gruptaki formülasyonların *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerinde etkili oldukları konsantrasyonların, CHX kontrol grubunun konsantrasyon değerinden çok daha yüksek olduğu görülmüştür. CHX'in çok düşük MİK değerlerinde *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarını öldürdüğü belirlenmiştir.

Huo L ve ark. (2011), tükürük peptidlerinin *S. sanguinis*, *S. gordonii* ve *S. mutans*'a karşı antibakteriyel etkilerini CHX kontrol grubuyla karşılaştırdıkları çalışmalarında, tükürük peptidlerinin bakteri suşlarına CHX ile aynı minimal inhibisyon konsantrasyon değerinde etkili olduğunu ve benzer inhibisyon etki gösterdiklerini bildirmiştir (55).

5.7. Biyofilm Deneyi Bulgularının Tartışılması

Çalışmamızın biyofilm deneyi bölümünde, deney gruplarında yer alan sekiz farklı formulasyonun *S. sobrinus* ve *S. mutans* suşları ile hidroksiapatit disk yüzeyleri üzerinde yapay olarak oluşturulan biyofilme etkisi değerlendirilmiştir. Bu deneyin bulguları, deney gruplarından hiçbirinin biyofilm oluşumu üzerinde klorheksidin jeli kadar etkili olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, her iki suş üzerinde de 4. Grup'ta yer alan ve Lizozim ve LF içeren ve Poloxamer 407 polimerinin taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı formulasyonun etkisinin diğer tüm gruplara göre daha yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu grubu da, formulasyona DLD (lipozom) ilave edilen 8. Grup izlemiştir. Tüm gruplara bakıldığında jel formulasyonlarının diğer gruplara göre, biyofilm oluşumu üzerinde daha yüksek etki gösterdiği görülmüştür. Yalnız Sorensen's çözeltisi içeren tampon solusyonu ise, hiçbir işlem uygulanmayan disklerin bulunduğu pozitif kontrol grubuna göre *S. sobrinus* biyofilm oluşumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etki gösterirken, *S. mutans* üzerinde etkili olmadığı izlenmiştir.

Anyonik ve katyonik lipozomların *S.oralis* biyofilmleri üzerinde etkili olduğu daha önce gösterilmiştir (177). Çalışmamızda bu nedenle katyonik bir fosfolipid olan DOTAP kullanılmıştır. Hem yalnız başına olan lipozom, hem de etken madde ile birlikte lipozom uygulandığında etkinliğin bir miktar daha arttığı yani lipozomun etkinliğe bir miktar katkısının olduğu gözlemlenmiştir.

Poloxamer 407 polimeri ile hazırlanan 8. Grup ve DLD eklenerek hazırlanan 7. Grup arasındaki farklılığa bakıldığında, 8. Grup'ta oluşturulan formulasyonda *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmlerinde canlı bakteri sayılarının daha az olması, poloxamerin biyofilm oluşumu üzerine olan etkiyi arttırdığını göstermektedir.

Bu deneyin bulguları deney ve kontrol gruplarının 24 saatlik biyofilm üzerindeki etkilerini göstermektedir. Çalışmamız, 48 saat, 72 saatlerde de etkinliğinin değerlendirildiği (daha uzun süre olmamak kaydıyla) kinetik çalışma olarak devam ettirilseydi, etken maddenin daha fazla salınabilmesi mümkün olacağı için, jellerin inhibisyon etkisinin artabileceği düşünülmektedir. Etken maddelerin ve taşıyıcı sistem olan Poloxamer 407 polimerin suda çözünen hidrofilik yapıları olması ve etken maddenin taşıyıcı sisteme olan yüksek ilgisi nedeniyle etken maddenin yavaşça ve kontrollü bir şekilde salınımının gerçekleştiği bilinmektedir (178). Etken madde ve taşıyıcı sistemin rekonstitüye (yeniden yapılandırılarak) olarak hazırlanmasının da ilacın etkisini arttıracakı düşünülmektedir.

Baffone W ve ark. (2011), % 0, 2'lik CHX ve Meridol, Buccagel, Listerine, Curasept gibi 4 farklı ağız gargarasının, oluşan bakteriyel biyofilm üzerinde etkileri karşılaştırmışlardır. Titanyum kaplı diskler üzerlerine *S. mutans*, *S. aerous* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri süspansiyonu uygulandıktan sonra farklı zamanlarda (16,5, 40,5, 64,5 saat) inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda, Curasept, Listerine ve Meridol'un inhibisyon aktivite değerlerinin süreyle ters orantılı olarak değiştiği görülmüştür. CHX'in inhibisyon aktivite değerlerinin ise zamana bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (84). **Stewart ve ark. (2003)** ise, CHX'in 5 dakikada biyofilmin daha derin tabakalarına difüze olabilmeleri nedeniyle streptokokların oluşturduğu biyofilmde etkilerinin sınırlı olduğunu bildirmişlerdir (179). Etken maddenin zaman içerisinde (kinetik profil) kontrollü salınması ayrı bir çalışma olarak düşünülmelidir.

Veyries ve ark. poloxamer 407 bazlı formülasyonların vankomisin kontrolle salınmasına uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, aynı zamanda poloxamer 407'nin antiadeziv aktivitesi de gösterilmiştir. Bu da, bakteriyel adezyonu sınırlandırabileceği sonucunu doğurmuştur ve araştırmacılar poloxamerin kemik enfeksiyonu tedavisi veya önlenmesinde ve protez uygulamalarında kullanılabileceğini savunmuşlardır (166).

Arslan ve ark. (2009) LF içeren yapay tükürüğün uygulandığı cam disklerde biyofilm oluşumuna etkisini değerlendirdikleri çalışmada, özellikle *S. gordonii*'nin bağlanmasını önlediğini bildirmişlerdir. Apo-LF varlığında, *S. mutans* ve *S.*

gordonii'nin başlangıçtaki tutunmasının engellendiğini göstermişlerdir (153). Çalışmamızda da bu sonuçlarla uyumlu olarak, lizozim ve laktoferrin içeren jel formülasyonları hidroksiapatit diskleri üzerinde *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmi oluşmasını engellemiş ve sayılan canlı bakteri miktarının düşük olduğu gözlemlenmiştir.

İlgili çalışmalar incelendiğinde, klorheksidin glukonatın diş biyofilmi üzerine etkili olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, bu etki biyofilmdeki tüm mikroorganizmaları aynı anda öldürmek biçiminde ortaya çıkmamaktadır. Titanyum diskler üzerinde önceden oluşturulmuş ve çeşitli suşlardan oluşan biyofilmler üzerinde çeşitli antimikrobiyal ajanların etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, % 0,02'lik klorheksidin glukonatın *S. mutans* biyofilmi üzerinde % 55,36 oranında inhibisyon aktivitesi gösterdiği, bunun yanında *S. aureus* üzerindeki etkisinin ise % 100 olduğu bildirilmiştir. *S. mutans* biyofilmi üzerinde CHX'in inhibisyon aktivitesinin zaman geçtikçe arttığı da görülmüştür (84). Çalışmamızda kullanılan % 0,2'lik klorheksidin diglukonat jeli hem *S. mutans* hem de *S. sobrinus* biyofilm oluşumlarını % 100 önlemiştir.

Çalışmaların bulguları arasındaki bu farkın çalışmaların yöntemlerindeki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir. Çalışmamızda etkinliği değerlendirilen formülasyonlar veya CHX otoklavda steril edilen hidroksiapatit diskler üzerine sürüldükten sonra, üzerine mikroorganizma suşları ve besiyeri eklenmiş; oluşan biyofilmdeki canlı bakteri miktarları sayılmıştır. Bu bulguların ışığında, CHX'in *S. mutans* biyofilminin oluşmasını önlemede, oluşmuş biyofilmi temizlemeye göre daha başarılı olduğu ileri sürülebilir. Çalışmamızda etken madde olarak çeşitli taşıyıcı sistemler ile birlikte kullanılan ve antibakteriyel etkinliği değerlendirilen Lizozim ve Laktoferrin tükürükte bulunan glikoproteinler olduğundan, aynı ağızdaki biyofilm oluşumunda olduğu gibi biyofilm oluşturulmadan önce disk yüzeylerine yerleştirilmiş ve daha sonraki biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir.

Diş hekimliği literatürü incelendiğinde, etken madde olarak lizozim ve laktoferrin içeren ve Poloxamer 407 polimerinin veya DOTAP'ın taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı bir ürünle ilgili yayımlanmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle

çalışmamız, bu yeni formülasyonların geliştirildiği ve ağızdaki biyofilmde bulunan mikroorganizmalar üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği özgün bir çalışmadır. Bununla birlikte, bulgularının karşılaştırılabileceği çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar da genellikle lizozim, laktoferrin (LF) veya laktoperoksidaz (LPO) sistemi içeren ticari ürünlerin etkisinin değerlendirildiği çalışmalardır.

Lizozim, LF ve LPO'yu içeren Bioextra® diş macununun ve tükürüğün antibakteriyel sistemlerinden LPO, SCN⁻ iyonunu ve hidrojenperoksidazı içeren ve piyasada Biotene® ticari adıyla bilinen bir diş macununun karyojenik mikroorganizmalar üzerine antibakteriyel etkilerinin değerlendirildiği in vivo çalışmalarda, tükürük antimikrobiyal proteinlerini ve sistemlerini içeren diş macunlarının bu bileşenleri içermeyen kontrol gruplarına oranla bir miktar daha fazla antimikrobiyal etki gösterdikleri bildirilmiştir (180, 18, 96). Bununla birlikte, içerisinde LPO sisteminin bulunduğu Zendium Saliva® marka diş macununun antibakteriyel etkisinin değerlendirildiği in vivo çalışmalarda, bu diş macunlarının ağız hastalıklarının önlenmesinde etkili olmadığı, diş çürüğü oluşumunu önleyemediği ve *S. mutans*'a karşı antibakteriyel bir etki göstermediği görülmüştür (181, 12).

Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında hazırlanan bütün formülasyonların *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşlarına karşı farklı oranlarda antibakteriyel etki gösterdiği görülmektedir. Lizozim, Laktoferrin ve Pluronic® F127 (Poloxamer) içeren formülasyonların antibakteriyel etkilerinin diğer formülasyonlara oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, formülasyonların uzun dönem kullanımının değerlendirilmesi açısından sitotoksisite çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

- 1) Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) deneyi bulgularına göre *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerine % 0,2'lik klorheksidin glukonat gargaranın (Klorhex®, Drogosan) çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu görülmüştür.
- 2) Poloxamer 407 polimeri ile hazırlanan tüm formulasyonlar, Lizozim ve Laktoferrin içeriğinden bağımsız olarak *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerine inhibisyon göstermiş ve *S. sobrinus* üzerine diğer suşlara göre daha düşük konsantrasyonda (% 50) da etki ettiği belirlenmiştir.
- 3) DLD (lipozom) yalnızca Poloxamer 407 polimeri ile birleştiğinde bakteri suşları üzerinde inhibisyon göstermiş, tek başına veya Lizozim ve Laktoferrin ile birlikte kullanıldığında inhibisyon görülmemiştir.
- 4) Sorensen's Çözeltilisi ile hazırlanan tampon solusyonu, Lizozim ve Laktoferrin içeren tampon solusyonu da bakteri suşları üzerinde etkili olmamıştır.
- 5) Biyofilm deneyinin bulgularına göre, % 0,2'lik klorheksidin diglukonat içeren jel (Cervitec® Gel, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmlerinin oluşumunu tam olarak önlemiş ve diğer deney gruplarına ve pozitif kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p= 0, 0001).
- 6) MİK deneyinde olduğu gibi, biyofilm deneyinde de Poloxamer 407 polimeri ile hazırlanan jel formulasyonları *S. sobrinus* ve *S. mutans* biyofilmlerinin oluşumunu önlemede diğer deney gruplarına göre üstün bulunmuşlardır. Bu gruplar arasında en yüksek etkiyi her iki suş üzerinde de Lizozim, Laktoferrin içeren ve taşıyıcı sistem olarak Poloxamer 407 polimerinin kullanıldığı 4. Grup göstermiştir (p<0,05).

- 7) *S. sobrinus* biyofilmi oluşumu üzerinde diğer tüm deney grupları farklı düzeylerde inhibisyon aktivitesi göstermiş ve hiçbir işlem yapılmayan pozitif kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).
- 8) *S. mutans* biyofilmi oluşumu üzerinde ise Sorensen's Çözeltisi ile hazırlanan tampon solusyonunun herhangi bir etkisi olmamıştır.
- 9) Çalışmamızda hazırlamış olduğumuz Lizozim ve Laktoferrin içeren formülasyonların, ağızdaki plakta bulunan ve çürük oluşumunda etkili olduğu bilinen *S. sobrinus*, *S. mutans* ve *L. acidophilus* suşları üzerinde etkinliği, piyasada preparatı mevcut olan klorheksidin jeli ile karşılaştırıldığında klorheksidinden daha üstün olmamakla birlikte, klorheksidinden daha güvenilir olması, diş hekimliğinde antimikrobiyal/antiplak ajan olarak klinikte etkin olarak kullanılabilmesi ve yeni bir formülasyon olarak ilaç piyasasında yer alabileceği düşünülmüştür. Bunun için sitotoksikite ve hayvan deneyleri yapılması gerekmektedir.
- 10) Çalışmamızdaki formülasyonlarımızda yer alan maddelerin daha uzun süreli etki göstereceği düşünülerek, ileriki çalışmalarda bu maddelerin stabilitesi ve etkinliğinin kinetik olarak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Kulekci G, Gokbuget A. The Effect of Oral Microbiota on General Health. *J Ankem*, 23(3): 137-145, 2009.
2. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, Ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*, 87: 1016-20, 2008.
3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43: 5721-32, 2005.
4. Sweeney LC, Dave J, Chambers PA, Heritage J. Antibiotic resistance in general dental practice--a cause for concern? *J Antimicrob Chemother*, 53: 567-76, 2004.
5. Tenovuo J. Nonimmunoglobulins defense factors in human saliva. In: Tenovuo J (ed). *Human saliva. clinical chemistry and microbiology*. CRC, Boca Raton, Florida, pp 55-91, 1989.
6. Nieuw Amerongen AV, Veerman EC. Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis*, 8(1): 12-22, 2002.
7. Charman WN, Chan HK, Finnin BC and Charman SA. Drug Delivery: A Key Factor in Realising the Full Therapeutic Potential of Drugs. *Drug Development Research*, 46: 316-27, 1999.
8. Nguyen S, Solheim L, Bye R, Rykke M, Hiorth M, Smistad G. The influence of liposomal formulation factors on the interactions between liposomes and hydroxyapatite. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Mar;76(1): 354-61, 2010.
9. Kopecek J. Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 20: 1-16, 2003.
10. Jones MN, Kaszuba M, Reboiras MD, Lyle IG, Hill KJ, Song YH, Wilmot SW, Creeth JE. The targeting of phospholipid liposomes to bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 1196(1): 57-64, 1994.
11. Jones MN, Francis SE, Hutchinson FJ, Handley PS, Lyle IG. Targeting and delivery of bactericide to adsorbed oral bacteria by use of proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1147(2): 251-61, 1993.

12. Moran J, Addy M. The effect of surface adsorption and staining reactions on the antimicrobial properties of some cationic antiseptic mouthwashes. *J Periodontol*, 55: 278-82, 1984.
13. Petersen FC, Scheie AA. Chemical plaque control: a comparison of oral health care products in Oral biofilms and plaque control. In: Busscher HJ, Evans LV (eds). Harwood Academic Press, pp 277-294, 1998.
14. Pienihäkkinen K, Söderling E, Ostela I, Leskelä I, Tenovuo J. Comparison of the efficacy of 40% chlorhexidine varnish and 1% chlorhexidine-fluoride gel in decreasing the level of salivary mutans streptococci. *Caries Res*, 29(1): 62-7, 1995.
15. Tamaki Y, Nomura Y, Takeuchi H, Ida H, Arakawa H, Tsurumoto A, Kumagai T, Hanada N. Study of the clinical usefulness of a dental drug system for selective reduction of mutans streptococci using a case series. *J Oral Sci*, 48(3): 111-6, 2006.
16. Rosin M, Kocher T, Kramer A. Effects of SCN-/H₂O₂ combinations in dentifrices on plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, 28(3): 270-6, 2001.
17. Kirstilä V, Lenander-Lumikari M, Söderling E, Tenovuo J. Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia. *Acta Odontol Scand*, 54(6): 391-7, 1996.
18. Jyoti S, Shashikiran ND, Reddy VV. Effect of lactoperoxidase system containing toothpaste on cariogenic bacteria in children with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent*, 33(4): 299-303, 2009.
19. Krishna Kumar R. Comparison of levels of mutans streptococci and lactobacilli in children with nursing caries. *Ind Soc Pedo Prev Dent*, 20: 1-5, 2002.
20. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis*. Jan;8(1): 23-9, 2002.

21. Levy SM, Maurice TJ, Jakobsen JR. Feeding patterns, water sources and fluoride exposures of infants and 1-year-olds. *J Am Dent Assoc.* Apr;124(4): 65-9, 1993.
22. Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig*, 14(4): 397-402, 2010.
23. Nguyen S, Hiorth M, Rykke M, Smistad G. The potential of liposomes as dental drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* Jan;77(1): 75-83, 2011.
24. Jones DS, Woolfson AD, Brown AF, Coulter WA, McClelland C, Irwin CR. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J Control Release.* Jul;67(2-3): 357-68, 2000.
25. Saliva: its role in health and disease. Working Group 10 of the Commission on Oral Health, Research and Epidemiology (CORE). *Int Dent J.* Aug;42(4 Supply 2): 287-304, 1992.
26. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res*, 66: 623-27, 1987.
27. Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG. Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res*, 74: 1826-32, 1995.
28. Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of unstimulated whole human saliva. *Clin Chem Lab Med*, 38: 335-43, 2000.
29. Drobitch RK, Svensson CK. Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clin Pharmacokinet*, 23: 365-379, 1992.
30. Haeckel R, Hanecke P. The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. *Ann Biol Clin*, 51: 903-10, 1993.
31. Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. *Ann N Y Acad Sci*, 694: 36-47, 1993.
32. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* May;17(4): 345-54, 2011.

33. Tenovuo J. Antimicrobial function of human saliva--how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand*, 56(5): 250-6, 1998.
34. Hershkovich O, Nagler RM. Biochemical analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and/or gustatory disturbances. *Arch Oral Biol*, 49(7): 515-22, 2004.
35. Nieuw Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*. May-Jun;38(3): 247-53, 2004.
36. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. Apr;172(8): 305-12, 1992.
37. Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*, 57: 547-64, 1995.
38. Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. *Cell Tissue Res*, 343(2): 263-87, 2011.
39. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J*. Aug;169(3-4): 96-8, 1990.
40. Lenander-Lumikari M, Laurikainen K, Kuusisto P, Vilja P. Stimulated salivary flow rate and composition in asthmatic and non-asthmatic adults. *Arch Oral Biol*. Feb;43(2): 151-6, 1998.
41. Marsh P, Martin M. *Oral microbiology*. (3rd ed.) Chapman and Hall, London, pp 227-37, 1992.
42. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent*, 28(1): 47-52, 2003.
43. Mundorff SA, Eisenberg AD, Leverett DH, Espeland MA, Proskin HM. Correlations between numbers of microflora in plaque and saliva. *Caries Res*, 24(5): 312-7, 1990.
44. Fox PC. Salivary enhancement therapies. *Caries Res*. May-Jun;38(3): 241-6, 2004.
45. Hoek GH, Brand HS, Veerman EC, Amerongen AV. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. *Eur J Oral Sci*. Dec;110(6): 480-1, 2002.
46. Hardie JM. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *Br Dent J*. Apr 11;172(7): 271-8, 1992.

47. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res.* Mar;73(3): 672-81, 1994.
48. Larmas M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int Dent J.* Aug;42(4): 199-208, 1992.
49. Newman GM, Nisengard R. *Oral microbiology and immunology.* (2nd ed.) WB Saunders, Philadelphia, 1988.
50. Ebersole JL, Cappelli D, Steffen MJ. Characteristics and utilization of antibody measurements in clinical studies of periodontal disease. *J Periodontol,* 63(12): 1110-6, 1992.
51. Fleming A. On remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. Series B,* 93: 306, 1922.
52. Murray PR, Cantrell HF, Lankford RB. Multicenter evaluation of the in vitro activity of piperacillin-tazobactam compared with eleven selected beta-lactam antibiotics and ciprofloxacin against more than 42,000 aerobic gram-positive and gram-negative bacteria. *In Vitro Susceptibility Surveillance Group. Diagn Microbiol Infect Dis,* 19(2):111-20, 1994.
53. Castagnola M, Inzitari R, Fanali C, Iavarone F, Vitali A, Desiderio C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Cabras T, Manconi B, Sanna MT, Boi R, Pisano E, Olianas A, Pellegrini M, Nemolato S, Heizmann CW, Faa G, Messina I. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Mol Cell Proteomics.* Jan;10(1): M110.003467, 2011.
54. Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M. Lactoferrin: a review. *Vet Med,* 9(53): 457-68, 2008.
55. Huo L, Zhang K, Ling J, Peng Z, Huang X, Liu H, Gu L. Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* Sep;56(9): 869-76, 2011.
56. Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res.* Jul;19(1): 12-9, 1999.

57. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6(2): 161-75, 1995.
58. Shugars DC, Wahl SM. The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc*. Jul;129(7): 851-8, 1998.
59. Nauntofte B, Tenovuo JO, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O, Kidd E (1st ed.). *Dental Caries. The Disease and its Clinical Management*. Blackwell Munksgaard, Oxford, UK, pp 7-27, 2003.
60. Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Molec Biol*, 27: 57-92, 1992.
61. Tabak LA. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1: 229- 234, 1990.
62. Altman H, Steinberg D, Porat Y, Mor A, Fridman D, Friedman M, Bachrach G. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *J Antimicrob Chemother*. Jul;58(1): 198-201, 2006.
63. Rudney JD, Ji Z, Larson CJ. Saliva protein binding to streptococcal layers placed at different oral sites in 48 persons. *J Dent Res*. Oct;75(10):1789-97, 1996.
64. Tenovuo J, Jentsch H, Soukka T, Karhuvaara L. Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. *J Biol Buccale*. Jun;20(2): 85-90, 1992.
65. Rudney JD. Antimicrobial proteins in human unstimulated whole saliva in relation to each other, and to measures of health status, dental plaque accumulation and composition. *Arch Oral Biol*, 36(7): 497-506, 1991.
66. Gråhn E, Tenovuo J, Lehtonen OP, Eerola E, Vilja P. Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. *Acta Odontol Scand*. Apr;46(2): 67-74, 1988.
67. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. Nov;188(2): 319-33, 2010.

68. Yoshihata A, Sakuma S, Kobayashi S, Miyazaki H. Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva. *Paediatr Dent*, 23: 113-17, 2001.
69. 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*, 9(2): 192-6, 1954.
70. Paulson DS. Chlorhexidine gluconate. In: Paulson DS (ed). *Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp 117-22, 2003.
71. Block SS. *Disinfection, sterilisation and preservation*. (4th ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp 274, 1991.
72. Denton GW. Chlorhexidine. In: SS Block. *Disinfection, sterilization and preservation*. (4th ed.) Lea and Febiger, Philadelphia, pp 274 – 89, 1991.
73. Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsumoto I, Arita M, Yoshihara N, Yanagi K, Yamada A, Morita O, Yoshida Y, Furuya Y, Chiba S. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. *Dermatology* 195 (Suppl): 29-35, 1997.
74. Fiorellini JP, Paquette DW. The potential role of controlled-release delivery systems for chemotherapeutic agents in periodontics. *Curr Opin Dent*, 2: 63-79, 1992.
75. Goffin G. Efficacy of a sustained local delivery of chlorhexidine Periochip as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontal disease. *Int Dent Rev*, 1-18, 1998.
76. Bonesvoll P, Lökken P, Rölla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol*. Mar;19(3): 209-12, 1974.
77. Swai HS, Patel MP, Braden M. Release of chlorhexidine from methacrylate polymers. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater*, 24: 1025-26, 1997.

78. Addy M, Renton-Harper P. Local and systemic chemotherapy in the management of periodontal disease: an opinion and review of the concept. *J Oral Rehabil*, 23(4): 219-31, 1996.
79. Steinberg D, Friedman M. Dental drug-delivery devices: local and sustained release applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 16: 425–59, 1999.
80. Stabholz A, Sela MN, Friedman M, Golomb G, Soskolne A. Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. Sep;13(8): 783-8, 1986.
81. Lambert PA. Mechanism of action of biocides. In: Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY (eds). *Principles and practices of disinfection, preservation and sterilization*. (4th ed.) Blackwell publishing, 2004.
82. Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res* 23 (Suppl): 39-48, 2009.
83. Oyanagi T, Tagami J, Matin K. Potentials of mouthwashes in disinfecting cariogenic bacteria and biofilms leading to inhibition of caries. *Open Dent J*, 6: 23-30, 2012.
84. Baffone W, Sorgente G, Campana R, Patrone V, Sisti D, Falcioni T. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Curr Microbiol*. Feb;62(2): 445-51, 2011.
85. Corbin A, Pitts B, Parker A, Stewart PS. Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7): 3338-44, 2011.
86. de Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J*, 19(1): 28-33, 2008.
87. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. Nov;78(11): 2127-34, 2007.

88. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Nov;96(5): 618-24, 2003.
89. Twetman S, Petersson LG. Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res*, 32(2): 113-8, 1998.
90. Grönroos L, Mättö J, Saarela M, Luoma AR, Luoma H, Jousimies-Somer H, Pyhälä L, Asikainen S, Alaluusua S. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(4): 894-8, 1995.
91. Lundström F, Krasse B. Streptococcus mutans and lactobacilli frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. *Eur J Orthod*, 9(2): 109-16, 1987.
92. Schwach-Abdellaoui K, Vivien-Castioni N, Gurny R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm.* Jul;50(1): 83-99, 2000.
93. Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, de Blicq-Hogervorst JM, Brouwer CP, Amerongen AV, Wuisman PI. Histatin and lactoferrin derived peptides: antimicrobial properties and effects on mammalian cells. *Peptides*, 26(12): 2355-9, 2005.
94. Lupetti A, van Dissel JT, Brouwer CP, Nibbering PH. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Nov;27(11): 1125-9, 2008.
95. Gil-Montaya JA, Guardia-Lopez I, Gonzalez-Moles MA. Evaluation of the clinical efficacy of a mouthwash and oral gel containing the antimicrobial proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in elderly patients with dry mouth- pilot study. *Gerodontology.* Mar;25(1): 3-9, 2008.

96. 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.* Nov;5(4): 218-24, 2007.
97. Mulligan R, Navazesh M, Slots J. Antibacterial activity of an alcohol-free mouthwash with enzymes. *J Dent Res,* 71: 156, 1992.
98. Kielbassa AM, Shohadai SP, Schulte-Mönting J. Effect of saliva substitutes on mineral content of demineralised and sound dental enamel. *Support Care Cancer,* 9: 40-7, 2000.
99. George D, Bhat SS, Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes: an in vitro study. *Gen Dent.* May-Jun;57(3): 238-41, 2009.
100. van Wachem PB, van Luyn MJ, Nieuwenhuis P, Koerten HK, Olde Damink L, TenöHoopen H, Feijen J. In vivo degradation of processed dermal sheep collagen evaluated with transmission electron microscopy. *Biomaterials.* 1991;12(2): 215-23.
101. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev.* Jul 29;57(10): 1539-50, 2005.
102. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol,* 26(11): 1261-8, 2008.
103. Burkman RT. Transdermal hormonal contraception: benefits and risks. *Am J Obstet Gynecol.* Aug;197(2): 134.e1-6, 2007.
104. Galer BS, Rowbotham MC, Perander J, Friedman E. Topical lidocaine patch relieves postherpetic neuralgia more effectively than a vehicle topical patch: results of an enriched enrollment study. *Pain.* Apr;80(3): 533-8, 1999.
105. Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol.* Dec;67(6): 713-7, 1976.

106. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci.* Jan-Apr;1(1): 15-30, 1998.
107. Madhav NVS, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. *J Control Release.* Nov 16;140(1): 2-11, 2009.
108. Bernstein G. Delivery of insulin to the buccal mucosa utilizing the RapidMist system. *Expert Opin Drug Deliv.* Sep;5(9): 1047-55, 2008.
109. Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* Nov-Dec;33(6): 710-6, 2008.
110. Peppas NA, Sahlin JJ. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials.* Aug;17(16): 1553-61, 1996.
111. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res,* 23(12): 2709-28, 2006.
112. Esposito E, Carotta V, Scabbia A, Trombelli L, D'Antona P, Menegatti E, Nastruzzi C. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: Poloxamer- and monoglyceride-based formulations. *Int J Pharm,* 142(1): 9–23, 1996.
113. Liu T, Chu B. Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *J Apply Cryst,* 33: 727-30, 2000.
114. Erjavec V, Pavlica Z, Sentjurc M, Petelin M. In vivo study of liposomes as drug carriers to oral mucosa using EPR oximetry. *Int J Pharm.* Jan;307(1): 1-8, 2006.
115. de la Fuente M, Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. *Nanomedicine.* Dec;3(6): 845-57, 2008.
116. Zhang H, Zhang J, Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet,* 41(9): 661-80, 2002.

117. Bangham AD. Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids*, 64(1-3): 275-85 1993.
118. Gregoriadis G. Liposomes as a drug delivery system: optimization studies. *Adv Exp M Fed Biol*, 238: 151-9, 1988.
119. Lautenschlager H. Liposomes in Dermatological Preparations: Part I. *Cosmet and Toilet*, 105: 89-96, 1990.
120. Hayward JA. Potential of Liposomes in Cosmetic Science. *Cosmet and Toilet*, 105: 47-54, 1990.
121. Weissmann G, Cohen C, Hoffstein S. Introduction of enzymes, by means of liposomes, into non-phagocytic human cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*. Jul 21;498(1): 375-85, 1977.
122. Li L, Margolis LB, Lishko VK, Hoffman RM. Product-delivering liposomes specifically target hair follicles in histocultured intact skin. *In Vitro Cell Dev Biol*. Nov-Dec;28(11-12): 679-81, 1992.
123. da Silva Malheiros P, Daroit DJ, Brandelli A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*. 21: 284-92, 2010.
124. <http://www.phospholipid.jp>
125. Mezei M, Gulasekharan V. Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci*. May;26(18):1 473-7, 1980.
126. Steinberg D, Friedman M, Soskolne A, Sela MN. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: in vitro release study. *J Periodontol*. Jul;61(7): 393-8, 1990.
127. Axelsson P. Current role of pharmaceuticals in prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J*, 43: 473-82, 1993.
128. Addy M. Local delivery of antimicrobial agents to the oral cavity. *Adv Drug Deliv Rev*, 13: 123-134, 1994.

129. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 110(6): 800-4, 2010.
130. Jaafari MR, Bavarsad N, Bazzaz BS, Samiei A, Soroush D, Ghorbani S, Heravi MM, Khamesipour A. Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrobial Agents Chemother*, 53(6): 2259-65, 2009.
131. Martínez-Gomis J, Fernández-Solanas A, Viñas M, González P, Planas ME, Sánchez S. Effects of topical application of free and liposome-encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries in rats. *Arch Oral Biol*. Nov;44(11): 901-6, 1999.
132. Harsanyi BB, Hilchie JC, Mezei M. Liposomes as drug carriers for oral ulcers. *J Dent Res*. Sep;65(9): 1133-41, 1986.
133. Shaw JH. Etiology of dental caries: Prevention and control. In: Stallard RE (ed). *A Textbook of Preventive Dentistry*. (2nd ed.) WB Saunders, Philadelphia, pp 32-49, 1982.
134. Kreulen CM, de Soet HJ, Hogeveen R, Veerkamp JS. *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child*, 64(2): 107-11, 1997.
135. Petersson LG, Maki Y, Twetman S, Edwardsan S. Mutans streptococci in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren. *Oral Microbiol Immunol*, 6: 284-87, 1991.
136. De Soet JJ, Van Loveren C, Lammens AJ, Pavicic MJAMP, Homburg CHE, Ten Cate JM and de Graff J. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 25: 116-22, 1991.
137. Van Houte J, Green DB. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. *Infect Immun*. Apr;9(4): 624-30, 1974.

138. Sigurjons H, Magnúsdóttir MO, Holbrook WP. Cariogenic bacteria in a longitudinal study of approximal caries. *Caries Res*, 29(1): 42-45, 1995.
139. Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res*, 32(1):51-8, 1998.
140. Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, Harris R, Lo EC, Naidoo S, Ramos-Gomez F, Soo TC, Burnside G, Pine CM. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health* 21(Suppl): 96-101, 2004.
141. Filoche SK, Anderson SA, Sissons CH. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. Oct;19(5): 322-6, 2004.
142. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*, 38(3): 204-11, 2004.
143. Newman HN, Wilson M. Dental Plaque Revisited. In: Newman HN, Wilson M (eds). *Oral Biofilms in Health and Disease*. Cardiff, BioLine, 1999.
144. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 52(2): 145-8, 2003.
145. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol*, 32(2): 147-52, 2005.
146. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol*, 56(5): 681-7, 2007.

147. Guan YH, Lath DL, Graaf T, Lilley TH, Brook AH. Moderation of oral bacterial adhesion on saliva-coated hydroxyapatite by polyaspartate. *J Appl Microbiol*, 94(3): 456-61, 2003.
148. Ledder RG, Sreenivasan PK, DeVizio W, McBain AJ. Evaluation of the specificity and effectiveness of selected oral hygiene actives in salivary biofilm microcosms. *J Med Microbiol*. Dec;59(12): 1462-8, 2010.
149. Chen F, Rice KC, Liu XM, Reinhardt RA, Bayles KW, Wang D. Triclosan-loaded tooth-binding micelles for prevention and treatment of dental biofilm. *Pharm Res*. Nov;27(11): 2356-64, 2010.
150. Lassiter MO, Newsome AL, Sams LD, Arnold RR. Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 66(2): 480-5, 1987.
151. Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol*, 38(12): 1057-63, 1993.
152. Soukka T, Tenovuo J, Rundegren J. Agglutination of *Streptococcus mutans* serotype C cells but inhibition of *Porphyromonas gingivalis* autoaggregation by human lactoferrin. *Arch Oral Biol*, 38(3): 227-32 1993.
153. Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol*. Oct;24(5): 411-6, 2009.
154. Visca P, Berlutti F, Vittorioso P, Dalmastri C, Thaller MC, Valenti P. Growth and adsorption of *Streptococcus mutans* 6715-13 to hydroxyapatite in the presence of lactoferrin. *Med Microbiol Immunol*, 178(2): 69-79, 1989.
155. Berlutti F, Ajello M, Bosso P. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*, 17: 271-78, 2004.
156. Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J*, 16: 1241-51, 2006.

157. Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K, Tamura Y. Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals*, 17(3): 231-4, 2004.
158. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol*, 13(12): 527-37, 1995.
159. Pol O, Planas E, Puig MM. Effects of morphine and liposomal morphine in i model of intestinal inflammation in mice. *Pharmacology*. Sep;53(3): 180-9, 1996.
160. Childers NK, Zhang SS, Harokopakis E, Harmon CC, Michalek SM. Properties of practical oral liposome-Streptococcus mutans glucosyltransferase vaccines for effective induction of caries protection. *Oral Microbiol Immunol*, 11(3): 172-80, 1996.
161. 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*, 78(3): 759-68, 1999.
162. Kim HJ, Michael Gias EL, Jones MN. The adsorption of cationic liposomes to Staphylococcus aureus biofilms. *Colloids Surf. A: Physicochem Eng Aspects*, 149: 561-70, 1999.
163. Jones MN, Song YH, Kaszuba M, Reboiras MD. The interaction of phospholipid liposomes with bacteria and their use in the delivery of bactericides. *J Drug Target*, 5(1): 25-34, 1997.
164. Jones MN, Chapman D. *Micelles, Monolayers and Biomembranes*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp 117, 1994.
165. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. Nov 3;57(11):1556-68, 2005.
166. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, Faurisson F, Rouveix B. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int J Pharm*. Dec;192(2): 183-93, 1999.

167. Jones DS, Bruschi ML, de Freitas O, Gremião MP, Lara EH, Andrews GP. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *Int J Pharm.* May;372(1-2): 49-58, 2009.
168. Nilsen IW, Overbo K, Sandsdalen E, Sandaker E, Sletten K, Myrnes B. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Lett.* Dec;464(3): 153-8, 1999.
169. Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent*, 39(3): 218-24, 2011.
170. Ruppert M, Schlagenhauf U. La chlorhexidina en Odontologia. Aspectos generales. *Quintessence*, 18: 12-23, 2005.
171. Manau-Navarro C, Guasch –Serra S. Metodos de control de placa bacteriana. In: Cuenca E, Manau C, Serra LL (eds). *Odontologia Preventiva y Comunitaria. Principios Metodos y Aplicaciones*, Masson, Barcelona, pp 69-88, 2003.
172. Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P, Wilson R, Challacombe SJ, Kemp GK, Wade WG. The clinical and microbiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis*, 7(5): 276-80, 2001.
173. Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (II) Salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol*, 17(10): 698-701, 1990.
174. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* Mar;3(3): 238-50, 2005.
175. Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, van Berkel LA, van Berkel PH, Pauwels EK, Nuijens JH. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun.* Mar;69(3): 1469-76, 2001.

176. Lupetti A, Annema AEKJPP, Welling MM, Senesi S, Dissel JTV, Nibbering PH. Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 3257–63, 2000.
177. Catuogno C, Jones MN. The antibacterial properties of solid supported liposomes on *Streptococcus oralis* biofilms. *Int J Pharm*. May;257(1-2): 125-40, 2003.
178. Shrewsbury RP. *A practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice*. School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill-NC, 2005.
179. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol*. Mar;185(5): 1485-91, 2003.
180. 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*, 52(6): 346-53, 1994.
181. Koch G, Edlund K, Hoogendoorn H. Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries. *Odont Revy*, 24: 367-72, 1973.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kübra Tonguç 15.05.1983 yılında İzmir’de doğmuştur. İlköğrenimini Onüç Eylül İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini ise Linyit Lisesi’nin Süper Lise Bölümü’nde tamamlamıştır. 2002 yılında girmiş olduğu Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nden 2008 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başlamıştır.