

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENTAL PLAK OLUŞUMUNDAN SORUMLU MİKROORGANİZMALARIN BAZI  
GELİŞME PARAMETRELERİ VE BİTKİ EKSTRAKTLARINA DİRENÇLİLİKLERİ

Burcu Türkmen

Danışman Öğretim Üyesi

Doç.Dr. Evrim Güneş Altuntaş

Haziran

2018

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Burcu Türkmen

İmzası



## ONAY

Doç. Dr. Evrim Güneş Altuntaş danışmanlığında Burcu Türkmen tarafından hazırlanan bu çalışma 25/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Ufuk TOYGAR MEMİKOĞLU

İmza: 

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Selin KALKAN

İmza: 

Üye: Doç.Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Dental Plak Oluşumundan Sorumlu Mikroorganizmaların Bazı Gelişme Parametreleri ve Bitki Ekstraktlarına Dirençlilikleri

Burcu Türkmen

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Evrim Güneş Altuntaş

Dental plak ağız boşluğunda bulunan bir biyofilm yapısıdır. Diş çürüğü ve diş eti hastalıkları gibi önemli halk sağlığı problemlerinin en temel nedeni dental plak oluşumudur. Bu nedenle, ağız ve diş sağlığını korumak için biyofilm yapılarının oluşumunu engelleyecek önlemlerin alınması gerekmektedir. Bazı bitki ekstraktlarının biyofilm oluşumunu engelleyici etki gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla ile günlük diyetimizde yer alan bitkisel gıdalar ağız ve diş sağlığının korunması açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, dişlerde dental plak oluşumundan sorumlu bazı bakterilerin gelişim koşulları belirlenmiş, dental plak oluşturma düzeyleri saptanmış ve bazı bitki ekstraktlarının biyofilm üreten bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda dişlerde dental plak oluşturduğu bilinen, ağız boşluğundan izole edilmiş 9 bakteri suşunun ve standart olarak seçilen *Streptococcus mutans* ATCC 25175 bakterisinin, diş dolgu materyali üzerinde biyofilm oluşturması sağlanmıştır. Dolgu materyali üzerinde tutunan bakteri sayıları kob/mm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise günlük diyetimizde sıkça tükettiğimiz yeşil çay, siyah çay, ıhlamur, zerdeçal ve tarçından elde edilen ekstraktların dental plak oluşumdan sorumlu bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Elde edilen verilere göre; bakterilerin, bulk-fill kompozit rezin yüzeyinde  $3,9 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> ile  $7,4 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında, *S.mutans*'ın ise  $5,2 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde tutunduğu saptanmıştır. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin bakteriler üzerinde değişik oranlarda etki gösterdiği; sırası ile tarçın, zencefil ve yeşil çayın en fazla inhibitör etki gösteren bitkiler olduğu tespit edilmiştir.

2018, 86 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Biyofilm, dental plak, bitki ekstraktları, antimikrobiyal aktivite

## ABSTRACT

Master Thesis

Some Growth Parameters and Resistance to Plant Extracts of Microorganisms Responsible for the Formation of Dental Plaque

Burcu Türkmen

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc.Prof. Evrim Güneş Altuntaş

Dental plaque is a biofilm structure in the oral cavity. The formation of dental plaque is the most basic reason for important public health problems such as tooth decay and periodontal disease. For this reason, precautions that will prevent the formation of biofilm structures must be taken to protect the public health. It is known that some plant extracts have an inhibitory effect on biofilm formation. Therefore, vegetative foods in our daily diet are important in terms of protection of mouth and dental health.

In this thesis, the developmental conditions of some bacteria responsible for the formation of dental plaque in the teeth is identified, the level of dental plaque formation is determined, and the antimicrobial effect of some plant extracts on the biofilm producing bacteria is investigated. For this purpose, 9 bacterial strains isolated from oral cavity known to form dental plaque on teeth surface and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 bacteria selected as standard were ensured to create biofilm on restorative material. In later stages, the bacteria numbers on the restorative material were determined as cfu /mm<sup>2</sup>. In the second part of the study, the inhibitory effects of green tea, black tea, linden, sage, ginger and cinnamon extracts, which we often consume in daily life, on bacterial responsible for dental plaque formation was examined. As a result of the study, the bacteria which is isolated from the teeth and found to form biofilm were determined to be in the range of  $3.9 \times 10^4$  cfu / mm<sup>2</sup> to  $7.4 \times 10^4$  cfu / mm<sup>2</sup> on the bulk-fill composite resin surface and *S.mutans* is  $5.2 \times 10^4$  cfu / mm<sup>2</sup> . It has also been found that all of the plant extracts have antimicrobial activity at different levels. It was found that cinnamon, ginger and green tea had the highest inhibitory effect with order.

2018, 86 pages

**Keywords:** Biofilm, dental plaque, plant extracts, antimicrobial activity

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, karşılaştığım her sorunda sabrı, ilgisi ve güler yüzü ile bana yol gösteren, iş disiplini, insani ve ahlaki değerleri ile kendime örnek edindiğim değerli danışmanım Doç.Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Çalışmamın farklı aşamalarında engin bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Canan YÜKSEL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), analizlerde ekipmanlarından ve malzemelerinden faydalandığım Prof.Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Dr.Dt. Gülbike DEMİREL'e (Ankara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi) ve Doç.Dr. Alper GÖKBULUT'a (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi), laboratuvar çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımda bulunan grup arkadaşım Özüm ÖZOĞLU'na,

Bu zamana kadar attığım her adımda beni destekleyen, beni yalnız bırakmayan annem Şükran KABASAKAL'a, babam Erol KABASAKAL'a ve kardeşim İlyas Can KABASAKAL'a,

Lisans üstü eğitimime başlamama vesile olan, bu süreçte benden desteğini ve anlayışını esirgemeyen, çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımda bulunan hayat arkadaşım Serdar TÜRKMEN'e ve bu sürecin her anına tanıklık eden biricik kızım Gülay TÜRKMEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Burcu TÜRKMEN

Ankara, Haziran 2018

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. BİYOFİLM: TANIMI VE YAPISI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. BİYOFİLM OLUŞUM MEKANİZMASI</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. KOLONİ GELİŞİMİ VE OLGUN BİYOFİLM OLUŞUMU .....	6
2.2.2. BİYOFİLMDEKİ HÜCRELERİN KOPMASI VE AYRILMASI .....	7
<b>2.3. DENTAL PLAK</b> .....	<b>8</b>
2.3.1. DIŞ YÜZEYİNE TUTUNMA .....	11
2.3.2. ORAL BAKTERİLER ARASINDA BİRLİKTE AGREGASYON (KO-AGREGASYON).....	12
2.3.3. ORAL BAKTERİLER ARASINDAKİ METABOLİK İLETİŞİM .....	13
2.3.4. BAKTERİYOSİNLER VE DİĞER İNHİBİTÖR METABOLİTLERİN ORAL BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİLERİ .....	14
2.3.5. DIŞ ETKENLERE KARŞI ENGEL OLARAK BİYOFİLM .....	15
<b>2.4. BİTKİ EKSTRAKTLARI</b> .....	<b>17</b>

<b>2.5. GÜNÜMÜZDE KULLANILAN DOLGU MATERYALLERİ VE DENTAL PLAK OLUŞUMUNDAKİ ROLLERİ .....</b>	<b>24</b>
2.5.1. AMALGAM.....	24
2.5.2. CAM İYONOMER SIMANLAR .....	25
2.5.3. REZİN MODİFİYE CAM İYONOMER SIMANLAR .....	26
2.5.4. KOMPOMERLER (POLIASİT MODİFİYE REZİN KOMPOZİTLER) .....	26
2.5.5. KOMPOZİT REZİNLER .....	27
2.5.5.1. Bulk Fill Kompozit Rezınler.....	28
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>	<b>30</b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b>32</b>
<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ ....	32
4.2.2. FARKLI SICAKLIK VE pH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ .....	33
4.2.3. BİTKİ EKSTRAKTLARININ ELDESİ .....	34
4.2.4. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTOR ETKİLERİNİN TESPİTİ .....	35
4.2.5. BAKTERİ SUŞLARININ TANIMLANMASI.....	35
4.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu .....	35
4.2.5.2. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	36
4.2.5.3. 16S rRNA PCR Reaksiyonu .....	36
4.2.5.4. 16S rRNA PCR ürünlerinin saflık kontrolü.....	38
4.2.5.5. 16S rRNA PCR pürifikasyonu.....	38
4.2.5.6. DNA dizi analizi .....	39

4.2.5.6.1. Sekans PCR Reaksiyonu.....	39
4.2.5.6.2. DNA Dizi Analizi PCR Pürifikasyonu .....	41
4.2.5.6.3. DNA Dizi Analizi .....	42
<b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>43</b>
<b>5.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2. FARKLI SICAKLIK VE PH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTOR ETKİLERİNİN TESPİTİ .....</b>	<b>48</b>
5.3.1. SU EKSTRAKSİYONU DENEME SONUÇLARI.....	48
5.3.2. ALKOL EKSTRAKSİYONU DENEME SONUÇLARI.....	52
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b>63</b>
<b>6.1. TARTIŞMA.....</b>	<b>63</b>
6.1.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	63
6.1.2. FARKLI SICAKLIK VE PH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	64
6.1.3. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTOR ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	65
<b>6.2. SONUÇ.....</b>	<b>69</b>
<b><u>7. KAYNAKLAR .....</u></b>	<b>72</b>
<b><u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b>84</b>
<b><u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR .....</u></b>	<b>85</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları (24).....	5
Şekil 2.2. Dental Plak Mikroflorasında Ekolojik Dalgalanmalar (36) .....	9
Şekil 2.3. Dental Plak Oluşum Aşamaları (37) .....	11
Şekil 2.4. Oral Bakteriler Arasındaki Ko-agregasyon (37) .....	12
Şekil 5.1. 37°C sıcaklık ve 7,2 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .	43
Şekil 5.2. 33°C sıcaklık ve 7,2 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .	45
Şekil 5.3. . 37°C sıcaklık ve 6,5 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> )	46
Şekil 5.4. 33°C sıcaklık ve 6,5 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .	47
Şekil 5.5. <i>S. mutans</i> ’ın farklı sıcaklık ve pH koşullarında dolgu materyali yüzeyinde biyofilm oluşturan bakteri sayıları (kob/mm <sup>2</sup> ) .....	48
Şekil 5.6. Etanol ekstraktları ve 1021 numaralı suş ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zonları .....	59
Şekil 5.7. Etanol ekstraktları ve <i>S.mutans</i> ile yapılan denemede oluşan inhibisyon zonları	60
Şekil 5.8. Su ile elde edilen bitki ekstraktlarının <i>S.mutans</i> üzerindeki inhibisyon etkileri .	61
Şekil 5.9. Etanol ile elde edilen bitki ekstraktlarının <i>S.mutans</i> üzerindeki inhibisyon etkileri .....	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dental Plak Oluşumuna Katılan Mikroorganizmalar (3) .....	10
Çizelge 4.1. Dolgu materyali yüzeyinde bakterilerin biyofilm üretimlerinin araştırıldığı sıcaklık ve pH koşulları .....	34
Çizelge 4.2. 16S rRNA Touch-Down PCR aşamasında uygulanan koşullar .....	37
Çizelge 4.3. 16S rRNA PCR aşamasında hazırlanan PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.....	37
Çizelge 4.4. 16S rRNA PCR aşamasında kullanılan primerlere ait baz dizileri ve Tm değerleri.....	38
Çizelge 4.5. Sekans PCR Çalışma Koşulları .....	40
Çizelge 4.6. Sekans PCR aşaması için kullanılan karışımdaki bileşen miktarları .....	40
Çizelge 4.7. Sekans PCR koşulları .....	41
Çizelge 5.1. 37°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .....	43
Çizelge 5.2. 33°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .....	44
Çizelge 5.3. 37°C sıcaklık ve 6,5 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .....	45
Çizelge 5.4. 33°C sıcaklık ve 6,5 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm <sup>2</sup> ) .....	46
Çizelge 5.5. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	49
Çizelge 5.6. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm) .....	50

Çizelge 5.7. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen ıhlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	51
Çizelge 5.8. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen tarçın ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	52
Çizelge 5.9. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen adaçayı ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	53
Çizelge 5.10. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	54
Çizelge 5.11. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	55
Çizelge 5.12. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen siyah çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	56
Çizelge 5.13. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen ıhlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	57
Çizelge 5.14. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen tarçın ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm).....	58
Çizelge 5.15. Tez çalışmasında kullanılan bakterilerin NCBI veritabanı kullanılarak elde edilen tanımlama sonuçları.....	62

## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
Mm	Milimetre
N	Örneğin 1 g ya da 1 mL'inde bulunan mikroorganizma sayısı
C	Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı
V	Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim
$n_1$	İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi
$n_2$	İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi
D	Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı
ATCC	American Type Culture Collection
Dk	Dakika
Sn	Saniye
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EB	Etidium bromide
Kob/g	Koloni oluşturan birim / gram
Kob/mm <sup>2</sup>	Koloni oluşturan birim / milimetre kare
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyon
QS	Quorum Sensing
EPS	Extracellular Polymeric Substances

## 1. GİRİŞ

Diş çürükleri ve periodontal hastalıklar insanlar tarafından önemli hastalıklar olarak kabul edilmeseler de gerek yaygınlıkları, gerekse tedavi edilmemiş vakaların çokluğu göz önüne alındığında ciddi sağlık problemleri oldukları görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2003 yılında yayınladığı rapora göre gelişmekte olan ülkelerde ağız sağlığı hizmetleri yeterli düzeyde sunulmamaktadır (1). Bunun nedeni; ağız ve diş sağlığı için uygulanan tedavi maliyetinin fazla olması ve gelişmiş ülkelerde en pahalı tedaviler arasında dördüncü sırada bulunmasıdır. Bu durum, dünya genelinde hastalıkların tedavi edilmesi kadar hastalıkları önleyici tedbirlerin alınmasını da şart koşmaktadır. Ağız sağlığı söz konusu olduğunda ilk akla gelen sağlık problemi diş çürükleridir ve diş çürüğü patogenezinin birinci aşaması ise dental plak oluşumudur (2). Dental plak en iyi tanımlanmış biyofilm yapılarından birisidir. Plak içerisinde yaklaşık 1000 mikroorganizma türü bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların bir kısmı ağız sağlığı için faydalı iken, büyük çoğunluğu insanlar için patojendirler (3). *Streptococcus mutans*, dental biyofilm oluşumuna katılan ve biyofilmin büyümesine katkı sağlayan, bilinen en karyojenik bakteridir. Biyofilm içerisindeki bakteriler ekzopolisakkarit (EPS) adı verilen bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (4). Biyofilm yapısı bakterilere; besinlere ulaşım kolaylığı ve antimikrobiyal maddelerden, olumsuz pH ve ozmotik basınç gibi çevresel koşullardan koruma gibi avantajlar sağlamaktadır (5). Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlar. Dental plak oluşumunda ise bakteriler, ağız temizliğinin hemen ardından diş yüzeyinde oluşan pelikül tabakasına tutunurlar. İlk tutunan bakteriler erken plak bakterileri olan Streptokoklar, Laktobasiller ve *Actinomyces* türleridir (6). Bu bakterilerin ortak özelliği Gram pozitif olmaları ve diş minesi yüzeyine tutunabilmeleridir. *Prevotella* spp, *Porphyromonas* spp, *Neisseria* ve *Capnocytophaga* türleri gibi Gram negatif bakteriler ise, anaerobik ortamda optimum gelişebildikleri için diş eti oluşu gibi dokulara tutunurlar ve diş eti iltihabı gibi hastalıklara sebep olurlar (4).

Bitki ekstraktları çok eski zamanlardan beri, pek çok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların bitki ekstraktlarına karşı edinsel bir direnç geliştirmemeleri, bitkileri bilim insanlarının ilgi odağı yapmıştır. Bu tez kapsamında faydalanılan ve ülkemizde oldukça sık tüketimi bulunan bazı bitkiler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir:

**Yeşil çay ve siyah çay** dünyada en çok tüketilen içeceklerin başında gelmektedir. Yeşil çay içeriğinde bulunan polifenoller sayesinde iyi bir antioksidan, antikaryojenik ve antimutajeniktir. Yapısında başat olarak bulunan polifenoller kateşinlerdir (7). Siyah çay, yeşil çayın fermente olmuş halidir. Yeşil çayın yapısında bulunan polifenoller fermentasyon sırasında okside olurlar. Siyah çayın antikaryojenik özelliği içeriğinde bulunan teafilin, tearubin ve florür gibi bileşenlerden gelmektedir (8).

**Adaçayı** çok eski zamanlardan beri hem kozmetik alanında hem de tıpta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ateş, romatizma, cinsel sorunlar ve dengesiz sinir durumlarının tedavisinde başvurulan tıbbi bitkilerden birisidir. Yapısında bulunan karnosoik asit gibi fenolik bileşiklerin ve manolün antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir (9) (10).

**Zencefil** kök yumruları baharat ve ilaç olarak kullanılan bir bitkidir. Yapısında bulunan gingerol, paradol, shogaol ve zingeron gibi fenolik bileşiklerin antibakteriyel özellik göstermektedir (11).

**Tarçın;** kabuk ve yaprak kısımları baharat olarak kullanılan, içeriğinde bulunan sinnemalaldehit, öjenol gibi uçucu yağlar ve vanilik, kafeik, gallik, ferulik, p-kumarik asit gibi fenolik bileşikler sayesinde güçlü antimikrobiyal özelliğe sahip bir bitkidir. Antik zamanlardan beri hem ilaç olarak hem de mutfaklarda baharat olarak kullanılmaktadır (12).

**Ihlamur** yaprakları ve çiçekleri kaynatılarak çay olarak tüketilen bir bitkidir. Ihlamurda bulunan farnesolün biyofilm oluşumunu engelleyici özelliğe sahip olduğu kaydedilmiştir (13).

Diş çürüklerinin oluşumuna sebep olan temel unsurlar; genetik faktörler, günlük diyet ve ağız florasıdır (14). Gün içerisinde tükettiğimiz gıdalar hem diş çürüğü oluşumunu destekleyici hem de engelleyici özelliğe sahip olabilirler. Başta sakkaroz olmak üzere karbonhidratların bazılarının diş çürüklerine neden olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (8). Dental biyofilm oluşumunu engelleyen gıdaların tüketiminin artırılması ile diş çürüğü oluşumunun engellenebileceği öngörülmektedir. Yukarıda bahsi geçen bitki ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri itibari ile dental biyofilm oluşumunu inhibe edebileceği düşünülmektedir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Dental plak ağız boşluğunda bulunan bir biyofilm yapısıdır. Diş çürüğü ve diş eti hastalıklarının oluşumun temel sebeplerinden birisidir. Gün içerisinde tüketilen gıdaların pek çoğunun plak oluşumuna katkıda bulunduğu, başta sakkaroz olmak üzere karbonhidratların bakteri gelişimini teşvik ettiği ileri sürülmektedir. Buna karşın bazı bitki ekstraktlarının biyofilm oluşumunu engelleyici etki gösterdiği bilinmektedir.

### 2.1. BİYOFİLM: TANIMI VE YAPISI

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (15). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, mikroorganizmaların farklı yüzeyler üzerinde ekzopolisakkarit tabakası içerisinde oluşturduğu yoğun agregatlar olarak tanımlanmaktadır (16). Biyofilm oluşumu in vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde görülebilmektedir. Nem miktarının fazlalılığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır. Biyofilm oluşumu ve gelişimi üzerine bakteri suşu, yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır.

Biyofilm yapısı, bünyesinde barındırdığı bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel faktörlerdeki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın zararlarından korur. Ayrıca; besinlerin depolanması ve artıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması gibi avantajlar da sağlamaktadır. Bakterilerin ekzopolisakkarit matriks içerisinde gömülü halde bulunmaları, onların fagosite edilmelerini güçleştirir ve antimikrobiyal ajanların bakterilere nüfuz etmesini engeller (17).

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi birden fazla mikroorganizma türünden de oluşabilirler. Farklı türleri bünyesinde bulunduran biyofilmlerde, her tür kendi mikro kolonisini oluşturur. Mikro koloniler birbirlerinden su kanalları vasıtası ile ayrılmışlardır. Bu su kanalları içerisindeki su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar (18).

Biyofilm kütlelerinin yaklaşık %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturmaktadır. Diğer bileşenler; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit,

lipit ve fosfolipitlerdir. Bu oranlar biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, genel fiziksel özelliklere ve akışkanın tipine göre değişebilmektedir (19).

Polisakkarit, DNA, protein ve sudan oluşan matriks hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkı bir şekilde tutunan bakteri burada çoğalmaya başlar ve önce mikro kolonileri sonra da büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, bakterinin yüzeye dönüşümsüz tutunmasını sağlar ve biyofilm oluşumunun bir göstergesidir (20).

EPS'nin temel bileşenleri glikoziltransferaz, fruktoziltransferaz ve bu enzimlerin sakkaroz ve nişasta hidrolizatları ile olan etkileşim ürünleridir (21). EPS jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilmektedir ve yapısı, protein,  $Ca^{+2}$  iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır. Bunun yanı sıra biyofilm yapısında hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer bazı enzimleri bulundurmaktadır ve bu enzimler biyofilmin fiziksel özelliklerine etki ederler. Enzim faaliyetleri sonucunda oluşan düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünleri, biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (19).

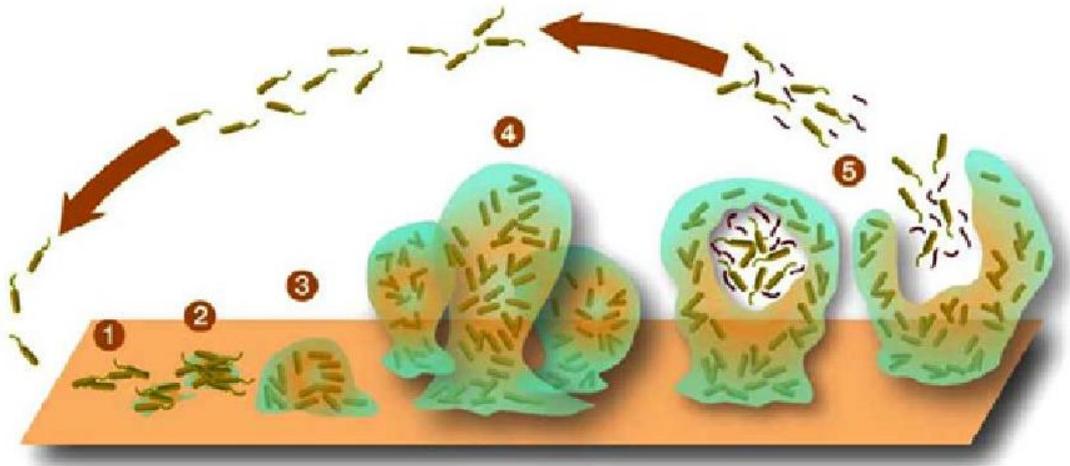
Biyofilm yapısı saf kültürler için mikroorganizmanın türüne, çoklu kültürler içinse substrata özgüdür. Heterojen bir içeriğe sahip biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Bunun nedeni, yapı içerisindeki mikroorganizmaların büyüme ve biyofilme tutunma şekillerinin farklı olmasıdır. Biyofilmin kalınlığı, bulunduğu ortamdaki akış hızına göre değişmektedir. Maksimum biyofilm kalınlığına laminar ve türbülanslı akış arasında ulaşılmaktadır. Laminer akışın olduğu alanlarda biyofilm kalınlığı substrata ulaşabilirliğe, türbülanslı akışın bulunduğu ortamda ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, biyofilm yapısı üzerinde su ve besin maddesinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapının olduğu belirlenmiştir. Bu kılcal damar su kanalları mikro kolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabakasının tabanına ulaşması bu özel kanallarla gerçekleşmektedir. Taşıma işlemi su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaştırılır. Ayrıca su kanallarının biyofilm içerisine oksijen taşıdığı da belirlenmiştir (22).

## 2.2. BİYOFİLM OLUŞUM MEKANİZMASI

Biyofilm gelişimi dinamik bir proses olmakla birlikte, substrat difüzyon limiti ve kayma gerilimi gibi çevresel koşullardan etkilenen bir yapıdır ve doğada çok farklı çevrelerde oluşabilmektedir. Çevresel koşulların yanı sıra biyofilmler içerdikleri mikroorganizma tipine göre farklı özelliklere sahip olurlar. Mikro kolonilerin bulunduğu ortama taze besin akışı sağlandıkça biyofilm gelişimi devam eder. Ancak ortamdaki besin maddeleri tükenince, kolonilerin yüzey ile olan bağlantıları zayıflar ve hücreler koparak planktonik modlarına geri dönerler. Ayrıca biyofilm oluşumunda yüzey koşullarının özelliklerinin bilinmesi de son derece önemlidir (23).

Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. İlk olarak hücreler yüzeye yakın bir mesafede, yüzeye dönüşümlü olarak tutunurlar [1]. Sonrasında o yüzeyde yaşamalarını sağlayacak besin maddelerinin varlığına göre, yüzeye olan kısa mesafeli etkileşimleri ile yüzeye dönüşümsüz olarak tutunurlar [2] ve gelişip koloni oluştururlar [3]. Mikro koloniler zamanla büyür [4] ve biyofilm meydana gelir [5]. Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Biyofilm Oluşum Aşamaları (24)

Bakteriler gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik olarak iki gruba ayrılabilirler. Planktonik hücreler serbest olarak yaşarlar. Yerleşik hücreler ise önce bir yüzeye tutunurlar, sonrasında topluluk halinde yaşamlarını devam ettirirler (24). Bakteriler

herhangi bir yüzeye tutunmadan önce yüzeyin mekanik özellikleri bakteriler tarafından algılanır. Bu mekanik özellikler bakterilerin yüzeye tutunma, biyofilm oluşturma ve virülans faktörlerin devreye girmesi gibi fonksiyonlarını indükler. Bakteriler pili ve flagellaları aracılığıyla yüzey ile etkileşime geçerler. Pilileri vasıtası ile yüzeyle geçici olarak temas kurarlar (25).

Bakterilerin yüzeye tutunmaları zamana bağlıdır, dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki basamakta incelenir. Dönüşümlü tutunmada hücre yüzey ile tam temas etmemekte, yüzey ile arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bu etkileşimler; elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleridir. Tutunulan yüzey ile ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimler büyük rol oynar. Hücreler bu fazda yıkama gibi basit bir işlemle bile kolayca uzaklaştırılabilirler (24).

Dönüşümsüz tutunmada yüzey ile bakteri arasında kısa mesafeli etkileşimler olan; dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır. Bakteriler sahip oldukları flagella ve pili organelleri ile yüzeye bağlanırlar ve EPS'nin oluşması ile dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Dönüşümsüz tutunmada bakterilerin yüzeyden uzaklaştırılabilmeleri için fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılması gerekmektedir (24).

### **2.2.1. KOLONİ GELİŞİMİ VE OLGUN BİYOFİLM OLUŞUMU**

Mikro koloni oluşumu hücrelerin yüzeyde birikmesi, gelişmesi ve EPS üretimi sonucunda gerçekleşir. Üretilen EPS diğer planktonik hücrelerin de biyofilm yapısına tutunmasını sağlar. Bakterilerin yüzeyde toplanma işlemleri planktonik hücrelerin sinyal molekülleri ile etkileşime geçip bir araya gelmesi ile gerçekleşir. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluştururlar (22).

Biyofilmdeki hücre yoğunluğunun artması ile topluluk içerisindeki hücreler arasında iletişimin gerçekleşmesini sağlayan sinyal moleküllerinin salgılanma hızı artar. Biyofilm içerisindeki bakteriler sinyal moleküllerini üretir, başka bir bakteri tarafından salgılanmış molekülü tespit eder ve bir yanıt oluşturur. Hücreler arası bu iletişime Quorum Sensing (QS) adı verilir (26). QS ilk olarak denizlerde yaşayan biyoluminesans Gram negatif bir bakteri olan *Vibrio fischeri* de tespit edilmiştir. *V. fischeri* bazı deniz hayvanları ile

simbiyotik bir birliktelik yaşar. Bu birliktelikte konak, *V. fischeri*'nin ürettiği ışığı, avını bulunduğu ortama çekme ve yırtıcılardan kaçınma gibi yaşamsal faaliyetleri için kullanmaktadır. Bu karşılıklı ilişkide *V. fischeri*'nin kazancı ise içerisinde bulunduğu zengin besin ortamından faydalanmasıdır. *V. fischeri*'nin ışık üretebilmesini sağlayan mekanizmanın lusiferaz enzim kompleksi olduğu tespit edilmiştir. *V. fischeri*'nin biyoluminesans özelliği yalnızca hücre yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda ortaya çıkmakta ve QS tarafından kontrol edilmektedir (27).

Bakterilerin spor üretimi, organ oluşturma (flagella gibi), bakteriyosin üretimi, programlı hücre ölümü, virülans ve biyofilm oluşturma gibi sosyal ve fizyolojik süreçleri QS mekanizması tarafından düzenlenmektedir. Birçok bakteri QS mekanizması sayesinde bireysel olarak elde edemeyecekleri kazanımlara sahip olurlar.

QS mekanizması, sinyal molekülünün bir sensör ya da bir gen ifadesinin başlatılmasını sağlayan transkripsiyonel aktivatör ile etkileşime geçmesine dayanır. QS sistemleri bakterilerde 3 sınıfa ayrılmıştır.

1. Gram negatif bakterilerde etkin olan, açıl homoserin laktonların (AHL) sinyal molekülü olduğu luxI/luxR tipi QS mekanizması,
2. Gram pozitif bakterilerde, sinyal molekülü olarak küçük peptitlerin kullanıldığı mekanizma,
3. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin her ikisinde de etkin olan luxS kodlu otoindüser 2 (AI<sub>2</sub>) (26).

Koloni gelişiminin ardından, mikro koloniler büyürler ve oldukça karmaşık yapılara dönüşürler. Mikro koloniler arasında besinlerin taşınmasını ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları bulunmaktadır (28). Hücrelerin bu yapıya ulaşabilmesi yaklaşık 10 gün sürmektedir (29).

### **2.2.2. BİYOFİLMDEKİ HÜCRELERİN KOPMASI VE AYRILMASI**

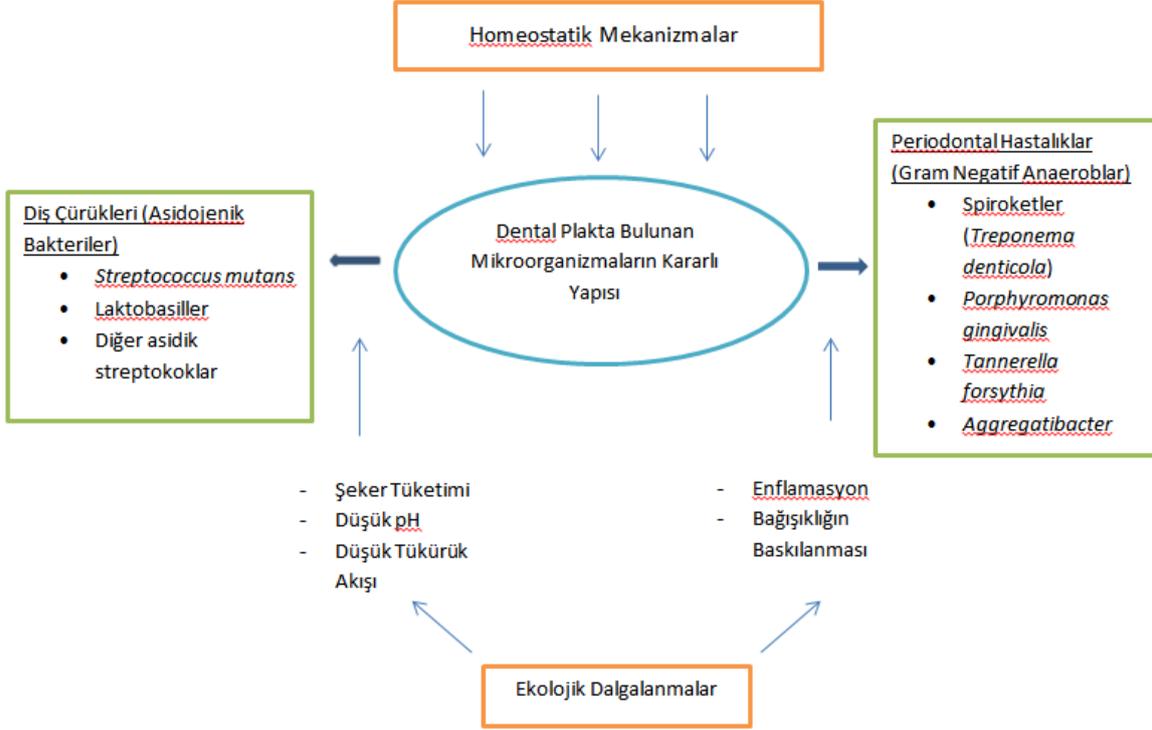
Bakteriler bu evrede planktonik fazlarına geri dönerler. Bakteriler EPS içerisinde hareketsiz halde bulunmaktadır. Dağılma aşamasında hareketli forma tekrar dönmek için hızlı bir şekilde çoğalmaya başlarlar. Bu aşamada bakteriler bazı sakkarolitik enzimler salgılayarak bağlı oldukları yüzeyden ayrılır ve başka bir yüzeyde koloni oluşturmak için

etrafa saçılırlar. Örneğin *Escherichia coli* N-asetil-heparosan liyaz, *Streptococcus equi* ise hiyalüronidaz sentezleyerek EPS matrisinin lizis olmasını sağlar ve biyofilm yapısından ayrılırlar (30). Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisi ile olabileceği gibi oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya hücrelerin kopması ile de olabilir. Artan akış kuvveti, sistem içindeki enzimatik bozulma, EPS ve yüzey bağlayıcı proteinlerin açığa çıkması gibi değişimler biyofilmde bulunan hücrelerinin ayrılmasında önemli rol oynamaktadır (31).

### 2.3. DENTAL PLAK

Dental plak diş üzerinde mikroorganizmalar, lökositler, makrofajlar, ölü epitelyum hücreleri, tükürük glikoproteinleri ve bir miktar yiyecek artıklarının oluşturduğu birikim olarak tanımlanmaktadır (32). Dental plaklar, insan vücudunda şimdiye kadar en iyi şekilde tanımlanmış biyofilm yapılarıdır. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar, ağız florasında yaklaşık 1000 bakteri türünün olduğunu göstermiştir (3). Ağız mikroflorasındaki bakteriler diş, dil, ağız mukozası, damak ve periodontal cep gibi bölgelere kolonize olmuşlardır. Bu bakterilerin büyük bir kısmı ağız sağlığı için faydalıyken bilimsel çalışmalar ağız sağlığını tehdit eden patojenler üzerinde yoğunlaşmıştır. Son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar birden fazla türden oluşan dental biyofilmlerin dental hastalıklara sebep olduğunu göstermiştir (33).

1990 yılında Marsh ve ark. tarafından geliştirilen “Ekolojik Plak Hipotezi” diş çürüğü ve diş eti hastalıklarının oluşumunu en iyi açıklayan yaklaşım olarak kabul edilmektedir (34). Ekolojik plak hipotezine göre dental plak, çevresel tepkilere düzenli olarak maruz kalmasına rağmen nispeten kararlı bir yapıdadır (Şekil 2.2). Bu kararlı yapı plak içerisindeki bakterilerin sinerjik ve antagonistik etkileşimlerine bağlıdır. Kararlılığın bozulması hastalıkların oluşumuna sebep olmaktadır. Marsh bu hipotezinde, diş ve diş eti hastalıklarının, yalnızca patojen mikroorganizmaların hedef alınması ile değil, aynı zamanda homeostazideki bozulmayı tetikleyen süreçlere müdahale edilmesi ile önlenebileceğini ve tedavi edilebileceğini söylemektedir (34).



Şekil 2.2. Dental Plak Mikroflorasında Ekolojik Dalgalanmalar (36)

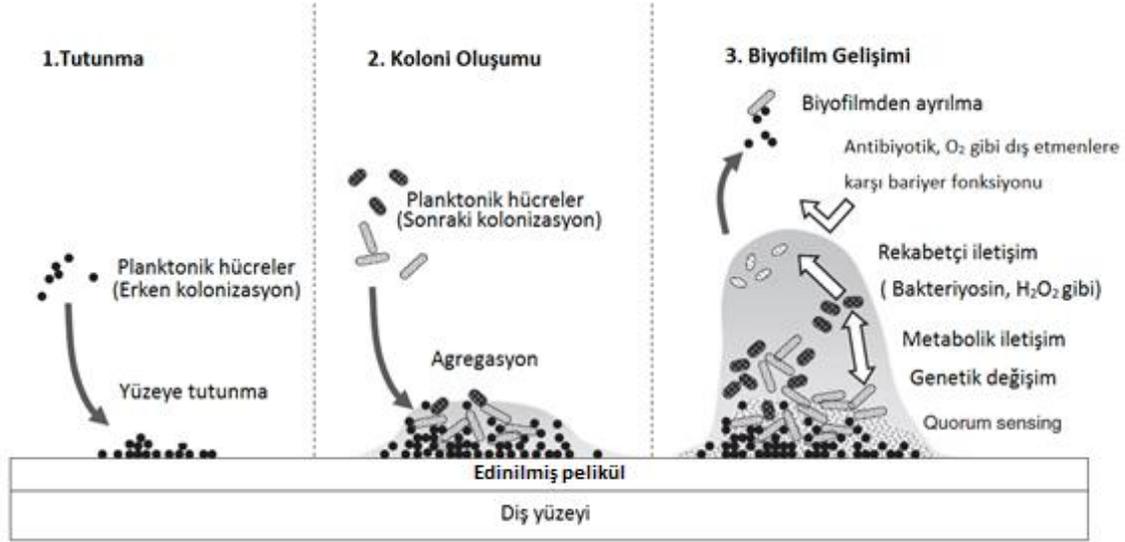
Dental biyofilm subgingival ve supragingival plak olmak üzere iki kısımdan oluşur. Subgingival; diş etinin altındaki bölgeye verilen isimken, supragingival diş eti çizgisinin üzerinde kalan bölgedir. Supragingival plakta Gram pozitif bakteriler baskınken, subgingival plakta Gram negatif bakteriler daha baskındır. Diş çürüklerinin oluşmasında supragingival plak önemli rol oynar. Subgingival plak oluşumuna katılan bakteriler çoğunlukla diş eti iltihabı ve periodontal hastalıklara sebep olurlar. Çizelge 2.1’de supragingival ve subgingival plakta bulunan bakteri türleri belirtilmiştir (3). Ekolojik plak hipotezine göre başlangıç aşamasındaki supragingival plak zararlı değildir. Diş fırçalama ve diş ipi kullanımı gibi fiziksel işlemlerle dental plağın büyümesi önlenabilir (34).

Çizelge 2.1. Dental Plak Oluşumuna Katılan Mikroorganizmalar (3)

Supragingival Plak	Subgingival Plak
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Streptococcus gordonii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Actinobacillus</i> spp.
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Synergistes</i> spp
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Treponema</i> spp.
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	
<i>Candida</i> spp.	

Dental biyofilm içerisinde bulunan bakteriler, planktonik hallerinden farklı bir fenotip sergilemektedir. Örneğin, biyofilm içerisindeki bakteri türleri antibiyotik, pH ve oksijen gibi çevresel koşullara karşı planktonik hallerine göre çok büyük bir direnç göstermektedirler. Dental biyofilm içerisinde bulunan bakteriler topluluk içerisindeki diğer türler ile ya iş birliği içerisinde ya da rekabet halindedir. Bakteriler arasındaki etkileşimler biyofilm oluşumu ve büyümesini etkilemektedir. Planktonik bakteri hücresi ya ağız boşluğundaki yüzeye doğrudan ya da yüzeyde daha öncesinde kolonize olmuş olan bakterilere dolaylı olarak tutunurlar. Metabolik ve fizyolojik açıdan değerlendirildiğinde dental biyofilm içerisinde iletişim; metabolik iletişim, genetik değişim ve quorum-sensing

gibi yollar ile sağlanmaktadır. Bu iletişim mekanizmaları konağın cinsiyetine, bağışıklığına, genetik mirasına ve hayat tarzına göre bakteri kompozisyonunun farklılaşması ile değişmektedir (35).



Şekil 2.3. Dental Plak Oluşum Aşamaları (37)

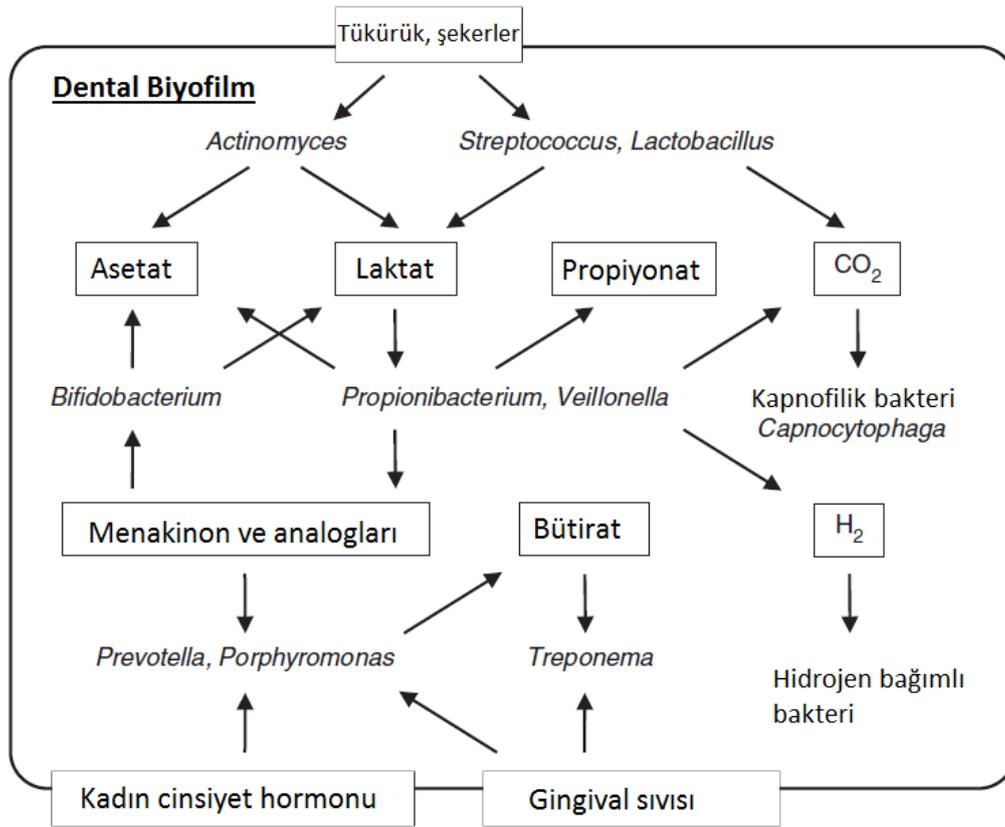
### 2.3.1. DIŞ YÜZEYİNE TUTUNMA

Bakteriyel adezyon ve diş yüzeyi ya da dokuların üzerinde başlayan kolonizasyon, dental biyofilm oluşumunun ilk aşamasıdır (Şekil 2.3). Diş yüzeyinin temizlenmesinin hemen ardından oluşan ve diş yüzeyini kaplayan ince film tabakasına pelikül adı verilmektedir. Pelikül prolince zengin proteinler, amilaz, lizozim, histadin, peroksidaz, müsin, fruktoziltransferaz ve glikoziltransferaz gibi tükürük bileşenlerinden oluşur (21). Viridans streptokoklar gibi ağız içi florasında çokça bulunan bakteriler diş yüzeyine pelikül aracılığı ile bağlanmaktadır. Diş pelikülüne tutunma, bakterilerinin konak molekülleri ile etkileşimine bağlıdır. Oral streptokokların birçoğu alfa-amilaz, prolince zengin proteinler, glikoproteinler ve erken kolonize olmuş bakterilere tutunma kabiliyetine sahiptirler. Bu özellik streptokoklara erken dental plak oluşumuna katılma avantajı sağlar. *S. gordonii* dental biyofilimde ilk kolonize olan türlerden birisidir. Bu tür tükürüğün yaklaşık %25-30'unu oluşturan asidik prolince zengin proteinlere bağlanır. *S. sanguinis*'in tükürük ile kaplanmış diş yüzeyine seçici olarak bağlanan ve kolonize olan ilk bakteri olduğu

düşünülmektedir. Bu türe genellikle diş çıkmasının ardından ağızda oluşan boşlukta rastlanır.

### 2.3.2. ORAL BAKTERİLER ARASINDA BİRLİKTE AGREGASYON (KO-AGREGASYON)

Planktonik bakteri hücreleri diş yüzeyine doğrudan bağlanamazlar. Diş yüzeyinde bulunan erken plak kolonilerinin hücre yüzeylerine reseptörler aracılığı ile bağlanırlar. Birlikte agregasyon farklı bakteri hücreleri arasında gerçekleşen hücre-hücre reaksiyonudur ve dental biyofilm oluşumunun en önemli mekanizmasıdır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Oral Bakteriler Arasındaki Ko-agregasyon (37)

*P.gingivalis* erken kolonize olan bakterilere tutunabilir. *P. gingivalis*'in uzun fimbrilleri FimA proteinlerinden oluşmuştur ve *Streptococcus oralis*'in yüzeyindeki gliseraldehid- 3-fosfata bağlanır. Üçten fazla bakteri hücrelerinin bağlantısını içeren köprüler önemlidir; çünkü köprülere ko-agregasyona katılmayan türler de bağlanabilir. *Fusobacterium*

*nucleatum*, streptokoklar ve zorunlu anaerobların da içinde bulunduğu birçok oral bakteri ile ko-agregasyon yapar. Bu nedenle bu türler dental biyofilm için anahtar bileşenlerdir ve erken/geç koloni oluşturan türler arasında köprü görevi görmektedirler (35).

*F. nucleatum* ile diğer bakteriler arasındaki ko-agregasyon bakteri hücrelerinin yüzeylerinde bulunan moleküller aracılığı ile gerçekleşmektedir. *F. nucleatum* ve Gram pozitif bakteriler arasındaki ko-agregasyon lektin-karbonhidrat etkileşimi ile gerçekleşmektedir. Örneğin, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* arasındaki bağlantı, *P. gingivalis*'in yüzeyindeki galaktozit ile *F. nucleatum*'in yüzeyindeki lektin arasında olur. Bu bağlantı laktoz ile inhibe olmaktadır. *P. gingivalis* serotipi K5, kapsül polisakkarit ve lipopolisakkaritler ile ağız içi bakterilere bağlanmaktadır (36). Ağız içi bakteriler arasındaki ko-agregasyon fiziksel ve kimyasal mekanizmalar ile sadece bakteri kolonizasyonuna katkıda bulunmamakta, aynı zamanda metabolik iletişim ve genetik değişime de fayda sağlamaktadır. Çünkü her bakteri hücresi kendi komşu bakteri hücresine ve onun metabolitlerine kolayca ulaşabilmektedir (35).

### **2.3.3. ORAL BAKTERİLER ARASINDAKİ METABOLİK İLETİŞİM**

Ağız içindeki bakteriler için besin kaynakları tükürük, dişeti oluğu sıvısı, şeker içeren gıdalar, gıda artıkları ve diğer bakterilerin metabolik ürünleridir. Bakteriler arasındaki metabolik iletişim, bir organizmanın boşaltımı ile açığa çıkan metabolitin diğer bir organizma tarafından besin olarak kullanılması ile ya da hücre dışı enzimatik aktivite sonucu bir substratın reaksiyon sonucunda başka bir organizma için kullanılabilir bir substrat haline gelmesi ile gerçekleşmektedir. Byers ve ark. tarafında yapılan çalışmada, konakçının glikoproteinlerinin *S. oralis* tarafından hidrolize edildiği ve açığa çıkan monosakkaritlerin ağız içindeki diğer bakteriler için hayati öneme sahip olduğu gösterilmiştir (37).

Dental biyofilmdeki bakterilerin metabolitleri biyofilmin diğer üyeleri için enerji kaynağıdır. Oral bakteriler tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitlerinin diğer bakteriler için önemli karbon kaynakları oldukları düşünülmektedir. İnsan klinik çalışmalarında streptokokların ve *Veillonellae* türlerinin sıklıkla aynı bölgelerde birlikte buldukları tespit edilmiştir. Dahası, yapılan bu klinik çalışmalarda bu türlerin bir arada bulunmasının periodontal sağlık ile ilgili olduğu öne sürülmektedir (38).Streptokoklar gibi Gram pozitif

bakterilerin salgıladıkları laktat gibi kısa zincirli asitlerin *Veillonellae* türleri tarafından kullanılması bu önermeyi doğrular niteliktedir (39). Hem in vitro hem de in vivo çalışmaların sonucunda *Veillonellae* türlerinin gelişmesinin laktat varlığına bağlı olduğu görülmüştür. Aynı şekilde *P. gingivalis* ve *Treponema denticola* periodontitisi bulunan kişilerde bir arada görülen bakterilerdir. Bu iki bakterinin arasındaki karşılıklı simbiyotik ilişki gelişimlerine olumlu katkıda bulunmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri hem *P. gingivalis* hem de *T. denticola* için gelişimlerini destekleyen faktörler olarak tanımlanmıştır. *P. gingivalis*'in hücre zarlarında bulunan lipit ve fosfolipitler *T. denticola*'nın gelişimini destekleyen süksinik asit ile birleşik bir halde bulunmaktadır. Ayrıca *P. gingivalis*'in ürettiği izobütirik asit *T. denticola*'nın gelişimini teşvik etmektedir.

Vitamin K, *Prevotella* ve *Porphyrromonas* suşları için uyarıcı etkiye sahiptir. Vitamin K yalnızca insanlar tarafından değil aynı zamanda dental biyofilmdeki bakteriler tarafından okzotrofik mikroorganizmalar için sentezlenmektedir. Dental biyofilmin her yerinde bulunan *Veillonella* türleri *Prevotella* ve *Porphyrromonas* tarafından kullanılan menakinonu (vitamin K2) üretmektedir. Benzer bir şekilde kinonlar ve bunlar ile ilgili bileşenler *Bifidobacterium*'un gelişimini uyarmaktadır. İnsan tükürüğünden izole edilen *Bifidobacterium* türlerinin gelişimi vitamin K varlığında gerçekleştirilmiş ve *Veillonella* kültürünün süpernatantı büyüme faktörü yerine kullanılmıştır. Süpernatantta vitamin K'ya rastlanmamıştır; fakat *Veillonella* hücresel bölgesinin K vitaminini içerdiği saptanmıştır (35).

#### **2.3.4. BAKTERİYOSİNLER VE DİĞER İNHİBİTÖR METABOLİTLERİN ORAL BAKTERİLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen, kendi türlerini, yakın bakteri türlerini ya da suşlarının gelişimini inhibe eden protein yapısında bileşenlerdir (40). Gıdalarda koruyucu olarak kullanılan nisin, ilk kez 1928 yılında keşfedilmiştir. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* türleri tarafından sentezlenen, 300'den fazla bakteriyosin tanımlanmıştır. Bakteriyosinler düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Hedef hücrenin yüzey reseptörlerine tutunarak hücre içerisine girerler. Bakteriyosinler hücre içerisine girmek için; gözenek oluşturma, hücre DNA'sının degradasyonu ve peptidoglikan sentezinin inhibisyonu gibi yolları kullanır (41).

Dental biyofilm içerisinde besin maddelerine ulaşım ve kolonizasyon konusunda iş birliği söz konusu iken rakip bakteriler arasında da rekabet olması kaçınılmazdır. Bakteriyosinler, kısıtlı besin varlığında ve sınırlı barınma ortamında yaşayan dental biyofilm bakterilerinin en önemli silahlarından birisidir (40). Örnek olarak, *S. mutans* mutasin adı verilen bir bakteriyosin üretmektedir. Lantibiyotik sınıfına dahil olan mutasin I, mutasin II ve mutasin III, diğer streptokok ve Gram pozitif bakteriler üzerinde etkilidir. Mutasinlerin *S. mutans*'ın dental biyofilm içerisinde baskın ve yaygın olmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Mutasin üretimi çevresel koşullar etkisinde genetik yollar ile kontrol edilmektedir. Mutasin IV quorum sensing yolu üzerinden regüle edilmektedir. Mutasin I'in regülasyonu ise daha karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır (42). Yapılan bir çalışmada mutasin I'in üretiminde; şeker taşınması, protein-peptid hidrolizi, amino asit ve nükleotid sentezi, hücre duvarı metabolizması gibi hücre fonksiyonlarının işleyişi ile ilgili 17 genin sorumlu olduğu öne sürülmüştür (43). *S. gordonii* streptosin, *S. sanguinis* ise sangusinin adı verilen bakteriyosinleri sentezlerler. *S. mutans* ve *S. gordonii* ile yapılan bir çalışmada bakteriyosin üretiminin dental biyofilm içerisindeki hücre yoğunluğuna bağlı olarak regüle edildiği görülmüştür (44).

Genelde bakteriyosinlerin dar bir etki spektrumuna sahip olduğu düşünülür. Fakat bazı oral bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, lantibiyotikler gibi, geniş etki spektrumuna sahiptirler. *Lactobacillus paracasei* tarafından üretilen HL32'nin *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *S. salivarius*, ve *S. sanguinis*'in gelişimini inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu bakteriyosin ısıya dayanıklı olup, basınç altında 110°C'de ve pH 6,8-8,5 gibi bir aralıkta varlığını koruyabilir. Oral laktobasiller ile yapılan bir çalışmada kronik periodontiti olan bireyler ile periodontal açıdan sağlıklı bireylerdeki laktobasil dağılımı araştırılmıştır. Zorunlu homofermentatif olan laktobasillerin sağlıklı bireylerde belirgin olarak görüldüğü saptanmıştır. *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, ve *L. salivarius*'un *S. mutans*, *P. gingivalis*, ve *P. intermedia* üzerinde güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (35).

### **2.3.5. DIŞ ETKENLERE KARŞI ENGEL OLARAK BİYOFİLM**

Birbirleri ile işbirliği içerisinde olan bakteriler; oksijen, konakçı bağışıklığı ve antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm yapısı içerisinde korunaklı bir haldedir. Dış yüzeyi aerobik bir ortama maruz kaldığından, anaerobik bakteriler erken dönem dental biyofilm

gelişiminde ve periodontal cep oluşumunda oksijene maruz kalırlar. Anaerobik bakterilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri, oksijene karşı gösterdikleri toleransa ve biyofilm topluluğu içerisindeki bakteriler arasındaki iletişime bağlıdır. Oksijenin bulunduğu ve CO<sub>2</sub>'in bulunmadığı bir ortamda *F. nucleatum* kapnofilik bir ortam oluşturarak *P. gingivalis*'in gelişimine katkıda bulunmaktadır. İki aşamalı kemostat sistem içerisinde *F. nucleatum* ve diğer türler arasındaki ko-agregasyon, zorunlu anaerobik bakterilerin hava ile temas eden bir ortamda yaşamlarını sürdürmelerini kolaylaştırmıştır. *F. nucleatum* inokulum içerisine dahil edilmediğinde; *P. gingivalis* ve *P. nigrescens*'in aerobik koşullarda biyofilm içerisindeki canlı hücre sayısında önemli bir düşüş olmaktadır. Aerobik ve oksijene toleranslı türlerin metabolizmaları zorunlu anaerobik bakteriler için toksik etki düzeyinde olan oksijen konsantrasyonunu düşürmektedir (45).

Diş yüzeyine bağlanan oral bakteriler, serbest haldeki ya da planktonik formdaki bakterilerden farklı davranış sergilerler. Biyofilm içerisindeki bakteri ile onun planktonik formundaki hali arasındaki en bariz fark antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdiği toleranstır. Sedlacek ve ark. yaptıkları çalışmada ağız florasında bulunan bakterilerin planktonik formları ile biyofilm içerisindeki formlarını inhibe eden antibiyotik konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Amoksisilin, tetrasiklin ve klindamisin kullanıldığı çalışmada, antibiyotiklerin biyofilm içerisinde bulunan bakterilere etki edebilmesi için planktonik formlarına göre yaklaşık 2 ila 250 kat arasında daha fazla antibiyotik miktarına gereksinim olduğu gösterilmiştir (46). Dental biyofilmin heterojen doğası nedeni ile birden fazla tolerans mekanizması olduğu düşünülmektedir. İlk olarak ekstraselüler matriks antimikrobiyal ajanların fiziksel olarak yapıya difüze olmasını engellemektedir. İkinci olarak dental biyofilm içerisindeki yavaş büyüme biyosit direncine katkıda bulunmaktadır. Üçüncü olarak ilaçları etkisizleştiren enzimler gibi direnç faktörleri bulunmaktadır. Örneğin  $\beta$ -laktamaz enzimi,  $\beta$ -laktamı degrade etmektedir. Enzimlerin dental biyofilm içerisinde tutulması biyofilmin bariyer fonksiyonunu güçlendirmektedir. Antibiyotiklerin bazı bakteriler tarafından parçalanması, biyofilm içerisinde bu enzimleri üretemeyen komşu bakteri türleri için büyük avantaj sağlamaktadır (35).

Son yıllarda antibiyotiğe dirençli genlerin kazanılmasında biyofilm yapıları oldukça önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Antibiyotiğe duyarlı bakteriler yatay gen

transferi aracılığıyla genellikle plazmidlerde kodlu olan antibiyotik direnci ile ilgili genleri kazanabilirler. Bakteriler arasındaki DNA değişimi üç temel yol ile gerçekleşmektedir.

1. Konjugasyon; bakteri diğer bir bakteriye konjugatif plazmidi transfer eder.
2. Transdüksiyon; DNA transferi bakteriyofajların yardımı ile gerçekleşmektedir.
3. Transformasyonda ise hücre dışındaki DNA fragmenti bakteri hücresi içerisine aktarılır (35).

Antibiyotik direnci ve toksinler ile ilgili genler yatay gen transferi ile değiş tokuş edilir. Streptokok türleri gibi dönüştürülebilir (transformable) bakteriler hücre dışı ortamdan DNA fragmentini hücre içine alabilirler. Periodontal hastalıklara sebebiyet veren Gram negatif, oral bir bakteri olan *T. denticola*, Gram negatif bakterilerden ziyade Gram pozitif bakteriler ile ortak genlere sahiptir. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada dental plak içerisinde bulunan farklı tür bakteriler arasındaki genetik değişimi incelemişlerdir. Plazmid değişimi, organizmalar arasındaki gen değişiminin izlenmesi için uygun bir modeldir. *T. denticola* bakterisinin, organizmalar arasında mekik gibi gidip gelen (shuttle) bir plazmid sayesinde, antibiyotik direnç genini *S. gordonii* bakterisine aktardığı yapılan bu çalışmada gösterilmiştir (47).

#### **2.4. BİTKİ EKSTRAKT LARI**

Bitki ekstraktları antik zamanlardan beri, özellikle Çin ve Hindistan gibi Asya ülkelerinde, çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (48). Son yıllarda ise dünya genelinde, bitki ekstraktları ve onların sağlık üzerine olan etkileri pek çok çalışmanın odak noktasını oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı son rapora göre, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %65-%80'i ilaç olarak şifalı bitkileri kullanmaktadır (49). Ayrıca 20.000'den fazla bitki türü WHO'nun Temel İlaçlar ve Sağlık Ürünleri Bilgi Portalında bulunmaktadır. Birleşmiş Milletler Ticaret ve Kalkınma Konferansı tarafından yapılan ankete göre sanayileşmiş ülkeler tarafından üretilen ilaçların %33'ünden fazlası bitki kökenlidir. Tüm bu verilerin ışığında bitki ekstraktlarının önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Antibiyotiklerin keşfi tıp dünyasında çığır açan bir yenilik olmuştur. 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilen penisilin, 1942 yılında seri bir şekilde üretilmeye

ve klinik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmenin hemen ardından, 1947 yılında *Staphylococcus aureus* bakterisinde penisiline direnç gözlenmiştir (50). Bu durum, yeni antibiyotiklerin keşfedilmesine paralel olarak antibiyotiklere karşı bakteriyal direncin de gelişmesi şeklinde devam etmiştir. Antimikrobiyal madde kullanımındaki artış nedeni ile, bakteriler genetik mutasyon ile hayatta kalma mekanizmalarını harekete geçirerek edinsel bir direnç geliştirmişlerdir. Bakterilerin antibiyotiklere zaman içerisinde gittikçe artan seviyede direnç kazanması, bilim insanlarını yeni tedavi yöntemleri ve yeni ilaçları keşfetmeye zorlamıştır (51).

Bitki kökenli antimikrobiyal maddelerin, düşük toksisitesi ve güvenilir olması fitokimyasallar ile ilgili çalışma yapmayı teşvik etmektedir (48). Bitkilerde bulunan biyoaktif maddeler; taninler, alkaloidler, karbonhidratlar, glikozitler, terpenoidler, steroidler, fenolik bileşikler (flavonoidler ve fenolik asitler) ve kumarinlerdir. Bu bileşiklerin klinik kullanımda önem arz etmesinin temel sebebi, mikroorganizmaların bu doğal antimikrobiyallara karşı genellikle direnç kazanmamalarıdır. Bitki kökenli antimikrobiyal maddelerin birçoğu fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler hücrelerin membran geçirgenliğini değiştirerek hücre gelişimini inhibe ederler.

Ayurvedik tıpta (Geleneksel Hindistan Tıbbı) yaygın bir şekilde kullanılan 50 farklı bitki türü üzerinde yapılan bir araştırmada, bitkilerin %72'sinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği kaydedilmiştir (50).

Bu tez çalışmasında da tıpta geniş bir kullanım alanına sahip bitki ekstraktlarının bazılarının dental biyofilm oluşumundan sorumlu mikroorganizmaların gelişimlerine olan etkileri araştırılmıştır. Bunun için sıkça tükettiğimiz yeşil çay, siyah çay, ıhlamur, zencefil, tarçın ve adaçayı ekstraktlarının inhibe edici özellikleri incelenmiştir. Çalışma sonuçları doğrultusunda günlük tüketimde yer alan bitki çaylarının ağız ve diş sağlığı üzerindeki etkilerinin ortaya konmasının yanısıra, ileriki çalışmalar ile bunlar arasından uygun olanların diş macunu ya da ağız çalkalama solüsyonlarına eklenme ihtimali de gösterilmiştir.

**Çay (*Camellia sinensis*)** içerdiği biyoaktif maddeler nedeni ile son yıllarda üzerinde en çok çalışma yapılan bitkilerden biridir. Yeşil çay, oolong ve siyah çay olmak üzere temelde

3 çeşittir. Yeşil çay fermente edilmemiş, oolong çayı yarı fermente edilmiş, siyah çay ise tamamen fermente edilmiştir.

Çayın antimikrobiyal aktivitesi uzun yıllardan beri araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. 1906 yılında İngiliz Ordusunda tıp doktoru olan McNaught siyah çayın *Salmonella typhi* ve *Brucella melitensis*'i öldürdüğünü göstermiş ve siyah çayın antimikrobiyal etkisi ile ilgili çalışmalar bu tarihten itibaren hız kazanmıştır (14).

Çayda yaklaşık 4000 biyoaktif madde bulunmaktadır. Bunların yaklaşık üçte birini polifenoller oluşturmaktadır. Diğer bileşenler ise alkaloidler (kafein, teofilin, teobromin), aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, klorofil, uçucu organik asitler, florür, alüminyum, mineraller ve diğer elementlerdir. Çayda bulunan polifenollerin ise çoğunu flavonoidler oluşturmaktadır (7).

Yeşil çayın kimyasal bileşimi oldukça karmaşıktır ve tam olarak tanımlanmamıştır. Yeşil çaydaki başat bileşenler kateşinler, kateşin gallatlar ve prokateşinler gibi polifenollerdir. Ayrıca çayın yeşil yaprakları kafein, teobramin, teofilin, diğer metilksantinler, lignin, organik asitler, klorofil ve serbest amino asitleri de içerir (52).

Yeşil çayın birçok biyoaktif özelliği kuru yaprak ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturan kateşinlerden ileri gelmektedir. Güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösteren kateşinler; kateşin, gallokateşin, epikateşin (EC), epigallokateşin (ECg), epigallokateşin gallat (EGCg), kateşin gallat (Cg), ve gallokateşin gallattan (GCg) oluşmaktadır (53). Kateşinlerin hangi yol ile bakterilere etki ettiği bilinmemekle birlikte EGCg'in bakterilerin sitoplazmik membranına zarar verdiği görülmüştür. Ayrıca EGCg'in başta *S. mutans* olmak üzere, dental plak bakterilerinin asit üretimini inhibe ettiği ve bu yolla antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (7). Çayın yapısında bulunan fitokimyasallar oksidasyon sürecine oldukça duyarlıdır (54).

Yeşil çayda bulunan biyoaktif bileşenler, çürük oluşumunun farklı aşamalarında etkili olmaktadır. Streptokoklara çoğalma aşamasında etki ederek gelişimini engellediği, diş minesine tutunmayı önlediği, glikozil transferaz ve amilaz enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir (55). Taylor ve ark. yaptıkları çalışmada yeşil çaydan ekstrakte edilen kateşin karışımının *S. mutans*'in tükürük kaplı hidroksiapatit disklerin yüzeyine

tutunmasını engellediğini göstermişlerdir. Kateşinler bakterilerin hücre yüzeylerindeki fimbriyumları ve fibrilleri denatüre ederek bakterilerin yüzeye tutunmalarını önlemektedirler. Glikozil transferaz sakkarozu suda çözünebilir ve çözünemeyen glukanlara parçalamakta ve çürük patogenezinin temelinde yer almaktadır. Glukanlar biyofilm yapısının en önemli bileşenlerinden biri olan EPS'nin yapısına katılırlar. Hayvan denemelerinde, glikozil transferaz enziminin bulunmadığı *S. mutans* mutantlarının karyojenik olmadığı, kateşinin bu enzimi inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (53) , (56). Rasheed ve ark. yaptıkları çalışmada kateşinin *S. mutans* ve *Streptococcus sobrinus* için minimum inhibisyon konsantrasyon değerinin 50 ve 1000 µg/mL arasında olduğunu belirtmişlerdir (57).

**Siyah çay gibi tamamen fermente olmuş çaylar, yeşil çaydan daha az antibakteriyel etkiye sahiptir.** Bunun nedeni, oksidatif fermentasyon sırasında, yeşil çayda bulunan polifenollerin, özellikle kateşinlerin, teaflavin ve tearubine dönüşmesidir. Bu bileşikler bakterilerin dental plâğa tutunmasını önleyerek biyofilmin oluşmasını engellerler, fakat antibakteriyel etki göstermezler (58).

Tükürükte bulunan amilaz nişastayı parçalar. Bunun sonucunda maltoz ve diğer düşük molekül ağırlıklı şekerler ortaya çıkar. Diş çürüğü oluşumunda, dental plak bakterilerinin bu şekerleri kullanarak asit üretmeleri önemli bir faktördür. Siyah çayda bulunan teaflavin amilazı inhibe eder. Amilaz aktivitesinin durması, asit üretimine doğrudan etki ettiğinden, siyah çayın diş çürüğü oluşumuna engel olduğu görülmektedir (7).

Florür uzun yıllardan beri çürük önleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Diş macunu ve ağız yıkama suyu gibi bir çok üründe bulunmaktadır. Ayrıca içme sularına florür eklenmesi de yaygın bir uygulamadır. Florürün çürük önleyici etkisi, dişin sert dokularını koruması ve bakteri gelişimini inhibe etmesi ile gerçekleşmektedir (59). Alturfan ve ark. yaptıkları çalışmada Türkiye'de yetiştirilen siyah çaylarda, 5 dakikalık bir demleme süresinin ardından 0,57-3,72 mg/L aralığında florür bulunduğunu tespit etmişlerdir (60). Ayrıca, 0.02 ppm gibi düşük konsantrasyondaki florürün, diş minesini koruduğu bilinmektedir (59).

**Zencefil (*Zingiber officinale*)** kök yumruları baharat ve ilaç olarak kullanılan çok yıllık bir bitkidir. Epigastrik ağrılar, mide bulantısı ve kusma, ishal, zayıf nabız, nefes darlığı,

öksürük ve balgam üretimi gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (61). İçeriğinde bulunan gingerol, paradol, shogaol ve zingeron gibi fenolik bileşiklerin antioksidan, antibakteriyel ve antikarsinojenik etkilerinin olduğu bilinmektedir (11).

Zencefil yağının kimyasal bileşimi ve antimikrobiyal etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, zingiberen (%5,88) ve gingerol (%10,86) gibi bileşenlerin zencefilde çok miktarda bulunduğu ve *Shigella*, *Enteococcus hirae* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (62).

Zencefilin, oral bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon ve minimum letal konsantrasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, etken maddelerin en iyi etanol ekstraksiyonu ile elde edildiği belirtilmiştir. Zencefilin etanol kullanılarak elde edilen ekstraktının, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'un gelişimi üzerinde etkili olduğu, zencefilde bulunan gingerol, shogaol, zingeron gibi maddelerin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve bu bakterilerin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (61). Başka bir çalışmada, zencefil ekstraktının *S. mutans* üzerindeki inhibisyon etkisi, kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmış ve  $11,7 \pm 0,6$  mm inhibisyon zonunun olduğu görülmüştür (63).

Hasan ve ark. yaptıkları çalışmada zencefilin ham ekstraktının ve metanol ekstraktının, *S. mutans* virülansına ve çürük oluşumuna karşı inhibisyon etkilerini in vivo ve in vitro olarak araştırmışlardır. İn vitro çalışmalarında, metanol ekstraktı ve ham ekstraktın her ikisi için MIC değerinin  $256 \mu\text{g/mL}$  olduğunu göstermişlerdir. *S. mutans* ile infekte olmuş sıçanlar ile yapılan in vivo çalışmada ise, metanol ekstraktı ve ham ekstrakt ile muamele edilmiş sıçanlarda önemli ölçüde daha az çürük oluştuğu, ham ekstraktın metanol ekstraktından daha etkili olduğu tespit edilmiştir (64).

**Tarçın (*Cinnamon zeylanicum*)** insanlık tarihi boyunca, hem sağlık alanında hem de mutfakta sıkça kullanılan, en eski baharatlardan birisidir. Tıpta diyabet, iltihaplanma, gastrointestinal ve üriner rahatsızlıkların tedavisinde ayrıca Çin'de çok eski zamanlardan beri nöron koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır. Ayurvedik tıbbın en önemli bileşenlerinden biri olan tarçının, günümüzde kozmetik ve gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. 16. yy'da Portekizli kaşifler tarçın ile Sri Lanka seferleri sırasında tanışmışlar ve Avrupa'ya bu yeni baharatı götürmüşlerdir. 300'den fazla türü

bulunan tarçının, ekonomik açıdan değerli olan dört türü *Cinnamon zeylanicum*, *Cinnamon loureiroi*, *Cinnamon burmanni* ve *Cinnamon aromaticum*'dur.

Yapısında bulunan vanilik, kafeik, gallik, protokateşuik, p-kumarik ve ferulik asit gibi fenolik bileşikler sayesinde güçlü bir antibakteriyel etkiye sahiptir. Tüm bu özelliklerinin yanında sitotoksik etkisinin olmaması, tarçını vazgeçilmez bir gıda yapmaktadır (12). Ayrıca tarçının kabuk yağında bulunan sinnamik aldehit ve ogenolün güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (65).

Tarçının antimikrobiyal özellikleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Inouye ve ark. yaptıkları bir çalışmada bitkilerden elde edilen esansiyel yağların antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır ve tarçın kabuk yağından elde edilen sinnamaldehitin *Haemophilus influenza*, *S. aureus*, *E. coli* ve bazı streptokok türleri üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (66). Keskin ve Toroğlu'nun yaptıkları çalışmada tarçın kabuk ekstraktının *Klebsiella pneumonia* 13883, *Bacillus megaterium* NRS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, *S. aureus* 6538 P, *E. coli* ATCC 8739, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Corynebacterium xerosis* UC 9165, *Streptococcus faecalis* DC 74 üzerindeki etkisi disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Deneylerin sonucunda 30 µL ekstrakt uygulaması sonucunda 7 ile 18 mm arasında inhibisyon zonu olduğu gözlemlenmiştir (67). Bu veriler tarçının yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ağız ve diş sağlığı ile ilgili yapılan bir çalışmada da tarçın esansiyel yağının *S. mutans*'ın gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (12).

**Adaçayı (*Salvia officinalis*)** ballıbabagiller familyasına dahil olan, ülkemizde yaygın olarak yetişen, değerli bir bitkidir. Yaklaşık 900 türü bulunmaktadır. Antik zamanlardan beri ateş, romatizma, cinsel sorunlar ve dengesiz zihin/sinir durumlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda bazı adaçayı türlerinin antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar, antikolinesteraz ve antikanser etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (68).

Tıbbi amaçlı kullanılan adaçayının yaprakları ve çiçekleri ekonomik açıdan değerlidir (69). Adaçayı içerisinde bulunan karnasol ve karnasoik asit gibi fenolik bileşenlerin antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir (9). Ayrıca adaçayında bulunan diterpenlerden mananolün antibakteriyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Mannol ekstraktının ve adaçayı

ekstraktının, *S. mutans*'ın gelişimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, MIC değerinin sırası ile 6,24 µg/mL ve 15,68 µg/mL olduğu tespit edilmiştir (10).

Güney Afrika'da yetişen üç adaçayı türü (*Salvia stenophylla*, *Salvia repens* ve *Salvia runcinata*) ile yapılan bir çalışmada, bu üç türün antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterdiği kaydedilmiştir. *Salvia stenophylla* türünden metanol ekstraksiyonu ile elde edilen esansiyel yağın *S. aureus* ve *Bacillus cereus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı yüksek, Gram negatif bakterilere karşı ise düşük antibakteriyel etki gösterdiği kaydedilmiştir (68). Dental plak oluşumuna katılan bakterilere karşı bitki ekstraktlarının inhibisyon etkilerinin incelendiği bir çalışmada, adaçayı ekstraktının *P.gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* ve *Candida albicans* gibi mikroorganizmalar için antimikrobiyal etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (70).

*S. officinalis* türünden edilen ekstraktın ağız çalkalama suyu içerisinde kullanımının araştırıldığı klinik bir çalışmada, aynı düzeyde sosyo-ekonomik koşullara ve ağız hijyenine sahip 11-14 yaş aralığındaki 70 kız çocuğunun, diş yüzeylerinde oluşan plaktaki *S. mutans* koloni sayısı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda adaçayı içeren ağız çalkalama suyunun dental plaktaki *S. mutans* sayısını azalttığı görülmüştür. Ağız çalkalama suyu uygulaması öncesinde, başlangıçtaki plak örneğinde bulunan *S. mutans* sayısı  $3,9 \times 10^3$  kob/mL iken, uygulama sonrasında sayısı  $6 \times 10^2$  kob/mL olarak sayılmıştır (71).

**Ihlamur (*Tilia cordata*)** yaprakları ve çiçekleri sedatif, diüretik ve diyaforetik etkilerinden dolayı, soğuk algınlığı ve grip gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı yaygın olan bir bitkidir (72). Fitokimyasal çalışmalar ihlamur türlerinin hidrokarbon, ester, alifatik asit, polifenol ve terpenoidleri sentezlediğini göstermiştir (73). Ihlamurda bulunan farnesol (asiklik seskiterpen alkol) biyofilm oluşumunu engelleyen ve oluşmuş biyofilm yapılarını tahrip edici özelliğe sahip bir maddedir. Farnesolün *C. albicans*, *S. mutans* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarını engellemekte ya da azalttığı bilinmektedir (13).

Bitki ekstraktlarının ağız sağlığı ürünlerinde kullanımı ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bitkisel iki diş macununun etkilerinin incelendiği bir çalışmada, her iki diş macununun da dental plak oluşumunu azalttığı ve diş eti iltihabı oluşumunu engellediği saptanmıştır (74). Bir başka çalışmada ise, içeriğinde tarçın, yasemin, zerdeçal ve sandal

ağacı bir çok bitkinin bulunduğu bir diş macununun, diş eti kanamalarını engellediği ve tükürükte bulunan *S. mutans* sayısını azalttığı kaydedilmiştir (75).

## **2.5. GÜNÜMÜZDE KULLANILAN DOLGU MATERYALLERİ VE DENTAL PLAK OLUŞUMUNDAKİ ROLLERİ**

Diş çürüklerinin tedavisi, günümüzde klinik diş hekimliğinin odak noktasıdır (76). Diş çürüğü oluşumunu engelleyecek koruyucu önlemlerin alınmaması durumunda çürükler ile karşı karşıya kalmak kaçınılmazdır. Diş çürüğünün geri döndürülemez düzeyde oluşumunun ardından en sık kullanılan tedavi, çürük bölgenin temizlenmesinin ardından, dişin şeklini ve fonksiyonunu eski haline getirecek şekilde bir restoratif materyal ile doldurulmasıdır. Restoratif materyal ile tedavinin ardından da diş çürüğü oluşumunun (ikincil çürüklerin) görülme oranı çok yüksektir (77). İkincil çürüklerin oluşum sebebi, kavite duvarı ile dolgu materyali arasında boşluk oluşması ve restorasyon ara yüzeyine bakterilerin kontamine olmasıdır. Dolgu materyalleri ve bileşimlerinde bulunan maddeler çeşitlilik göstermektedir ve her geçen gün yeni materyaller geliştirilmektedir. Diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların ana nedeni olan dental biyofilmler yalnızca dişin sert ve yumuşak dokularında değil aynı zamanda ağız boşluğundaki kavitelerin doldurulması ve onarılması için kullanılan biyo materyallerin yüzeyinde de oluşmaktadır. Bu oluşum ciddi sağlık problemlerine sebep olabilir. Kompozit rezinler üzerinde oluşan biyofilmler yalnızca materyale zarar vermekle kalmaz aynı zamanda diş ile restorasyon arasındaki bölgeye bakterilerin yerleşmesi ile ikincil çürüklerin oluşmasına sebep olurlar. Sonuç olarak, biyofilm oluşumuna izin vermeyen ve antimikrobiyal ajanlar içeren diş dolgu materyallerine ilgi giderek artmaktadır (78). Bu bölümde kullanımları yaygın olan restoratif materyaller ve denemelerde kullandığımız bulk-fill rezin kompozit irdelenmiştir.

### **2.5.1. AMALGAM**

Amalgam son 150 yıldır, arka dişlerde çürükler sonucu oluşan boşlukların doldurulması için kullanılan bir maddedir. Etkinliği ve düşük maliyeti nedeni ile halen birçok ülkede tercih edilmektedir (79). Amalgam kalay, bakır, gümüş ve civa gibi metallerin karışımından oluşur. Arka dişlerde kullanımı yaygındır ve estetik kaygı bulundurmeyen durumlarda kullanılır. Amalgamın en önemli avantajları uzun ömürlü olması ve uygulama sırasında sağladığı kolaylıktır. Ayrıca dental amalgamlar ikincil çürük oluşumuna diğer

materyallere göre daha az yatkındır. Bunun dışında; termal iletkenliğinin yüksek olması, diş dokularına kimyasal olarak tutunmaması, içeriğinde bulunan civanın insan sağlığı üzerindeki olası etkileri hakkındaki endişeler ve estetik kaygılar nedeni ile kullanımı azalmaktadır (80).

5 günlük bir inkübasyonun ardından, altın ve amalgam gibi metalik restoratif materyallerin yüzeyinde kalın bir biyofilm tabakasını oluşturduğu, buna rağmen plak içerisinde mikroorganizmaların %8'inin canlı kaldığı bildirilmiştir. İn vivo olarak mine üzerindeki plaktaki canlılık oranının %41 ila %56 arasında olduğu göz önünde bulundurulursa, metalik dolgu materyallerinin biyofilm gelişimi için uygun yüzeylere sahip olmadığı söylenebilir. Amalgam yaklaşık olarak %50 civa ve %35 gümüş metallerinden oluşmaktadır. Amalgamın bileşiminde bulunan maddelerin biyofilm yapısına yavaş yavaş sızdığı ve bakteriler için toksik özellik gösterdiği düşünülmektedir (81).

### **2.5.2. CAM İYONOMER SİMANLAR**

Cam iyonomer simanlar (CİS) camla güçlendirilmiş doldurucu partiküllerden ve partikülleri çevreleyen iyon-polimer matriksinden oluşan bir dental materyaldir. İçerdikleri asidik polimerler arasında gerçekleşen asit-baz reaksiyonları ile sertleşirler. Bir poliakrilat jelinin içine gömülmüş orijinal cam parçacıklarından oluşur. CİS'lar diş dokusundaki kalsiyuma bağlanırlar, bu sayede kimyasal bir tutunma gerçekleşir. Florür içerirler ve rezervuar görevi görürler. Bu özelliklerinden dolayı karyojenik etkiye sahiptirler. Bunun dışında CİS'lar zayıf fiziksel özelliklere sahiptir ve aşınıp kırılabilirler. İlk uygulama sırasında neme olan hassasiyetleri fazla, çalışma zamanları kısa, fakat sertleşme zamanları (yaklaşık 24 saat) yüksektir. Ayrıca yüksek oranda mikro sızıntı göstermeleri de olumsuz özellikleri arasında sayılabilir (82). CİS'lar yüksek basınç bölgelerinde kullanılmak için uygun değildir. Fakat servikal, tünel ve iç restorasyonlar için kullanımı idealdir (80).

CİS'larda bulunan florür bakteriler tarafından üretilen asidi nötralize etmek için bir tampon gibi görev görür ve çürük oluşumuna katılan bakterilerin gelişimini baskılar. Bu özelliklerinden dolayı CİS'ların üzerinde ince bir biyofilm tabakası oluşumu gözlenir. Bununla birlikte yapılan in vitro bir çalışmada florür içeren cam iyonomer simanların tükürük kaplı yüzeylerde bakteri gelişimi ve biyofilm oluşumunu azaltmadığı görülmüştür. Bu çalışma biyofilm oluşumunu kontrol etmede florürün tek başına baskın bir faktör

olmadığını, salınan florür konsantrasyonunun yeterli düzeyde bulunmadığını göstermiştir. Ağız boşluğunda bulunan tükürük miktarının etkili florür konsantrasyonunun oluşmasını engellediği düşünülmektedir (81).

### **2.5.3. REZİN MODİFİYE CAM İYONOMER SİMANLAR**

Rezin modifiye cam iyonmer simanlar (RMCİS), CİS'lara rezin monomerlerinin eklenmesi ile elde edilmişlerdir. Geleneksel CİS'larda görülen olumsuzlukların giderilmesi için modifiye edilmişlerdir. Bu simanların polimerizasyonu için asit-baz tepkimelerinin yanı sıra bir ışık kaynağına gereksinim vardır. RMCİS'larda polimerizasyon önce kompozit rezinlerde olduğu gibi görünür ışıkla gerçekleşir. Bu işlemin hemen ardından asit-baz reaksiyonu gerçekleşir. Bu nedenle yapı içerisinde iki tip matriks bulunmaktadır.

Su emilimi ve suda çözünürlük diğer restoratif materyallerde olduğu gibi, CİS'lerinde fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Bununla birlikte ışıkla polimerize edilen RMCİS'lar fotokimyasal reaksiyona bağlı olarak rezin matriksinin meydana gelmesi nedeni ile su emilimi ve suda çözünürlük miktarlarının geleneksel CİS'lerden daha az oldukları bilinmektedir (83). RMCİS'lar kuruma ve hidrasyona karşı CİS'lara karşı daha az duyarlıdır (82).

*S. mutans* ile yapılan bir çalışmada; RMCİS ile konvansiyonel CİS dolgu materyallerinin yüzeyinde bir ay boyunca bakteri inkübe edilmiştir. Her iki dolgu materyalinin yüzey özellikleri incelendiğinde pürüzlülüğünün arttığı ve başlangıçtaki değerin 0,1 µm'den 1µm'ye çıktığı görülmüştür (84).

### **2.5.4. KOMPOMERLER (POLİASİT MODİFİYE REZİN KOMPOZİTLER)**

Son yıllarda cam iyonmer simanların ve kompozit rezinlerin üstün özelliklerinin bir araya getirilmesi ile oluşturulan hibrid iyonmer materyallerdir (82). İsimlendirilmeleri sırasında kompozit kelimesinin ilk beş harfi (compo) ve iyonmer kelimesinin son üç harfi (mer) kullanılmıştır. Hibrit iyonmer materyallerin elde edilebilmesi için CİS'ların likit kısmında değişiklikler yapılmıştır. CİS'ların aksine kompomerlerde su bulunmaz. Uygulanma sırasında tıpkı rezin kompozitlerde olduğu gibi bir ışık kaynağına gereksinim vardır. Daha sonra materyal ağızda bulunan su ile temas ettiğinde CİS'larda olduğu gibi asit-baz reaksiyonu başlar. Bu özellikleri açısından RMCİS'lara, mekanik özellikleri bakımından ise

kompozitlere daha çok benzerler. Esneklik, basınca dayanıklılık ve mikrosertlik özellikleri incelendiğinde, bu özellikleri bakımından RMCİS'lardan daha üstün, kompozitlerden de ise daha alt seviyede olduğu görülmektedir (85).

Kompomerlerden salınan florür miktarı CİS'lara kıyasla daha azdır. Ayrıca CİS'ların aksine, kullanımlarının hemen ardından yoğun bir şekilde salınmazlar. Florür salınımı yavaş ve sürekli (82).

Kompomerin avantajları; kaviteye yerleştirme ve polisaj kolaylığı, üstün estetik özellikleri ve dehisrasyona karşı daha az duyarlı olmasıdır. Bunun yanı sıra, kompomerler hakkında klinik deneyimin sınırlı olması, kompozitler gibi bağlayıcı bir ajan gerektirmesi, lekelenme ve yıpranma gibi dezavantajlar bulunmaktadır (81).

### **2.5.5. KOMPOZİT REZİNLER**

Kompozitler ilk kez 1962 yılında Rafeel Bowen tarafından, insanların diş ile aynı renkte bir dolgu materyali isteklerine yanıt olarak geliştirilmiştir (79). Kompozitler, organik yapı (polimer matriksi), inorganik yapı (doldurucu faz) ve ara bağlayıcılardan oluşmaktadır. Kompozit rezinin organik matrisi bisfenol A glisidil metakrilat (bis-GMA) veya üretan dimetakrilat gibi yüksek moleküler ağırlıklı monomerlerden oluşmaktadır. Bis-GMA yüksek vizkositeye sahiptir; bu nedenle araştırmacılar matris içerisine düşük moleküler ağırlıklı (düşük viskoziteli) trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) monomerlerini ilave etmişlerdir. Bu sayede vizkosite azaltılmış, çapraz bağ miktarı ve sertlik artırılmıştır. Rezinin inorganik yapısında kolloidal silika, baryum silikat, kuartz, çinko silikat, stronsiyum/borosilikat cam veya lityum alüminyum silikat gibi moleküller kullanılmaktadır (78). İnorganik fazda bulunan bileşenler polimerizasyon büzülmesinin ve termal genleşme katsayısının azaltılmasına katkı sağlar. Organik matriks ile inorganik yapı arasında bağlanmayı sağlayanlar ise ara bağlayıcılardır. Bu iki yapı arasındaki bağlanma ne kadar iyi olursa kompozitin mekanik özellikleri de o kadar iyi olacaktır.

Kompozit rezinler diş hekimliğinde kullanımı en yaygın olan restoratif materyaldir. Fakat restorasyonların %70'i başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (86). Kompozit rezinlerin biyolojik

olarak parçalanması ile ilişkili olan yüksek kırılma oranı, kullanım süresinin kısıtlılığı ve ikincil çürük oluşumu bu başarısızlığın en temel sebepleridir (87).

Kompozitlerin yüzeyinde diğer materyallere göre daha fazla plak birikimi gerçekleşmektedir. Bunun nedeni kompozitin yüzeyinin homojen olmamasıdır. Bu durum kompozit uygulamasının ardından tekrarlayan çürüklerin nedeni olabilir. İkincil çürükler çoğunlukla, restoratif materyal ile dişteki oyuk arasında oluşurlar. Dişler fermente edilebilir karbonhidratların ve bu karbonhidratları kullanan *S. mutans* gibi bakterilerin varlığında gerçekleşen pH düşüşünün ardından demineralize olmaya başlar. Bu nedenle antibakteriyel/antibakterisidal materyallerin kullanımı ikincil çürüklerin oluşumunu engelleyebilir (77).

Genel olarak piyasadaki kompozit rezinler antibakteriyel özelliğe sahip değildir. Kompozitlerin içeriğinde bulunan etilen glikol dimetilakrilat ve trietilenglikol dimetakrilatın salınımı ile *S. sobrinus* ve *Lactobacillus acidophilus* gibi karyojenik bakterilerin gelişimine katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (88).

Rezin kompozitin bileşimindeki farklılıklar biyofilm oluşumu üzerinde etkilidir. Rezin kompozitin yüzeyindeki pürüzlülüğü gidermek için uygulanan polisaj işlemi bakterinin kompozit yüzeyine tutunmasını zorlaştırır. Polisaj yapılmamış rezin kompozit üzerinde biyofilm oluşumunun incelendiği bir çalışmada, *S. mutans* polisaj yapılmış ve yapılmamış kompozitler üzerinde 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda polisaj yapılmamış kompozit yüzeyinde canlı biyofilm biyokütlesinin daha fazla olduğu saptanmıştır (89).

#### **2.5.5.1. Bulk Fill Kompozit Rezinler**

Kompozit rezinlerin en büyük eksikliği polimerizasyon büzülmesi sonucu restoratif materyal ile kavite arasında boşluk oluşmasıdır. Geleneksel rezin kompozitler kavite ile materyal ara yüzünde oluşan polimerizasyon büzülmesi nedeni ile maksimum 2 mm kalınlığında uygulanmaktadır. Bu durum tedavi sırasında hem zaman kaybına hem de uygulanan kompozit tabakaların arasında hava kabarcığı oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle dolgu oranları ve dolgu maddesi parçacık şekli veya monomer yapısı ve kimyası değiştirilerek polimerizasyon büzülmesini en aza indirmek için çalışmalar yapılmıştır.

Bulk fill kompozit rezinler bu çalışmalar sonucu piyasaya sürülmüştür (90). Bulk fill kompozit rezinler, içeriklerinde bulunan ışık geçişine izin veren modifiye rezinler sayesinde tek tabaka (4 mm) halinde kaviteye yerleştirilebilirler (91). Bu materyaller isimlerini de kaviteye yerleştirilme tekniğinden almaktadır. Bulk fill kompozit rezinler, uygulama sırasında sağladığı kolaylık sayesinde geleneksel kompozitlerin aksine arka dişlerde de kullanılabilir (92).

Restoratif materyallerin yüzey dokusu ikincil rklerin oluşumu açısından önemlidir. Bakteriler yüzey pürüzlülüğü yüksek materyallere kolayca tutunup, biyofilm oluştururlar. Ağız içerisinde bulunan pürüzlü yüzeyler bakterileri kayma gerilimi ve tükürük akışından korur. Ağartma işleminin bulk fill kompozit rezin üzerinde biyofilm oluşumuna etkilerinin incelendiği bir çalışmada, ağartılan yüzeylerin pürüzlülüğünün dolayısı ile biyofilm oluşumunun arttığı görülmüştür (93).

Bulk fill kompozit rezinler, uygulanmaları sırasında sağladıkları kolaylık ve diğer kompozit rezinlere kıyasla sahip oldukları düşük büzülme stresi sebebi ile diş tedavilerinde sıklıkla kullanılan bir dolgu materyal haline gelmiş ve bu sebeple de tez çalışması kapsamında kullanımı tercih edilmiştir.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Dental plak, ağız boşluğunda görülen bir biyofilm yapısıdır. Bu yapı, en sık karşılaşılan oral enfeksiyonlardan olan diş çürüğü ve diş eti hastalıklarının en temel sebebidir (94). Ülkemizde ve dünyada, ağız ve diş sağlığı ile ilgili problemler, en önemli halk sağlığı sorunları içerisinde yer almaktadır. Tedaviye geç kalınması durumunda diş kaybının gerçekleşme ihtimali yüksektir. Diş hastalıklarının tedavisinin ülke ekonomisine olan zararı ve diş kayıpları göz önünde bulundurulduğunda, diğer tüm sağlık problemlerinde olduğu gibi ağız ve diş hastalıklarında da tedaviden ziyade koruyucu önlemlerin alınması elzemdir.

Tükettiğimiz gıdalar hem diş çürüğü oluşumunu destekleyici hem de inhibe edici özelliğe sahip olabilirler. Başta sakkaroz olmak üzere karbonhidratların bazılarının diş çürüklerine neden olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Dental biyofilm oluşumunu engelleyen gıdaların tüketiminin artırılması ile diş çürüğü oluşumunun engellenebileceği öngörülmektedir.

Bu tezin amacı dişlerde dental plak oluşumundan sorumlu bazı bakterilerin gelişim koşullarının belirlenmesi ve dental plak oluşturma düzeylerinin saptanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, dişlerde dental plak oluşturduğu bilinen ve ağız boşluğundan izole edilmiş dokuz adet bakteri suşu ve standart olarak seçilen *S. mutans* ATCC 25175 bakterisinin Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’de hazırlanan diş dolgu materyali bulk-fill kompozit rezin üzerinde biyofilm oluşturma için gerekli koşullar sağlanmıştır. Daha sonraki aşamada dolgu materyali üzerinde tutunan bakteriler izole edilip, katı besi yerine ekim yapıldıktan sonra sayıları (kob/mm<sup>2</sup>) tespit edilmiştir. Bunun yanısıra bakterilerin sıcaklık ve pH koşulları gibi gelişme koşulları değiştiğinde biyofilm üretim düzeylerindeki değişim de incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise dental plak oluşturan bakterilerin gelişimleri üzerinde bazı bitki ekstraktlarının etkileri araştırılmıştır. Son dönemde bitki ekstraktları ve onların antimikrobiyal etkisi üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır. Çalışmamızda günlük diyetimizde sıkça tükettiğimiz siyah çay, yeşil çay, ıhlamur, zencefil, tarçın ve adaçayından elde edilen ekstraktların dental plak oluşumdan sorumlu bakteriler üzerindeki

inhibisyon etkisi incelenmiştir. Bitkilerde oldukça fazla miktarda antimikrobiyal etkiye sahip bileşen bulunmaktadır. Bunlar arasında en etkili olanları ise polifenollerdir (95). Denemelerimizde su ve etanol kullanılarak iki farklı toplam polifenol ekstraksiyonu yapılmıştır. Günlük diyetle bitki çayları sıcak su içerisinde demlenerek tüketilmektedir. Dolayısıyla dental plak oluşumunda yer alan bakteri inhibisyonunun tespitinde kullanılacak ekstraktın da bu yolla elde edilmesi gerekmektedir. Fakat elde edilen sonuçlar doğrultusunda diş macunu, ağız çalkalama solüsyonu için bir materyal önermek adına, polifenol ekstraksiyonunda daha etkin bir yol olan alkol ile ekstraksiyon aşaması da çalışmaya dahil edilmiştir. Alkol ekstraksiyonunda literatürde bitki ekstraksiyonu için sıkça tercih edilen metanolün aksine etanolün tercihi çevre dostu olması da göz önüne alınmıştır.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

Tez kapsamında daha önce dişlerden izole edilmiş fakat tanımlanmamış olan ve biyofilm ürettiği belirlenen (Altuntas 2013) dokuz adet bakteri suşu materyal olarak kullanılmıştır (96). Ayrıca standart suş olarak *S. mutans* ATCC 25175 denemelere dahil edilmiştir. Çalışmada biyofilm oluşumu deneylerinde kullanılan düşük büzülmeli bulk-fill rezin restoratif dolgu materyali 4 mm çapı ve 2 mm yüksekliğinde olacak şekilde Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Birimi tarafından steril olarak üretilmiştir. Bakteriler ve dolgu materyali dışında denemelerde kullanılan diğer materyallere, yöntem başlığı altında ilgili kısımlarda değinilmiştir.

### 4.2. YÖNTEM

#### 4.2.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Bu denemede 4 mm çapında ve 2 mm derinliğinde (Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde Dr.Dt. Gülbike Demirel tarafından hazırlanan) boyutları olan bulk fill dolgu diskleri kullanılmıştır. Biyofilm oluşumunun tespiti aşamasında, daha önce yapılan bir çalışmadan elde edilen ve dişlerde biyofilm oluşturan 1'i standart suş (*S. mutans* ATCC 25175) olmak üzere 10 adet suş kullanılmıştır. Kültürlerin aktivasyonu için Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, ABD) genel besiyeri tercih edilmiştir. Stok kültürler (%15 gliserol içeren besiyerinde bulunan ve -20 °C'de saklanan) iki pasaj halinde TSB besiyeri kullanılarak %1 inokülasyon oranı ile aktifleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Biyofilm üretme yeteneğinde olan suşların aktif kültürleri, konsantrasyonları  $O.D_{600}=0.4$ 'e ayarlandıktan sonra, 1 mL miktarında 24 kuyucuklu plakaya ekim yapılmıştır. Kuyulara hazırlanan dolgu diskleri de eklendikten sonra plakalar 37°C'de 24 saat statik koşullar altında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, dolgu diskleri yüzeyine tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla, steril su (1 mL) ile yıkanmış ve ardından disklere tutunan bakterilerin sayımı amacıyla 1mL fosfatlanmış tuz tamponu (PBS) içeren

tüplere aktarılarak karıştırılmıştır (Velp Scientifica, 40 hertz). Bakteri içeren PBS örneğinden bir seri dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan TSB agar besiyerine damlatma yöntemi ile 10 µL ekim yapılmış ve 37°C de 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak dolgu disk yüzeyinde tutunan/biyofilm oluşturan bakteri sayısı (kob/mm<sup>2</sup>) aşağıda belirtilen formül kullanılarak tespit edilmiştir (97).

$$N = C / [ V \times ( n_1 + 0,1 \times n_2 ) \times d ]$$

N: Örneğin 1 g ya da 1 mL’inde bulunan mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V: Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (mL)

n<sub>1</sub>: İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

n<sub>2</sub>: İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranı

Dolgu diski yüzey alanı; materyal silindir şeklinde olduğundan dolayı silindirin yüzey alan formülü ile hesaplanmış ve denemelerde kullanılmıştır. Dolgu diskinin yarıçapı ve yüksekliği 2 mm’dir. Silindirin yüzey alanı formülü aşağıda verilmiştir. Hesaplamalarda π 3 olarak alınmıştır.

$$A = 2\pi r^2 + 2\pi r.h$$

$$A = 2.3.4 + 2.3.2.2$$

$$A = 48 \text{ mm}^2$$

#### **4.2.2. FARKLI SICAKLIK VE PH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Ağız içi sıcaklık ve pH değerlerinin farklı koşullar altında değişimlerinin incelendiği bir çalışmada pH’nın gün içerisinde 7,3 (±0,4), uyku halinde iken 7,0 (±0,5) ve uyurken ağızdan nefes alınması durumunda ise 6,6 (±0,5) olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada sıcaklık değerleri ise gün içerisinde 33,1 (±5,2), uyku halinde iken 33,3 (±6,1) olduğu belirtilmiştir (98). *S. mutans* ve oral florada bulunan bakterilerin 30°C ile 47°C sıcaklık değerleri arasında canlılığını koruduğu ve optimum gelişme sıcaklığının 37°C olduğu bilinmektedir (99). Çalışmamızda bu veriler referans alınarak sıcaklık değerleri olarak 33 ve 37°C, pH değerleri olarak ise 6,5 ve 7,2 olarak belirlenmiştir.

Bakterilerin diş dolgu materyali üzerinde farklı sıcaklık ve pH değerlerinde biyofilm oluşturma potansiyeli, izelge 4.1’de belirtilen koşullarda incelenmiştir.

Çizelge 4.1. Dolgu materyali yüzeyinde bakterilerin biyofilm üretimlerinin araştırıldığı sıcaklık ve pH koşulları

Sıcaklık	pH
33°C	6,5
33°C	7,2
37°C	6,5
37°C	7,2

#### 4.2.3. BİTKİ ESKTRAKTLARININ ELDESİ

##### Sıcak Su ile Bitkilerden Polifenol Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılacak bitkilerden ekstraksiyon işleminin Kim ve ark. tarafından önerilen yönteme göre sıcak su ile gerçekleştirilmesi planlanmıştır (100). Günlük hayatta insanların bitki aylarının tüketim şekli göz önüne alınarak bu yol tercih edilmiştir. Yönteme göre piyasadan temin edilen (Ankara ilinde bulunan aktarlardan) siyah çay, yeşil çay, ıhlamur, tarçın, zencefil örnekleri 4 g miktarında tartılmış ve 40 mL su içerisine aktarılmıştır. Örnekler 85-95°C sıcaklığında su banyosu içerisinde 3 saat boyunca bekletilmış ve düzenli aralıklarla (15 dakikada bir) alkalanmıştır. İnfüzyonun ardından ekstraktlar filtre kağıdı (Whatman, 125 mm) kullanılarak filtre edilmiştir. Ekstraksiyon aşamasında düşük sıcaklık kullanılmasının amacı, daha doğal bir içerik oluşturulmasının sağlanmasıdır.

##### Etanol ile Bitkilerden Polifenol Ekstraksiyonu

Su ile ekstraksiyon yöntemi ile kıyas yapabilmek adına ve daha yüksek inhibisyon etkisi gözlenme ihtimali nedeniyle Babu ve ark.’nın önerdiği şekilde etanol ile ekstraksiyon yöntemi de çalışmaya dahil edilmiştir (101). Yöntemde araştırmacıların belirttiği gibi 4 g bitki rneği, 40 mL etanol içerisinde 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu aşamada ısıtma işlemi uygulanmamıştır. Bu işlemin ardından Whatman filtre kağıdı

(125 mm) kullanılarak bitki kalıntıları sıvı fazdan ayrılmıştır. Ayrılan bitki kalıntılarının üzerine 40 mL etanol eklenerek yukarıda belirtilen işlemler tekrarlanmıştır. Elde edilen sıvı fazda bulunan etanol, Büchi Rotavapor R-200 evaporatörü kullanılarak (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı) uzaklaştırılmıştır.

#### **4.2.4. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN TESPİTİ**

Antimikrobiyal aktivite denemelerinde agar spot yöntemi ve kuyu difüzyon yöntemleri kullanılmıştır (102). Agar spot yönteminde; daha önceden hazırlanmış Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) içeren petrilere 100 µL aktif kültür içeren 8 mL yumuşak agar (% 0.75 agar içeren TSB) yayıldıktan sonra petrilere oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda bitki ekstraktlarından 10 µL hacminde olacak şekilde petrilere damlatılmış ve 37°C’de 24 saatlik inkübasyonun ardından inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.

Kuyu difüzyon yönteminde ise TSA içeren petrilere 100 µL aktif kültür içeren 8 mL yumuşak agar (% 0.75 agar içeren TSB) yayıldıktan sonra petrilere oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda petrilere 5 mm çapında kuyucuklar açılmış ve açılan kuyucuklara bitki ekstraktlarından 50 µL eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyonun ardından inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.

Bu deneme her bitki ekstraktı için en az iki kez tekrarlanmıştır.

#### **4.2.5. BAKTERİ SUŞLARININ TANIMLANMASI**

##### **4.2.5.1. Genomik DNA İzolasyonu**

Genomik DNA izolasyonu için, bakteriler 4.2.1’de anlatıldığı şekilde aktive edilmiştir. Bakteriyel genomik DNA izolasyonu amacıyla ticari olarak temin edilen izolasyon kiti (Qiagen DNeasy Blood&Tissue kit, ABD) kullanım kılavuzunda önerildiği şekilde kullanılmıştır. Kitin uygulama prosedürü aşağıda görülmektedir.

##### Gram pozitif bakterilerden DNA izolasyon protokolü:

1. Aktif kültürden 1 mL (max  $2 \times 10^9$  hücre) mikrosantrifüj tüpüne alınır, 5000 x g’de 10 dakika santrifüj uygulanır.

2. Bakteri peleti 180 µL enzimatik liziz buffer ile çözülür.
  3. 37 °C'de minimum 30 dakika inkübe edilir.
  4. 25 µL proteinaz K eklenir, 200 µL Buffer AL (alkol eklenmemiş) eklenir, vortekslenir.
  5. 56 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
  6. 200 µL etanol (%96-100'lük) eklenir, vortekslenir.
  7. Örnek DNeasy mini spin kolona aktarılır (2 mL collection tube içinde)
  8. 6000 x g'de 1 dakika santrifüj uygulanır.
  9. DNeasy mini spin kolon yeni bir tüpe yerleştirilir, 500 µL Buffer AW2 eklenir, 20000 x g'de 3 dakika santrifüjlenir.
  10. DNeasy mini spin kolonu temiz bir 1.5 ya da 2.0 mL'lik tüpe aktarılır. 200 µL Buffer AE eklenir, oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir.
  11. 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir.
- \*10. ve 11. aşamalar ikinci kez tekrarlanabilir.

#### **Enzimatik Liziz Tamponu:**

- 20 mM Tris-Cl (pH:8.0)
- 2 mM sodyum EDTA
- 1.2 % Triton X-100
- Lizozim (20 mg/mL olacak şekilde hazırlanır)

#### **4.2.5.2. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

Genomik DNA izolasyonunun ardından DNA miktarının tespiti amacıyla nanodrop (ND-1000) kullanılarak miktar ve saflık tayini gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.5.3. 16S rRNA PCR Reaksiyonu**

16S rRNA PCR çalışması aşamasının optimizasyonu için farklı yöntemler denenmiştir. Uygulanan protokolda MgCl<sub>2</sub>'ün farklı konsantrasyonları (1,5 mM, 2,5 mM, 3,5mM), primerin bağlanma sıcaklığı (Tm) değeri için farklı sıcaklık değerleri denenmiş, gradient PCR ve Touch Down PCR yöntemleri ile başarılı sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır. Optimize edilen ve çalışmada örnekler için kullanılan protokol Çizelge 4.2 ve 4.3'te yer almaktadır. Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler ise Çizelge 4.4'te görülmektedir.

Çizelge 4.2. 16S rRNA Touch-Down PCR aşamasında uygulanan koşullar

	Sıcaklık	Süre	Aşama
	94 °C	3 dakika	Denatürasyon
21 döngü	94 °C	1 dakika	Denatürasyon
	66°C'den 57 °C'ye	1 dakika 45 saniye	Bağlanma
	72 °C	2 dakika	Uzama
	72 °C	10 dakika	Uzama
	10 °C	Forever	

Çizelge 4.3. 16S rRNA PCR aşamasında hazırlanan PCR karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

	PCR karışımına eklenen hacim (µL)		
	6,2	7,2	8,2
Nükleaz içermeyen su	6,2	7,2	8,2
İleri primer (10 pmol)	2	2	2
Geri Primer (10 pmol)	2	2	2
dNTP (0,5 mM)	1	1	1
Taq Buffer (5x)	5	5	5
Taq DNA polymerase (5U)	0.3	0,3	0,3
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,5	2,5	1,5
DNA (200 ng)	5	5	5
Toplam PCR karışımı	25	25	25

Çizelge 4.4. 16S rRNA PCR aşamasında kullanılan primerlere ait baz dizileri ve Tm değerleri

	Baz dizisi	Tm değeri
İleri primer (27F)	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	50.5 °C
Geri primer (907R)	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	50.7 °C

#### 4.2.5.4. 16S rRNA PCR ürünlerinin saflık kontrolü

PCR denemesinin ardından reaksiyonun istenilen düzeyde ve saflıkta gerçekleşip gerçekleşmediği %2'lik agaroz jel görüntüsü ile kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin pürifikasyonu doğrudan jel üzerinden yapıldığı için PCR örneğinin tamamı (20 µL) jele yüklenmiştir. Jel 100 Volt'da 1 saat süresince koşturulduktan sonra Gene Genius Jel Görüntüleme Sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

#### 4.2.5.5. 16S rRNA PCR pürifikasyonu

16S rRNA PCR pürifikasyonunu gerçekleştirmek için Promega Wizard SV Gel ve PCR Pürifikasyon kiti (Madison, ABD) kullanılmıştır. Uygulama prosedürü aşağıda görülmektedir. Daha etkin bir saflaştırma işlemi uygulayabilmek adına pürifikasyon aşaması tüm PCR ürününün agaroz jelde yürütülmesi ve ardından jel üzerinde istenen bant bölgesinin kesilmesi şeklinde uygulanmıştır. Pürifikasyon ürünlerinin konsantrasyon ve saflık analizi için yine 4.2.5.4 kısmında anlatıldığı şekilde %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

#### Jelden Kesme Yöntemi ile PCR pürifikasyonu:

1. Jelde görüntülenen bant bölgesi UV ışık altında kesilip darası alınmış ependorflara aktarılır.

2. Kesilen jel kadar hacimde “membrane binding çözültisi” ependorflara eklenerek 65 °C’ye ayarlanmış termal blokta jel çözüne kadar bekletilir.
3. Ependorf içeriği “Minicolumn”’a aktarılır, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir.
4. 16000 x g’de 1 dakika santrifüj uygulanır.
5. Altaki kısım atıldıktan sonra, 700 µL “Membran Wash” çözültisi eklenir ve 16000 x g’de 1 dakika santrifüj yapılır.
6. Altaki kısım atıldıktan sonra, 500 µL “Membran Wash” çözültisi eklenir ve 16000 x g’de 5 dakika santrifüj yapılır.
7. Altaki kısım atıldıktan sonra, bu kez boş bir şekilde 16000 x g’de 1 dakika santrifüj yapılır.
8. “Minicolumn” temiz bir ependorfa yerleştirilir ve üzerine 50 µL “nuclease free” su eklenir oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir.
9. 16000 x g’de 1 dakika santrifüj uygulandıktan sonra ependorf içeriği (pürifiye PCR ürünü) 4 °C ya da -20 °C’de saklanır.

#### **4.2.5.6. DNA dizi analizi**

Pürifikasyon aşamasından sonra elde edilen pürifiye ürünler yeniden agaroz jelde yürütülerek temiz ve tek bir bant içeren PCR ürünleri tespit edilmiş ve bu ürünler ile sekans analizine devam edilmiştir.

##### **4.2.5.6.1. Sekans PCR Reaksiyonu**

Sekans PCR aşamasında pürifiye edilen ürünlerin nanodrop ölçümleri gerçekleştirilmiş ve ürünlerin konsantrasyonuna göre, 3 farklı çalışma koşulu için örnek miktarı hesaplanmıştır. Her örnek için 3 farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Sekans PCR çalışma koşulları Çizelge 4.5’te görülmektedir.

Çizelge 4.5. Sekans PCR Çalışma Koşulları

1. Koşul	50 ng/μL
2. Koşul	100 ng/μL
3. Koşul	300 ng/μL

Örnekler öncelikle 94 °C’de 3 dakika süresince denatüre edilmiştir. Denatürasyonun ardından GenomeLab Sequencing Kit içerisinde bulunan Start Mix ve 16S rRNA PCR aşamasında da kullanılan Forward ve Reverse primerler (27F ve 907R) 1.6 pmol/μL konsantrasyonda olacak şekilde kullanılmıştır. Çizelge 4.6 ve 4.7’de bu çalışmaya ait detaylar görülmektedir.

Çizelge 4.6. Sekans PCR aşaması için kullanılan karışımdaki bileşen miktarları

	Sekans PCR karışımı için gereken miktarlar	
	2 μL örnek için	3 μL örnek için
Premiks	7 μL	7 μL
1.6 mM primer	2 μL	2 μL
Nükleaz içermeyen su	9 μL	8 μL
Toplam hacim	20 μL	20 μL

Çizelge 4.7. Sekans PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Aşama
34 döngü	96 °C	20 saniye	Denatürasyon
	50 °C	20 saniye	Bağlanma
	60 °C	4 dakika	Uzama
	10 °C	Forever	

#### 4.2.5.6.2. DNA Dizi Analizi PCR Pürifikasyonu

PCR pürifikasyonu için “Agencourt ile manyetik yöntemle pürifikasyon” prensibine göre denemeler gerçekleştirilmiştir.

Bu yönteme göre;

1. Sekans PCR ürünleri (20 µL) ABgene plate'e aktarılır.
2. Her bir kuyuya 20 µL Agencourt (örnek miktarı ile eşit hacimde) ve taze hazırlanmış %85'lik etanol eklenir, pipetaj yapılır.
3. ABgene plate manyetik plate üzerine alınarak 8 dakika beklenir.
4. Süre sonunda kuyudaki etanol pipet ile alınır.
5. Kuyulara yeniden 100 µL etanol eklenir ve yine ABgene plate manyetik plate üzerinde 3 dakika bekletilir.
6. Süre sonunda etanol kuyulardan alınır ve plate kuruması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
7. Kuyulardaki örnekler DNA dizi analizi için kullanılır.

#### **4.2.5.6.3. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizleri Beckman Coulter 8800 cihazı ile Sanger yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (103). Alınan sonuçlar NCBI veritabanına yüklenerek tanımlama aşaması sonuçlandırılmıştır.



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

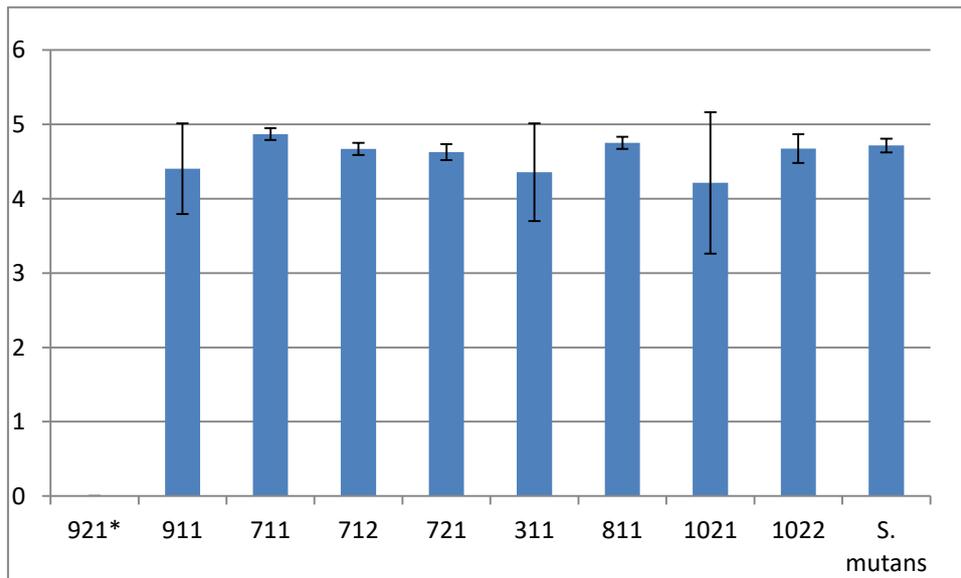
### 5.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

4 mm çapında ve 2 mm derinliğinde hazırlanan bulk-fill dolgu diskleri üzerinde 37°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>) Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. 37°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bakteri No	1. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	2. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	3. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	Standart Sapmalı Ortalama
921*	-	-	-	
911	3,70	4,72	4,79	4,40±0,61
711	4,89	4,78	4,94	4,87±0,08
712	4,63	4,76	4,61	4,67±0,08
721	4,54	4,75	4,59	4,63±0,1
311	4,92	4,52	3,63	4,36±0,65
811	4,75	4,67	4,83	4,75±0,08
1021	3,11	4,81	4,72	4,21±0,95
1022	4,88	4,49	4,65	4,67±0,19
<i>S. mutans</i>	4,65	4,67	4,82	4,71±0,09

\*Bu denemede 921 nolu suş için sonuç elde edilememiştir.



Şekil 5.1. 37°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

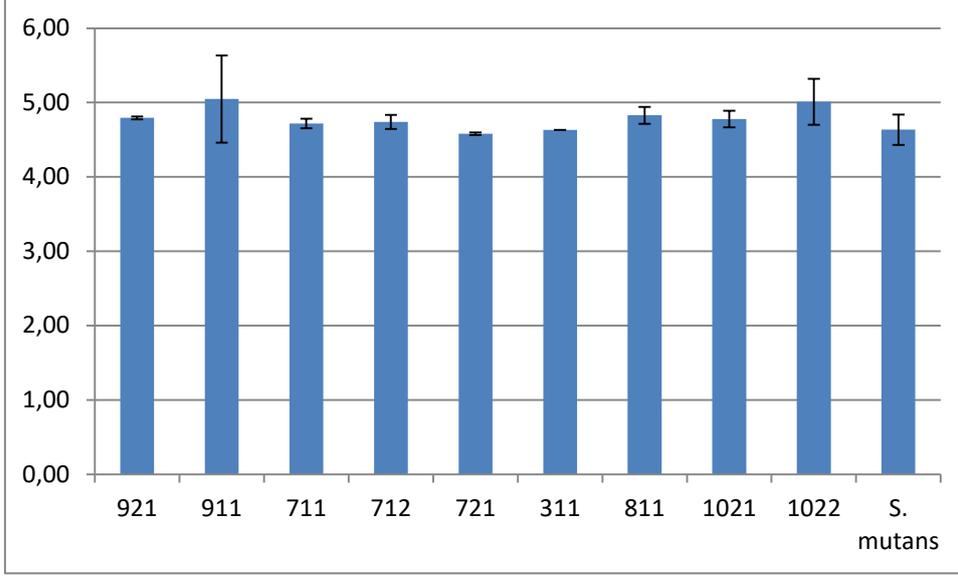
Bu denemeden elde edilen sonuçlara bakıldığında; 921 numaralı suşun 37°C sıcaklık 7,2 pH'da bulk-fill rezin kompozit üzerinde biyofilm oluşturma durumu tespit edilememiştir. Diğer suşlarla kıyaslandığında, 711 numaralı suşun nispeten daha yüksek düzeyde dolgu materyali yüzeyine tutunduğu ve biyofilm oluşturan bakteri sayısının  $7,4 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde olduğu, standart olarak seçilen *S. mutans*'ın ise  $5,2 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde tutunduğu tespit edilmiştir.

## 5.2. FARKLI SICAKLIK VE PH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Tez çalışmasının ilk aşamasında (5.1 nolu başlık) dolgu materyalleri yüzeyine bakterilerin tutunması için 37°C sıcaklık ve 7,2 pH'da 12 kuyucuklu plakalar statik koşullarda inkübe edilmiştir. Materyal ve yöntem kısmında belirtilen pH ve sıcaklık denemelerinden (Çizelge 4.1) geriye kalan koşullara ait sonuçlar ise Çizelge 5.2 (33°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında yapılan deneme), Çizelge 5.3 (37°C sıcaklık ve 6,5 pH koşullarında yapılan deneme) ve Çizelge 5.4'te (33°C sıcaklık ve 6,5 pH koşullarında yapılan deneme) görülmektedir.

Çizelge 5.2. 33°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bakteri No	1. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	2. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	Standart Sapmalı Ortalama
921	4,78	4,81	4,79±0,01
911	4,63	5,46	5,05±0,58
711	4,67	4,76	4,72±0,06
712	4,67	4,81	4,74±0,09
721	4,57	4,59	4,58±0,01
311	4,63	4,63	4,63±0
811	4,91	4,75	4,83±0,11
1021	4,70	4,86	4,78±0,11
1022	4,79	5,23	5,01±0,3
<i>S. mutans</i>	4,49	4,78	4,63±0,2

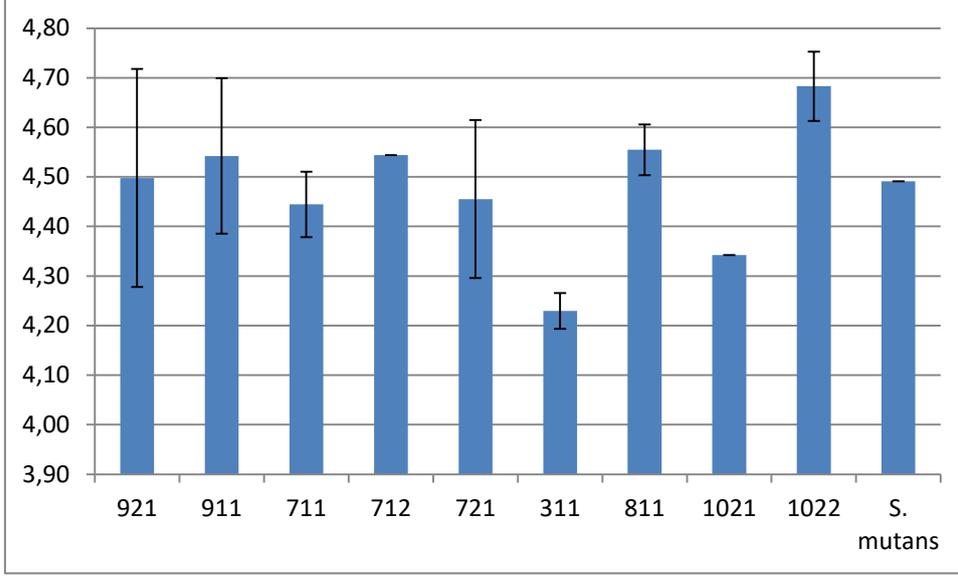


Şekil 5.2. 33°C sıcaklık ve 7,2 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bu denemeden elde edilen sonuçlar incelendiğinde; 911 numaralı suşun bulk-fill kompozit rezin yüzeyinde biyofilm oluşturan bakteri sayısının  $1,6 \times 10^5$  kob/mm<sup>2</sup>, standart olarak seçilen *S. mutans*'ın ise  $4,5 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> olduğu tespit edilmiştir. 721 numaralı suşun, 33°C'de ve 7.2 pH'da dolgu materyali yüzeyinde en az biyofilm oluşturan bakteri olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.3. 37°C sıcaklık ve 6,5 pH'da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bakteri No	1. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	2. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	Standart Sapmalı Ortalama
921	4,34	4,65	4,50±0,21
911	4,65	4,43	4,54±0,15
711	4,40	4,49	4,44±0,06
712	4,54	4,54	4,54±0
721	4,57	4,34	4,46±0,15
311	4,26	4,20	4,23±0,03
811	4,59	4,52	4,55±0,05
1021	4,34	4,34	4,34±0
1022	4,63	4,73	4,68±0,06
<i>S. mutans</i>	4,49	4,49	4,49±0

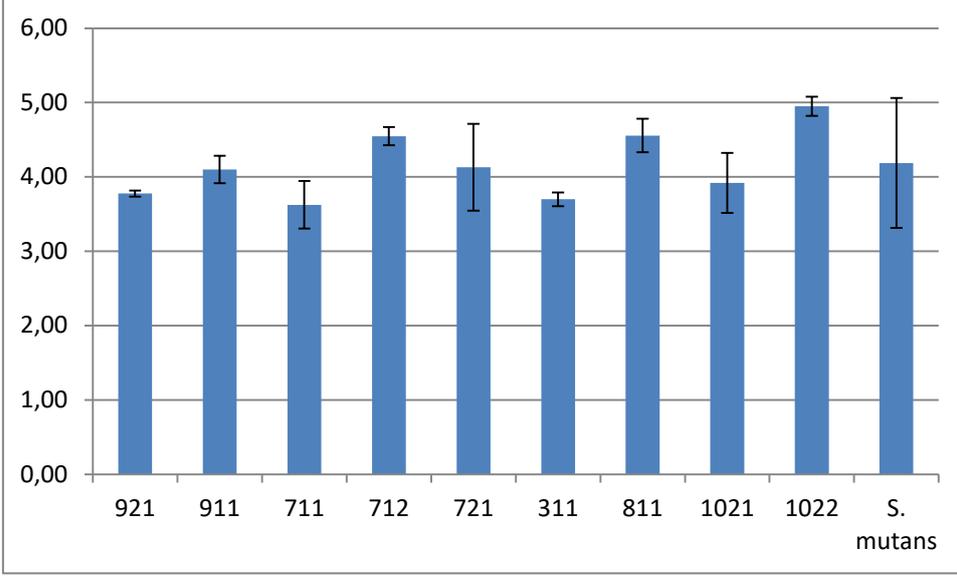


Şekil 5.3. . 37°C sıcaklık ve 6,5 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bu denemeden elde edilen sonuçlar incelendiğinde; 1022 numaralı suşun  $4,8 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde, *S. mutans*’ın ise  $3,1 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde dış yüzeyine tutunduğu saptanmıştır. 311 numaralı suşun ise  $1,7 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> ile çalışılan koşullarda en az biyofilm oluşturan bakteri olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.4. 33°C sıcaklık ve 6,5 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

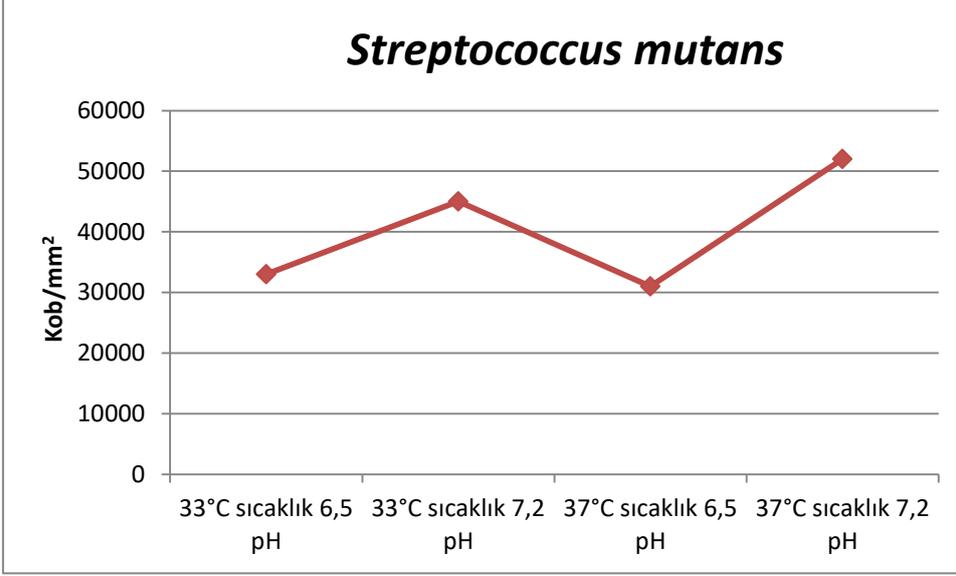
Bakteri No	1. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	2. Deneme Sonucu (log kob/mm <sup>2</sup> )	Standart Sapmalı Ortalama
921	3,81	3,75	3,78±0,04
911	3,97	4,23	4,10±0,18
711	3,85	3,40	3,62±0,31
712	4,46	4,63	4,55±0,12
721	4,54	3,72	4,13±0,58
311	3,63	3,76	3,70±0,09
811	4,40	4,72	4,56±0,22
1021	3,63	4,20	3,92±0,4
1022	4,86	5,04	4,95±0,13
<i>S. mutans</i>	3,57	4,81	4,19±0,87



Şekil 5.4. 33°C sıcaklık ve 6,5 pH’da biyofilm oluşturan bakteri sayıları (log kob/mm<sup>2</sup>)

Bu denemeden elde edilen sonuçlara göre; bulk-fill kompozit rezin yüzeyinde, 1022 numaralı suşun biyofilm oluşturan bakteri sayısı  $9,1 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup>, standart olarak seçilen *S. mutans*’ın bakteri sayısı ise  $3,3 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup>’dir. 711 numaralı suşun dolgu materyali yüzeyinde en az biyofilm oluşturan bakteri olduğu görülmüştür.

Tez çalışmasında standart suş olarak kullanılan *S.mutans* ATCC 25175 bakterisi tüm koşullar dikkate alındığında, dolgu materyali yüzeyine  $3,1 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> ile  $5,2 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında tutunma oranları sergilemiştir. Grafik 5’de de görüldüğü gibi bakterinin 37°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında bulk-fill restoratif dolgu materyaline yüksek düzeyde tutunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.5. *S. mutans*'ın farklı sıcaklık ve pH koşullarında dolgu materyali yüzeyinde biyofilm oluşturan bakteri sayıları (kob/mm<sup>2</sup>)

### 5.3. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTOR ETKİLERİNİN TESPİTİ

#### 5.3.1. SU EKSTRAKSİYONU DENEME SONUÇLARI

Bitki ekstraktlarının eldesinde çözücü olarak su kullanılması durumunda, örneklerin bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisine ait sonuçlar, Çizelge 5.5, 5.6, 5.7 ve 5.8'de verilmiştir. Bu denemede adaçayı ekstraktının ve siyah çay ekstraktının suşlar üzerinde herhangi bir zon çapı oluşturmadığı tespit edilmiş olup, sonuçlar Çizelge ile ifade edilmemiştir.

Çizelge 5.5. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Zencefil		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	0	0
	0	0	0
711	0	0	0
	0	0	0
712	0	0	0
	7	0	3,5±4,95
721	0	0	0
	0	0	0
811	8	0	4±5,66
	7	0	3,5±4,95
911	0	0	0
	0	0	0
921	0	0	0
	0	0	0
1021	0	0	0
	0	0	0
1022	0	0	0
	0	0	0
<i>S. mutans</i>	8	7	7,5±0,71
	0	7	3,5±4,95

Zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde; sadece **712** ve **811** numaralı suşlarda ve *S. mutans* üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Oluşan zon çaplarının 7 - 8 mm aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 5.6. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Yeşil Çay		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	7	0	3,5±4,94
	7	0	3,5±4,95
711	8	0	4±5,65
	9	0	4,5±6,36
712	7	0	3,5±4,95
	0	0	0
721	0	0	0
	10	0	5±7,07
811	0	0	0
	8	0	4±5,65
911	0	8	4±5,66
	0	9	4,5
921	7	0	3,5±4,95
	8	0	4±5,65
1021	8	0	4±5,65
	8	0	4±5,65
1022	8	0	4±5,65
	9	0	4,5±6,36
<i>S. mutans</i>	0	0	0
	0	0	0

Yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde *S.mutans* bakterisinde inhibisyon zonu oluşmamıştır. 1. denemede *S.mutans* ve 911 numaralı suş dışında bütün bakterilerde inhibisyon zonu oluşmuştur. Oluşan zon çapları 7-10 mm arasındadır. 2. denemede ise yalnızca 911 numaralı suşa 8 ve 9 mm çaplarında zon oluşumu gözlenmiştir.

Çizelge 5.7. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen ıhlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Ihlamur		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	0	0
	0	0	0
711	0	0	0
	0	0	0
712	0	0	0
	0	0	0
721	0	7	3,5±4,94
	0	8	4±5,65
811	0	0	0
	0	0	0
911	0	0	0
	0	0	0
921	0	0	0
	0	0	0
1021	0	0	0
	0	0	0
1022	0	0	0
	0	0	0
<i>S. mutans</i>	0	0	0
	0	0	0

Ihlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde yalnızca **721** numaralı suşta, 7 ve 8 mm çapında inhibisyon zonu olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.8. Su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen tarçın ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Tarçın		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	9	4,5±6,36
	0	7	3,5±4,95
711	0	9	4,5±6,36
	8	8	8±0
712	0	8	4±5,65
	7	0	3,5±4,95
721	0	8	4±5,65
	8	7	7,5±0,71
811	7	8	7,5±0,71
	9	7	8±1,41
911	0	8	4±5,65
	8	8	8±0
921	0	7	3,5±4,95
	7	7	7±0
1021	0	7	3,5±4,95
	6	6	6±0
1022	0	8	4±5,65
	7	0	3,5±4,95
<i>S. mutans</i>	7	8	7,5±0,71
	8	7	7,5±0,71

Tarçın ekstraktı ile yapılan denemelerde bütün suşlarda inhibisyon zonu oluşmuştur. Oluşan zon çapları 6 ile 9 mm arasında olup, en büyük zon çapı 311 numaralı suшта, en küçük zon çapı ise 1021 numaralı suшта ölçülmüştür. *S. mutans*'da ise oluşan zon çapı 7-8 mm'dir.

### 5.3.2. ALKOL EKSTRAKSİYONU DENEME SONUÇLARI

Alkol ekstraksiyonu sonucu elde edilen bitki ekstraktları ile yapılan denemelerin sonuçları Çizelge 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 ve 5.14'te verilmiştir.

Çizelge 5.9. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen adaçayı ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Adaçayı		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	8	4±5,65
	0	7	3,5±4,95
711	10	8	9±1,41
	8	7	7,5±0,71
712	9	8	8,5±0,7
	9	0	4,5±6,36
721	9	7	8±1,41
	10	8	9±1,41
811	0	8	4±5,65
	0	9	4,5±6,36
911	10	7	8,5±2,12
	8	9	8,5±0,7
921	10	0	5±7,07
	0	0	0
1021	8	9	8,5±0,7
	8	8	8±0
1022	8	8	8±0
	7	8	7,5±0,71
<i>S. mutans</i>	0	9	4,5±6,36
	0	9	4,5±6,36

Adaçayı ekstraktı ile yapılan denemelerde; 1. denemede **311**, **811**, ve *S. mutans* suşlarında, 2. denemede ise **921** numaralı suşta inhibisyon zonu oluşmamıştır. Gözlemlenen zon çapları 7 ile 10 mm arasındadır. *S. mutans*'da 9 mm büyüklüğünde zon çapı ölçülmüştür.

Çizelge 5.10. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Zencefil		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	11	8	9,5±2,12
	9	10	9,5±0,7
711	10	11	10,5±0,7
	9	8	8,5±0,7
712	9	9	9±0
	10	9	9,5±0,7
721	9	11	10±1,41
	11	9	10±1,42
811	10	8	9±1,41
	9	13	11±2,82
911	9	8	8,5±0,7
	10	7	8,5±2,12
921	13	8	11±3,53
	10	9	9,5±0,7
1021	10	11	10,5±0,7
	9	9	9±0
1022	9	9	9±0
	8	9	8,5±0,7
<i>S. mutans</i>	12	10	11±1,41
	11	12	11,5±0,7

Zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde bütün suşlarda inhibisyon zonu oluşmuştur. Oluşan zon çapları 8 ile 13 mm arasındadır. *S.mutans*'da 10 ile 12 mm arasında zon çapı ölçülmüştür.

Çizelge 5.11. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Yeşil Çay		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	0	0
	0	0	0
711	0	0	0
	0	0	0
712	0	8	4±5,65
	0	8	4±5,66
721	0	8	4±5,67
	0	7	3,5±4,95
811	0	7	3,5±4,95
	0	8	4±5,67
911	0	0	0
	0	0	0
921	0	9	4,5±6,36
	0	8	4±5,65
1021	0	7	3,5±4,95
	0	7	3,5±4,95
1022	0	10	5±7,07
	0	8	4±5,65
<i>S. mutans</i>	0	0	0
	0	0	0

Yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde *S. mutans*'da zon oluşumu gözlenmemiştir. 1. denemede hiçbir bakteride inhibisyon zonu oluşmamıştır. 2. denemede ise 711, 712, 811, 921,1021 ve 1022 numaralı suşlarda 7-10 mm çaplarında inhibisyon zonları oluşmuştur.

Çizelge 5.12. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen siyah çay ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Siyah Çay		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	7	3,5±4,95
	0	0	0
711	0	0	0
	0	0	0
712	0	7	3,5±4,95
	0	8	4±5,65
721	0	8	4±5,65
	0	0	0
811	0	0	0
	0	0	0
911	0	0	0
	0	0	0
921	0	8	4±5,65
	0	8	4±5,66
1021	0	8	4±5,67
	0	0	0
1022	0	0	0
	0	0	0
<i>S. mutans</i>	0	0	0
	0	9	4,5±6,36

Siyah çay ekstraktı ile yapılan denemelerin sonuçları incelendiğinde, 1. denemede hiçbir bakteride inhibisyon zonu oluşumu gözlenmemiştir. 2. denemede ise 311, 712, 721, 921, 1021 numaralı suşlarda ve *S.mutans*'da 7-9 mm çaplarında inhibisyon zonları oluşmuştur.

Çizelge 5.13. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen ıhlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri No	Ihlamur		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	0	0	0
	0	0	0
711	0	0	0
	0	0	0
712	0	0	0
	0	0	0
721	0	0	0
	0	9	4,5±6,36
811	0	0	0
	0	0	0
911	0	0	0
	0	0	0
921	0	0	0
	0	0	0
1021	0	0	0
	0	0	0
1022	0	0	0
	0	0	0
<i>S. mutans</i>	8	0	4±5,65
	0	0	0

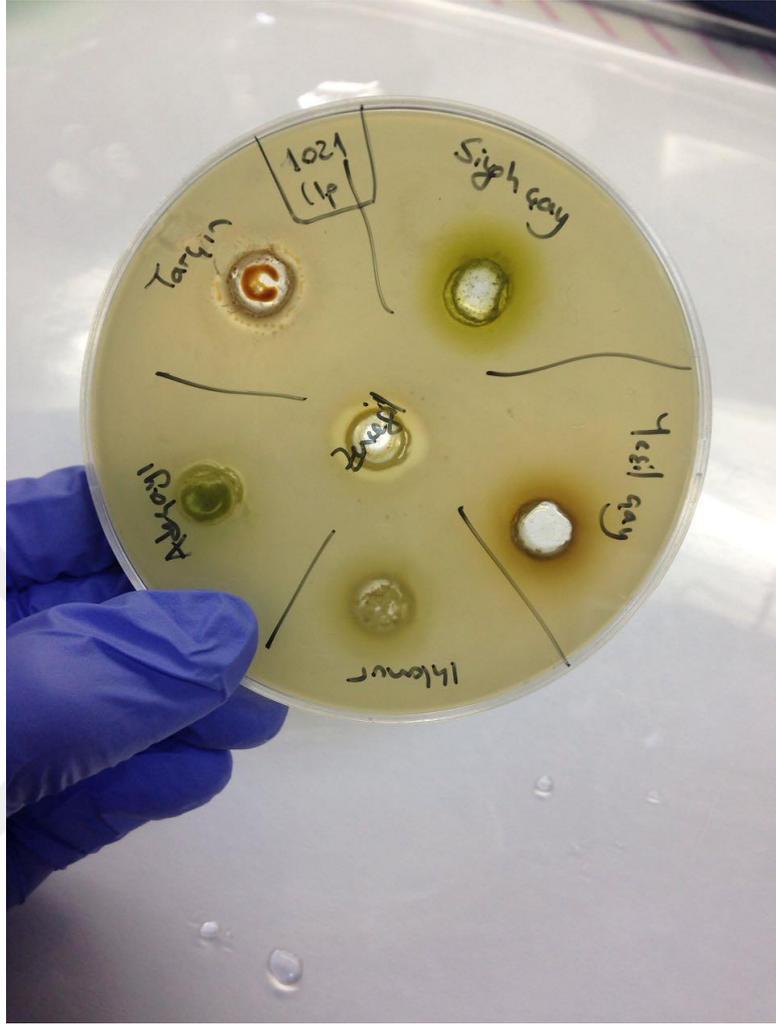
Ihlamur ekstraktı ile yapılan denemelerde; 721 numaralı suşta 9 mm ve *S. mutans*'da 8 mm çapında zon oluşumu gözlemlenmiştir. Diğer suşlarda inhibisyon zonu oluşmamıştır.

Çizelge 5.14. Etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ile elde edilen tarçın ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zon çapları (mm)

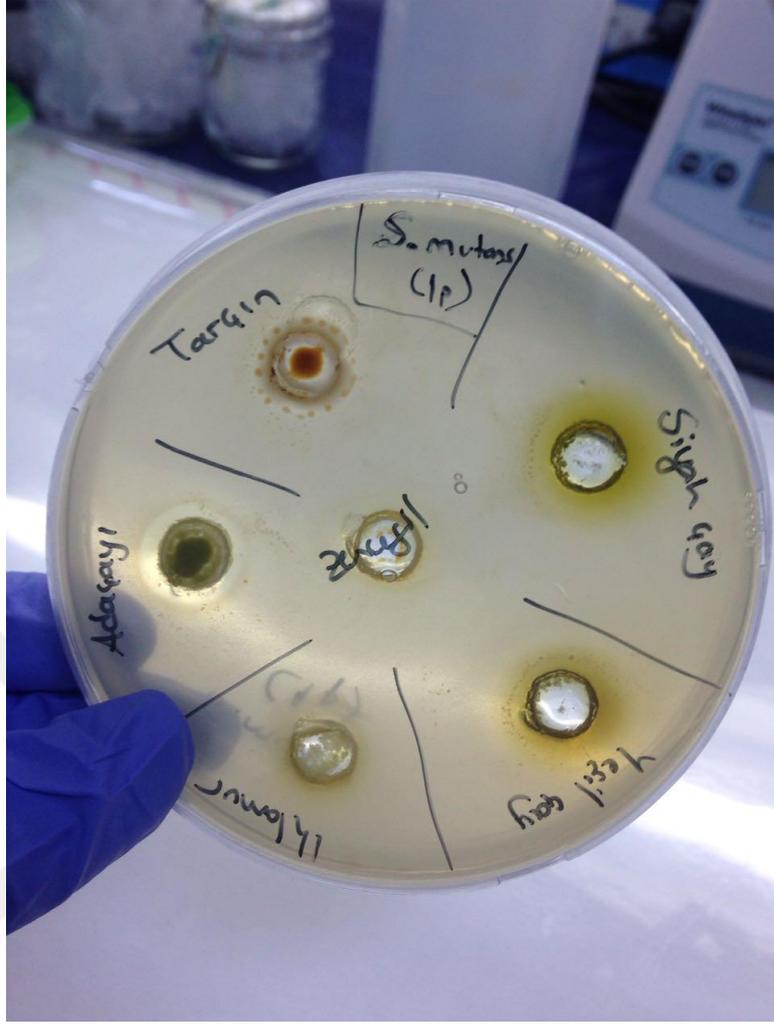
Bakteri No	Tarçın		
	1.Deneme Sonuçları (mm)	2.Deneme Sonuçları (mm)	Standart Sapmalı Ortalama
311	12	9	10,5±2,12
	12	9	10,5±2,13
711	14	11	12,5±2,12
	8	11	9,5±2,12
712	12	11	11,5±0,7
	13	10	11,5±2,12
721	14	10	12±2,82
	12	10	11±1,41
811	14	10	12±2,82
	11	13	12±1,41
911	10	9	9,5±0,7
	13	10	11,5±2,12
921	10	10	10±0
	13	13	13±0
1021	12	10	11±1,41
	11	12	11,5±0,7
1022	11	10	10,5±0,7
	11	10	10,5±0,8
<i>S. mutans</i>	14	11	12,5±2,12
	15	13	14±1,41

Tarçın ekstraktı ile yapılan denemeler sonucunda bütün suşlarda inhibisyon zonu oluştuğu görülmüştür. Oluşan inhibisyon zon çapları 8 ile 15 mm, *S. mutans*'da oluşan zon çapı ise 11 ile 15 mm arasındadır.

Bitki ekstraktları ile yürütülen denemeler sırasında elde edilen zon görüntüleri Şekil 5.6 ve 5.7'de verilmiştir. Şekillerde de görüleceği gibi etanol kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde su ekstraksiyonuna göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

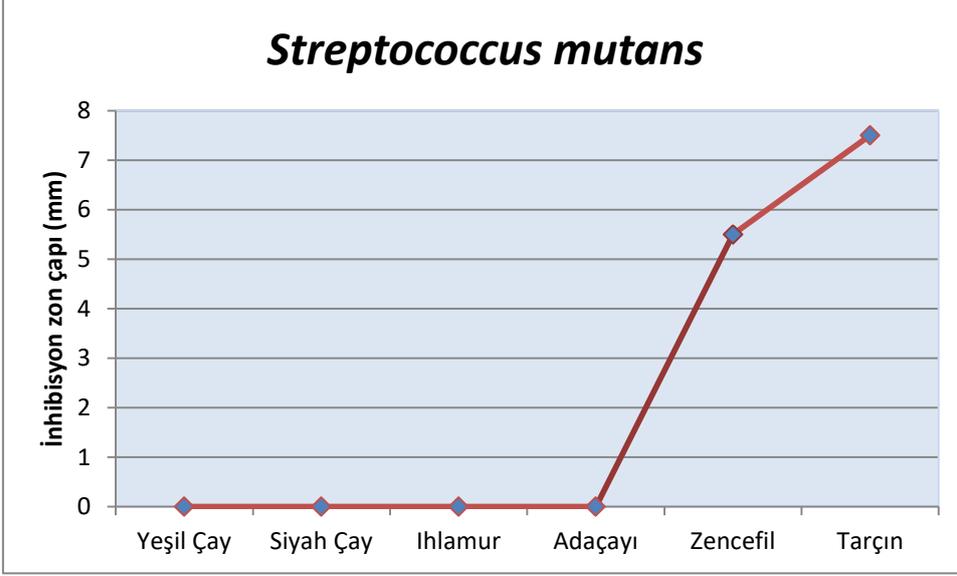


Şekil 5.6. Etanol ekstraktları ve 1021 numaralı suş ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon zonları

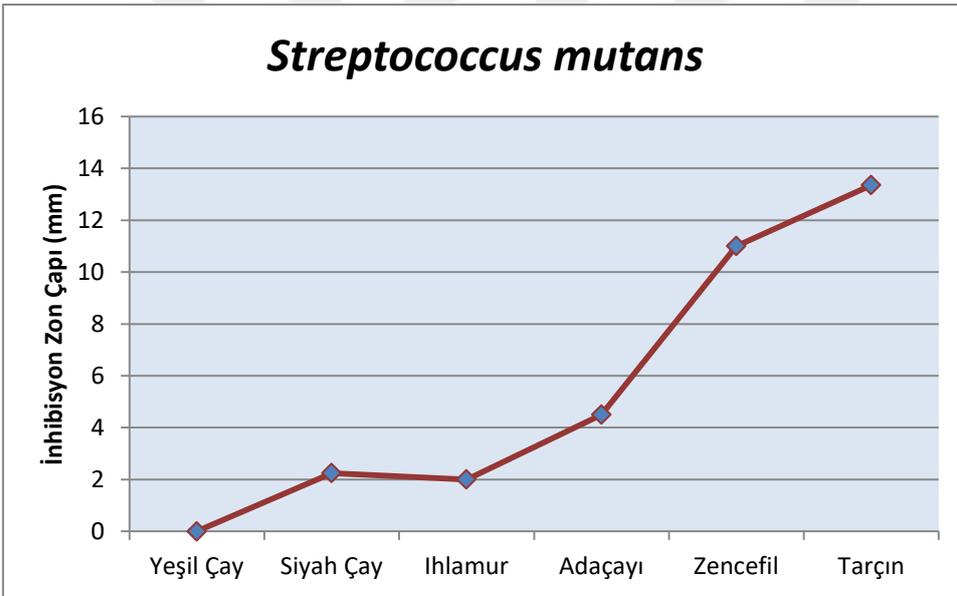


Şekil 5.7. Etanol ekstraktları ve *S.mutans* ile yapılan denemede oluşan inhibisyon zonları

Denemeler sırasında *S.mutans* ATCC 25175 standart suşuna ait sonuçlar diğer sonuçlardan ayrı olarak değerlendirilmiştir. Bu bakteri dental biyofilm ve diş çürüğü oluşumundan birincil sorumlu bakteriler arasındadır. Denemelerde bitki ekstraktlarının standart suş üzerinde oldukça değişken bir etki gösterdiği, etanol ile elde edilen ekstraktların, *S.mutans* üzerinde yeşil çay < ihlamur < siyah çay < adaçayı < zencefil < tarçın sırasıyla artan bir antimikrobiyal etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Grafik 6 ve 7) .



Şekil 5.8. Su ile elde edilen bitki ekstraktlarının *S.mutans* üzerindeki inhibisyon etkileri



Şekil 5.9. Etanol ile elde edilen bitki ekstraktlarının *S.mutans* üzerindeki inhibisyon etkileri

#### 5.4 BAKTERİ SUŞLARININ 16S rRNA ile TANIMLAMA SONUÇLARI

Denemelerde kullanılan bakteriler Sanger dizi analizi yöntemine göre tanımlanmaya çalışılmıştır. Yöntem kısmında detayları anlatılan şekilde bakteriyel DNA'lar izole edilmiş ve 16S bölgesi 27F ve 907R primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Sekans PCR aşaması ve ardından Beckman Coulter 8800 cihazı ile DNA dizi analizi yapılan örnekler, NCBI

(National Center for Biotechnology Information) veri bankasından nükleotit BLAST programı kullanılarak veritabanında bulunan bakteriler ile kıyaslanmış ve benzerlik oranları tespit edilmiştir. Bakterilerin veri bankası ile kıyaslanarak benzer olduğu mikroorganizma isimleri ile benzerlik oranları Çizelge 5.15'te görülmektedir.

Çizelge 5.15. Tez çalışmasında kullanılan bakterilerin NCBI veritabanı kullanılarak elde edilen tanımlama sonuçları

Suş No	Tanımlama Sonucu	Benzerlik oranı
311	<i>Enterobacter ludwigii/cloacaea</i>	%97
711	<i>Halanaerobacter salinarius</i>	%100
712	<i>E.ludwigii/Klebsiella oxytoca</i>	%99
721	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	%99
811	<i>Enterobacter ludwigii/cloacaea</i>	%98
911	<i>Streptococcus gordonii</i>	%99
921	<i>Enterobacter ludwigii/cloacaea</i>	%97
1021	<i>Thermoproteus uzoniensis/Bacteriovorax marinus</i>	%100
1022	<i>Enterobacter ludwigii/cloacaea</i>	%98

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

#### 6.1.1. DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında, gün içerisinde ağız içi sıcaklık ve pH koşullarında oluşan değişimler dikkate alınarak, oral bakterilerin bulk-fill kompozit rezinlerin yüzeyine tutunma düzeyleri araştırılmıştır. Bunun için, 37°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında, diş ve diş eti yüzeyinden izole edilmiş ve biyofilm oluşturma yetenekleri tespit edilmiş 9 adet bakteri suşu ve *S.mutans* ATCC 25175 standart suşu düşük büzülmeli kompozit rezin diskleri ile birlikte inkübe edilmiştir. Yapılan çalışma sonuçları incelendiğinde 921 numaralı suş hariç diğer tüm suşların bulk-fill kompozit rezin yüzeyine  $3,9 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> ile  $7,4 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında tutunduğu tespit edilmiştir. Standart olarak seçilen *S.mutans* bakterisinin ise  $5,2 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde tutunduğu görülmüştür.

Güngör ve ark.(2013) periodontal ve ortodontik tedavi sırasında çıkarılan kalıcı dişlere, *S.mutans* bakterisinin tutunma düzeyini araştırmıştır. Çalışma sırasında yapay tükürük (%0,1 et ekstraktı, %0,2 maya ekstraktı, 0,5 proteoz pepton,% 0,25 domuz gastrik musini, 6.0 mM NaCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> ve 2.7 mM KCl) varlığında ve tükürük olmadan, 10 mm<sup>2</sup> alanda,  $1 \times 10^8$  kob/mL bakteri, 37°C sıcaklıkta 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından diş yüzeyine tutunamayan bakteriler su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve tutunan bakteriler Mitis Salivarius Agara ekilerek 37°C sıcaklıkta 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, yapay tükürük varlığında  $7,5 \times 10^5$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde, tükürük bulunmayan ortamda ise  $5,2 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde bakterinin diş yüzeyine tutunduğu saptanmıştır (104). Bu çalışma ve tez çalışmasının yöntemlerinin aynı olmamakla beraber sonuçlarının benzer olduğu, *S.mutans*'ın ise diş yüzeyine ve bulk-fill kompozit rezin yüzeyine tutunma düzeyinin aynı olduğu görülmektedir.

## 6.1.2. FARKLI SICAKLIK VE PH KOŞULLARINDA DOLGU MATERYALİ ÜZERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

*S.mutans* ve dental biyofilm oluşumuna katılan mikroorganizmaların optimum gelişme sıcaklıkları 37°C'dir (99). Ağız içi ortamda sıcaklık değerleri 33,1 °C (± 5,2) ve 33,3 °C (± 6,1), pH ise 7,3 (± 0,4) ve 6,6 (± 0,5) değerleri arasındadır (98). Tez çalışmasında benimsenen in vitro modelde, ağız içi ortamın ulaştığı sıcaklık ve pH değerlerinde bakterilerin bulk-fill kompozit rezin yüzeyine tutunma düzeyleri incelenmiştir.

33°C sıcaklık ve 7,2 pH koşulları, insanların gün içerisinde uyanık oldukları zamanlarda ağız içerisinde oluşan sıcaklık ve pH'dır (98). Bu koşullarda oral bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelinin  $3,8 \times 10^4$  -  $1,6 \times 10^5$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında, *S.mutans*'ın ise  $4,5 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.

Sıcaklığın 37°C ve pH'nın 6,5 olduğu durumlarda, oral bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelinin  $1,7 \times 10^4$  -  $4,8 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında, *S.mutans*'ın ise  $3,1 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde olduğu görülmüştür.

33°C sıcaklık ve 6,5 pH değerlerinde, yani insanların uyku halinde iken ağızlarından nefes alması durumunda, bakterilerin dolgu materyali yüzeyine  $4,7 \times 10^3$  -  $9,1 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> aralığında, *S.mutans*'ın ise  $3,3 \times 10^4$  kob/mm<sup>2</sup> düzeyinde bağlandığı görülmüştür.

Deneme sonuçları göz önüne alındığında bakterilerin 33°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında, dolgu materyali yüzeyine en fazla tutunduğu ve biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Dış yüzeyine tutunan bakterilerin pek çoğu aerobik bakterilerdir (22). Anaerobik bakteriler çoğunlukla diş eti oluşunda biyofilm oluşturmaktadır (3). Dış yüzeyinden izole edilen ve biyofilm oluşturduğu tespit edilen bakteriler çalışma kapsamında kullanılmış ve aerobik koşullarda çalışılmıştır. Bu nedenle aerob oldukları düşünülen bakterilerin, gün içerisinde ağız içi sıcaklık ve pH koşullarında daha fazla biyofilm oluşturmaları literatür çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir.

*S.mutans* ise 37°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında, diğer sıcaklık ve pH değerlerine kıyasla, dolgu materyali yüzeyine daha fazla tutunmaktadır. *S.mutans* 5,5 pH gibi asidik koşullarda canlılığını korumakta ve çürük oluşumuna neden olmaktadır. Hatta bazı suşları pH 3'te dahi canlı kalabilmektedir (105). Fakat *S.mutans* 'ın optimum gelişme koşulları 7,5

pH ve 37°C sıcaklıktır (106). Bu nedenle *S.mutans*'ın en fazla 37°C sıcaklık ve 7,2 pH koşullarında biyofilm oluşturmaları mevcut veriler ile bağdaşmaktadır.

### **6.1.3. BİTKİ EKSTRAKTLARININ BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bitki ekstraktlarının inhibitör etkilerinin belirlenmesi için agar spot ve kuyucuk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Agar spot yöntemi ile yapılan denemelerde, petri yüzeyine damlatılan ekstraktın yayılması ve düzgün bir zon oluşmaması sebebi ile sonuç alınamamıştır. Bu nedenle, çalışmada kuyucuk difüzyon yöntemi ile yapılan denemelerde elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Su ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen adaçayı ekstraktı ile yapılan denemelerde bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluşumu gözlenmemiştir. Etanol ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen adaçayı ekstraktı ile yapılan denemelerde ise 7-10 mm aralığında zon çapı oluşumu gözlenmiştir. *S.mutans*'da 9 mm zon oluşurken, 1. denemede 311, 811 ve *S.mutans* suşlarında, 2. denemede ise 921 numaralı suşlarda inhibisyon zonu oluşmamıştır.

Etanol ekstraktları ile yapılan denemelerin sonuçları incelendiğine, etanol ekstraktının antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmektedir. Su ekstraksiyonunun adaçayında bulunan antimikrobiyal maddelerin alınması için yeterli olmadığı, bu nedenle inhibisyon zonu oluşmadığı düşünülmektedir.

Literatürde *S.mutans* başta olmak üzere dental plak oluşumuna katılan bakterilere karşı adaçayı ekstraktlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, ekstraksiyonun su dışında daha kuvvetli çözücü özelliğe sahip diklorometan, etanol, metanol ve n-hekzan gibi çözümler ile yapıldığı ve antibakteriyel etkinin görüldüğü kaydedilmiştir (71) (10) (70). Çalışma sonuçları incelendiğinde; su ekstraktı ile yapılan denemelerde inhibisyon zonunun oluşmadığı, etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde ise zon oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum literatürde mevcut bulunan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Su ekstraksiyonu sonucu elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde 711 numaralı suşta 7 mm, 811 numaralı suşta 7 ve 8 mm, *S.mutans*'da ise 7 ve 8 mm çaplarında

inhibisyon zonları oluşmuştur. Diğer bakterilerde inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen zencefil ekstraktı ile yapılan denemelerde ise bütün suşlarda inhibisyon zonu oluştuğu görülmüştür. Oluşan zon çapları 8 ile 13 mm arasındadır. *S.mutans*'da ise 10 ile 12 mm arasında zon çapı ölçülmüştür.

Mathai ve ark. zencefil ekstraktını, zencefil rizomlarının havanda dövülerek macun haline getirilmesi sureti ile elde etmiş ve bu ekstraktın *S.mutans*'a karşı inhibisyon etkisini kuyucuk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada *S.mutans* Mitis Salivarius Agarda, anaerobik koşullarda 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve sonrasında petride 8 mm çapında kuyular açılmış, ardından kuyulara 50 µl zencefil ekstraktı konulmuştur. İnkübasyonun ardından  $11,7 \pm 0,6$  çapında inhibisyon zonu oluşumu görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan yöntem ve sonuçlar ile tez çalışması kapsamında zencefil ekstraktı ve *S.mutans* ile yapılan deneme ve sonuçları büyük benzerlik göstermektedir. Bu tez çalışmasında petrielerde 5 mm çapında kuyular açılmış ve *S.mutans*'da 10-12 mm çaplarında zon oluşumu gözlenmiştir (63).

Su ekstraksiyonu sonucu elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde *S.mutans*'da inhibisyon zonu oluşmamıştır. 1. denemede *S.mutans* ve 911 numaralı suş dışında bütün bakterilerde inhibisyon zonu oluşmuştur. Oluşan zon çapları 7-10 mm arasındadır. 2. denemede ise yalnızca 911 numaralı suşta 8 ve 9 mm çaplarında zon oluşumu gözlenmiştir.

Etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen yeşil çay ekstraktı ile yapılan denemelerde *S.mutans*'da zon oluşumu gözlenmemiştir. 1. denemede hiçbir petride inhibisyon zonu oluşmamıştır. 2. denemede ise 711, 712, 811, 921,1021 ve 1022 numaralı suşlarda 7-10 mm çaplarında inhibisyon zonları oluşmuştur.

Kawarai ve ark., Hindistan'ın Assam bölgesinde yetişen, suya geçen biyoaktif madde oranı yüksek olan Assam çayı ile yeşil ve siyah çayın *S.mutans* üzerindeki inhibisyon etkilerini karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada; 9 gr çay 350 mL kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletilmiş, ardından oda sıcaklığında 20 dakika demlenmiştir. Sonrasında çay infüzyonu bitki kalıntılarından uzaklaştırılmış ve fraksiyonasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen çay ekstraktlarının inhibisyon etkileri kıyaslandığında; Assam çayının uygulanan en düşük dozda dahi *S.mutans* gelişimini inhibe ettiği, yeşil çayın ise uygulanan konsantrasyonların

hiçbirinde inhibe edici özellik göstermediği görülmüştür (58). George ve ark. ise yeşil çay, siyah çay ve oolong çayının *S.mutans* üzerindeki inhibisyon etkilerini kuyucuk difüzyon yöntemini kullanarak araştırmıştır. Çalışma kapsamında hem su hem de etanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Su ekstraksiyonu sırasında 10 gr çay 100 mL su içerisinde 30 dakika boyunca kaynatılmış, sonrasında ise su banyosu içerisinde suyun buharlaşması sağlanarak 10 mL ekstrakt elde edilmiştir. Etanol ekstraksiyonunda ise 5 gr çay 50 mL etanol içerisine konulmuş ve bir havan içerisinde ezilmiştir. Sonrasında aynı su ekstraksiyonunda olduğu gibi su banyosu içerisinde alkolün buharlaşması sağlanmış ve 5 mL ekstrakt elde edilmiştir. Petrilerde açılan 6 mm çaplarındaki kuyucuklara 50 µL ekstrakt konularak inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma sonuçları incelendiğinde yeşil çayın su ekstraktının 16,33 mm, etanol ekstraktının ise 14 mm olduğu görülmüştür (107).

Yeşil çayda bulunan polifenollerin %30-40'ının suda çözünebilir olduğu kaydedilmiştir (54). Tüm bu veriler ve tez kapsamında yapılan çalışma sonuçları dikkate alındığında, yeşil çaydan elde edilen ekstraktların antikaryojenik etkiye sahip olduğu, fakat yeşil çayda bulunan antimikrobiyal etkiye sahip bileşenlerin kullanılan ekstraksiyon yöntemleri ile yeterli düzeyde alınamadığı görülmektedir.

Siyah çayın su ekstraktı ile yapılan denemelerde inhibisyon zonu oluşumu görülmemiştir. Etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde ise, 1. denemede hiçbir petride inhibisyon zonu oluşumu gözlenmemiştir. 2. denemede 311, 712, 721, 921, 1021 numaralı suşlarda ve *S.mutans*'da 7-9 mm çaplarında inhibisyon zonları oluşmuştur.

Siyah çayın yeşil çaydan daha az antibakteriyel etkiye sahip olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bunun nedeni yeşil çayda bulunan fenolik bileşenlerin fermentasyon sırasında okside olmasıdır (58) (54). Siyah çayın antikaryojenik özelliği; içeriğinde bulunan florürün diş minesini kuvvetlendirmesinden, tearubin ve teaflavinin bakterilerin diş yüzeyine tutunmasını engellemesinden ve tearubinin amilaz aktivitesini durdurarak asit oluşumunu dolaylı yoldan inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (7) (58) (59). Siyah çayda kuersetin ve klorojenik asit gibi antibakteriyel etkiye sahip bileşenler de bulunmaktadır (108).

Yeşil çay ekstraktları ile yapılan denemelerin değerlendirildiği 6.2.3'te anlatılan George ve ark. yaptıkları çalışmada, siyah çayın su ekstraktının 10,33 mm, etanol ekstraktının ise 9

mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır. Bu alışma sonuçları ile tez çalışması kapsamında siyah çayın etanol ekstraktı ve *S.mutans* ile yapılan deneme sonuçları incelendiğinde benzerlik görülmektedir. Su ekstraktlarında inhibisyon zonu oluşmamasının nedeni; siyah çayda bulunan antibakteriyel etkiye sahip bileşenlerin ekstraksiyon sırasında yeterince alınamamasından kaynaklandığı dşnlmektedir.

Ihlamurun su ekstraktı ile yapılan denemelerde, yalnızca 721 numaralı suşta 7 ve 8 mm çaplarında zon oluşturduğu görülmüştür, diğer suşlarda zon oluşmamıştır. Etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde ise; 721 numaralı suşta 9 mm ve *S. mutans* 'da 8 mm çapında zon oluşumu gözlemlenmiştir. Diğer suşlarda inhibisyon zonu oluşmamıştır.

Ihlamurun ve bileşenlerinin antimikrobiyal etkileri ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ihlamurdan elde edilen esansiyel yağın bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, yalnızca Gram pozitif bakterilerde inhibisyon zonu oluştuğu görülmüştür (109). Ihlamurun başka bir cinsi olan *Tilia argentea*'nın su ekstraktının gıda patojenlerine karşı inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışmada ise antimikrobiyal aktivitenin görülmediği kaydedilmiştir (110).

Ihlamur ile ilgili tez çalışmasında yapılan deneme sonuçları ve literatür araştırmaları dikkate alındığında diğer bitki ekstraktları kadar yüksek antibakteriyel etkiye sahip olmadığı dşnlmektedir.

Tarçının su ekstraktı ile yapılan denemelerde bütün suşlarda inhibisyon zonu oluşumu gözlenmiştir. Oluşan zon çapları 6 ile 9 mm arasında olup, en büyük zon çapı 311 numaralı suşta, en kk zon çapı ise 1021 numaralı suşta llmştr. *S. mutans* 'da ise oluşan zon çapı 7-8 mm'dir.

Etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde de bütün suşlarda inhibisyon zonu oluşumu görülmüştür. Oluşan inhibisyon çapları 8 ile 15 mm, *S.mutans* 'da oluşan zon çapı ise 11 ile 15 mm arasındadır.

Rezvani ve ark. bal ve tarçın ekstraktlarının *S.mutans* zerindeki inhibitör etkilerini kuyu difüzyon yöntemi ile araştırmıştır. Yaptıkları çalışmada tarçın ekstraktı,1000 mL etanol (%70) içerisinde 200 g tarçının 72 saat boyunca bekletilmesi ve sonrasında su banyosunda etanolün uçurulması sureti ile elde edilmiştir. Daha sonrasında elde edilen ekstrakt su ile

belirli oranlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Bakteri kültürünün yayıldığı petrilerde 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve kuyucuklara 30 µL ekstrakt konulmuştur. 37°C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyonun ardından 1:1 oranında ekstraktın kullanıldığı denemede 23,33 mm çapında inhibisyon zonu oluşumu gözlenmiştir (65). Tarçının etanol ekstraktı ile yapılan başka bir çalışmada ise, farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar agar disk difüzyon testi ile denenmiş ve 10 µL %10'luk etanol ekstraksiyonunun *S.mutans* bakterisinde 9,5 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır (111).

Tez çalışması kapsamında yapılan deneme sonuçları incelendiğinde, tarçının hem su ekstraktının hem de etanol ekstraktının dental biyofilm oluşumuna katılan bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Deneme sonuçları literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca sonuçlar incelendiğinde, etanol ekstraktı ile yapılan denemelerde oluşan inhibisyon çaplarının su ekstraktı ile yapılan denemelerdeki inhibisyon çaplarından daha büyük olduğu görülmektedir. Bu durum alkol ekstraksiyonunun antimikrobiyal maddelerin alınması için daha etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Alkol ekstraksiyonu sırasında herhangi bir ısı işlem uygulamasının yapılmaması ve bu nedenle polifenollerin denatüre olmaması sebebi ile bu durumla karşılaşıldığı düşünülmektedir.

## 6.2. SONUÇ

Bu çalışmanın ilk aşamasında benimsenen in vitro modelde, ağız içi ortamda saptanan en düşük, en yüksek ve optimum pH ve sıcaklık koşulları oluşturulmuş, bu koşullarda dental plak oluşumuna katılan bakterilerin, bulk-fill kompozit rezin yüzeyinde biyofilm oluşturma durumları incelenmiştir.

Çalışma sonucunda; bakterilerin bulk-fill kompozit rezin yüzeyine tutunma düzeyinin, diş yüzeyine tutunma düzeyine yakın olduğu görülmüştür. Kompozit rezin tedavilerinin başarısızlıkla sonuçlanmasının en temel sebebi, kavite ile restoratif materyal arasında polimerizasyon büzüşmesi sonucu meydana gelen boşlukta oluşan ikincil çürüklerdir. Tez çalışmasında kullanılan düşük büzülmeli restoratif materyalin yüzeyinde bakterilerin tutunması ve biyofilm oluşturmaları, ikincil çürükler ile karşılaşılabileceğini dolayısıyla da restoratif tedavinin başarısızlıkla sonuçlanacağını göstermektedir.

Farklı sıcaklık ve pH koşullarında bakterilerin dolgu materyali yüzeyine tutunma düzeyinin incelendiği denemelerde ise; bakterilerin en çok gün içersinde ağız içi ortamda gözlenen 37°C ve 7,2 pH koşullarında bulk-fill kompozit rezin yüzeyinde biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları incelendiğinde dikkat çeken bir diğer nokta ise, nötral pH koşullarında dolgu materyali yüzeyinde biyofilm oluşturan bakteri sayısının daha fazla olmasıdır. Uyku halinde iken ağız içerisinde pH 6,5 gibi daha asidik koşullara ulaşmaktadır. Yapılan çalışma sonucunda, bakterilerin uyku halinde ağızdan nefes alınması durumunda dolgu materyali yüzeyine en düşük düzeyde tutunduğu görülmüştür.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında; su ve etanol ekstraksiyonu ile elde edilen bitki ekstraktlarının dental biyofilm oluşumuna katılan bakteriler üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bütün etanol ekstraktlarının su ekstraktlarından daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, bitkilerde bulunan ve antimikrobiyal etkiye sahip olan polifenollerin ve bazı uçucu yağların sıcak su ekstraksiyonu ile yeterince ekstrakte edilemediği düşündürmektedir.

Yapılan çalışma sonuçları incelendiğinde; tarçın, zencefil ve yeşil çaydan elde edilen hem su ekstraktlarının hem de etanol ekstraktlarının antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmektedir. Kullanılan bitki ekstraktları arasında en yüksek antibakteriyel etkiye, tarçından etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen örnek sahiptir. Tarçın dışındaki bitkiler arasında ise en fazla antibakteriyel etki sırası ile zencefil ve yeşil çayda tespit edilmiştir.

Adaçayının su ekstraktının inhibitör etkiye sahip olmadığı, etanol ekstraktının ise bütün suşlara karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Ihlamur ve siyah çayın ise diğer bitkilere kıyasla en az inhibitör etkiye sahip bitkiler olduğu görülmüştür. Siyah çayın su ekstraktında hiçbir suşta inhibisyon zonu oluşmamışken, etanol ekstraktında 5 bakteri suşunda ve *S.mutans*'da zon oluşumu gözlenmiştir. Ihlamurun ise su ekstraktının yalnızca 1 bakteri suşuna, etanol ekstraktının ise 1 suş ve *S.mutans*'a karşı inhibitör etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmada kullanılan bütün bitkilerin farklı düzeylerde antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu bitkilerden yeşil çayın günlük tüketiminin ağız sağlığına olan olumlu etkileri yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Tarçın ve zencefilin de sıcak su enfüzyonu ile bitki çayı olarak kullanımı, dental plak içerisindeki bakterilerin gelişimini

inhibe etmesi sebebi ile ağız sağlığının korunmasına katkı sağlamaktadır. Bu bitki ekstraktlarının ağız yıkama suyu ve diş macunu gibi ürünlerde, kimyasal ve sentetik antimikrobiyal maddelerin yerine kullanımının, mikroorganizmaların edindikleri antimikrobiyal direncin gelişmesine engel olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca bitki ekstraktlarının birlikte kullanımının sinerjetik etkiye sebep olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Çalışma sırasında inhibitör etkileri incelenen bitkilerin birlikte kullanımının, dental plak oluşumuna katılan bakteriler üzerindeki etkisi başka bir çalışmanın konusu olabilir. Çalışma sırasında polifenollerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemler alkol ekstraksiyonu ve su ekstraksiyonudur. Bu yöntemlerden su ekstraksiyonu seçilirken bitki çaylarının günlük hazırlanma şekli göz önüne alınmıştır. Etanol ekstraksiyonun uygulanmasının sebebi ise daha etkin bir ekstraksiyon yöntemi olmasıdır. Fakat günümüzde daha ileri ekstraksiyon yöntemleri bulunmaktadır. Mikrodalga destekli solvent ekstraksiyonu ya da basınçlı sıvı ekstraksiyonu gibi yöntemlerle daha etkin bir ekstraksiyon yapılabileceği ve elde edilen ürünlerde daha fazla antimikrobiyal etkinin görölebileceği düşünölmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003 WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol [Internet]. 2003;31:3–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15015736>
2. Zhou H, Liu H, Weir MD, Reynolds MA, Zhang K, Xu HHK. Three-dimensional biofilm properties on dental bonding agent with varying quaternary ammonium charge densities. J Dent. 2016;53:73–81.
3. Wróblewska M, Strużycka I, Mierzwińska-Nastalska E. Significance of Biofilms In Dentistry. Przegl Epidemiol. 2015;69:739–44.
4. Pinna R, Usai P, Filigheddu E, Garcia-Godoy F, Milia E. The role of adhesive materials and oral biofilm in the failure of adhesive resin restorations. Am J Dent. 2017;30(5):285–92.
5. Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler :Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. Gıda. 2009;34:165–73.
6. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. Trends Microbiol. 2017;xx:1–14.
7. Goenka P, Sarawgi A, Karun V, Nigam A, Dutta S, Marwah N. Camellia sinensis (Tea): Implications and role in preventing dental decay. Pharmacogn Rev. 2013;
8. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. Public Health Nutr. 2004;7(1A):201–26.
9. Ozin BIB, Ukic NEDAMI, Amojlik ISS, Ovin EMJ. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage ( Rosmarinus officinalis L . and Salvia officinalis L ., Lamiaceae ) Essential Oils. J Agric Food Chem. 2007;55:7879–85.
10. Moreira MR, Souza AB, Moreira MA, Bianchi TC, Carneiro LJ, Estrela FT, et al. RP-HPLC analysis of manool-rich Salvia officinalis extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. Rev Bras Farmacogn.

2013;23(6):870–6.

11. Karna P, Chagani S, Gundala SR, Rida PCG, Asif G, Sharma V, et al. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. *Br J Nutr.* 2012;107(4):473–84.
12. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients.* 2015;7:7729–48.
13. Alves FRF, Neves MAS, Silva MG, Rôças IN. Antibiofilm and Antibacterial Activities of Farnesol and Xylitol as Potential Endodontic Irrigants. *Braz Dent J.* 2013;24(3):224–9.
14. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011;2(5):435–44.
15. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Di A, et al. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res.* 2006;341:2456–61.
16. Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P. Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4980–8.
17. Çiftçi Z. Kronik tonsillitte biofilmin rolü. T. C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği. 2005.
18. Ölmez Z. Süt Sanayisinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü. 2009;
19. Allison DG. The Biofilm Matrix. *Biofouling.* 2016;7014(July):139–50.
20. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(February):264–70.
21. Jurczak A, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:499–515.

22. Poulsen LV. Microbial Biofilm in Food Processing. *Leb u-Technol.* 1999;326:321–6.
23. Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler: Yüzeylelerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda Teknol Derneği.* 2009;34:165–73.
24. Lindsay D, Holy A Von. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect.* 2006;64:131–325.
25. Hug I, Deshpande S, Sprecher KS, Pfohl T, Jenal U. Response By a Bacterial Rotary Motor. *Science (80- ).* 2017;534(October):531–4.
26. Lí Y-H, Tian X. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors.* 2012;12:2519–38.
27. Verma SC, Miyashiro T. Quorum Sensing in the Squid- Vibrio Symbiosis. *International J Mol Sci.* 2013;14:16386–401.
28. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 1998;42:9–27.
29. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms As Complex Differentiated Communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187–209.
30. M. J, W. A, S. A, F. J, M. I, M. N, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc [Internet].* 2018 Oct 15 [cited 2017 Oct 31];81(1):7–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1726490117302587?via%3Dihub>
31. Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH. Enzymatic Detachment of Staphylococcus epidermidis Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2633–6.
32. Akgün ÖM, Görgülü S, Altun C. Süt dişlerinin önemi ve erken çocukluk çağı çürükleri The importance of primary teeth and early childhood caries. *Smyrna Tıp Derg.* 2011;(2):49–52.

33. Marsh PD. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005;32(SUPPL. 6):7–15.
34. Marsh PD. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. *Adv Dent Res.* 1994;8:263–71.
35. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N, Mahato RI, Takakura Y HM, Passini MA, Watson DJ WJ, et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009;88(11):982–90.
36. Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, Tanaka M, Tanaka J, Minamino N, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun* [Internet]. 2004;72(3):1341–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=355992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Byers HL, Tarelli E, Homer KA. Sequential deglycosylation and utilization of the N-linked , complex-type glycans of human  $\alpha$  1 -acid glycoprotein mediates growth of *Streptococcus oralis*. *Glycobiology.* 1999;9(5):469–79.
38. Ad H, Ma C, Poliack TA, Smith RP, Jr CK, Socransky RL. Subgingival microbiota in healthy , well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.* 1998;25:346–53.
39. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis †. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3944–55.
40. Jack RW, Tagg JR, Ev MIR. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Am Soc Microbiol.* 1995;59(2):171–200.
41. Altuntas EG. Bacteriocins : A natural way to combat with pathogens. *Microb Pathog Strateg Combat them Sci Technol Educ.* 2013;1005–15.
42. Caufield PW, Qi F, Chen P. The Group I Strain of *Streptococcus mutans* , UA140 ,

- Produces Both the Lantibiotic Mutacin I and a Nonlantibiotic Bacteriocin , Mutacin IV. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(1):15–21.
43. Nguyen T, Zhang Z, Huang I, Wu C, Merritt J, Shi W, et al. Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2009;155:551–6.
  44. Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2009;28(8):397–403. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2903342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/dna.2009.0868>
  45. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology*. 2002;148(2):467–72.
  46. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:333–9.
  47. B. Y. Wang, B. Chi HKK. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2002. 2002;17:108–12.
  48. Aldulaimi OA. General overview of phenolics from plant to laboratory, good antibacterials or not. *Phcog Rev* [Internet]. 2017;11(22):123–7. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10482-014-0126-3>
  49. WHO. The World Medicines Situation 2011. Medicines prices, availability and affordability. *World Med Situat* [Internet]. 2011;32. Available from: [http://www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_situation/WMS\\_ch6\\_wPricing\\_v6.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf)
  50. Cheesman MJ, Ilanko A, Blonk B. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Phcog Rev* [Internet]. 2017;11:57–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212088>

51. ÇÖPLÜ N. Antimikrobiyal Direnç ve Akılcı Antimikrobiyal Kullanımı. Kırıkkale Üniversitesi Bilim Gelişmeler Derg. 2012;1(1):34.
52. Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. J Agric Food Chem. 2003;51(15):4427–35.
53. Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci Technol Bull [Internet]. 2005;2:71–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Archana S, Abraham J. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. J Appl Pharm Sci. 2011;1(8):152–149.
55. Hamilton-Miller JMT. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). J Med Microbiol. 2001;50(4):299–302.
56. Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE. Hydroxychalcone inhibitors of *Streptococcus mutans* glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. Bioorganic Med Chem Lett. 2016;26(15):3508–13.
57. Rasheed A, Haider M. Antibacterial Activity of *Camellia sinensis* Extracts Against Dental Caries. Arch Pharm Res. 1997;21(3):348–52.
58. Kawarai T, Narisawa N, Yoneda S, Tsutsumi Y, Ishikawa J. Archives of Oral Biology Inhibition of *Streptococcus mutans* bio film formation using extracts from Assam tea compared to green tea. Arch Oral Biol. 2016;68:73–82.
59. Liao Y, Brandt BW, Li J, Crielaard W, Van Loveren C, Deng DM. Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review. J Oral Microbiol. 2017;9(1):1344509.
60. Emekli-Alturfan E, Yarat A, Akyuz S. Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. Food Chem Toxicol. 2009;47(7):1495–8.

61. Azizi A, Aghayan S, Zaker S, Shakeri M, Entezari N, Lawaf S. In Vitro Effect of Zingiber officinale Extract on Growth of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis. 2015;2015.
62. Amir S, Eyad A, Hussain AT, Tajuddin S. In-vitro antimicrobial activity and identification of bioactive components using GC – MS of commercially available essential oils in Saudi Arabia. J Food Sci Technol. 2017;54(12):3948–58.
63. Mathai K, Anand S, Aravind A, Dinatius P, Krishnan A V, Mathai M. Antimicrobial Effect of Ginger, Garlic, Honey, and Lemon Extracts on Streptococcus mutans. J Contemp Dent Pr [Internet]. 2017;18(11):1004–8. Available from: [http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=12603&Type=FREE&TYP=TOP&IN=\\_eJournals%2Fimages%2FJPLGO.gif&IID=982&Value=24&isPDF=YES](http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=12603&Type=FREE&TYP=TOP&IN=_eJournals%2Fimages%2FJPLGO.gif&IID=982&Value=24&isPDF=YES)
64. Hasan S, Danishuddin M, Khan AU. Inhibitory effect of zingiber officinale towards Streptococcus mutans virulence and caries development: In vitro and in vivo studies. BMC Microbiol. 2015;15(1):1–14.
65. Rezvani MB, Niakan M, Kamalinejad M, Ahmadi FS, Hamze F. The synergistic effect of honey and cinnamon against Streptococcus mutans bacteria. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2017;7(4):314–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.029>
66. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. JAC Antibacterial activity of essential oils and their major constituents. J Antimicrob Chemother. 2001;565–73.
67. Keskin D, Toroglu S. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. J Environ Biol. 2011;32:251–6.
68. Kamatou GPP, Viljoen AM, Gono-bwalya AB, Zyl RL Van, Vuuren SF Van, Demirci B, et al. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African Salvia species. J Ethnopharmacol. 2005;102:382–90.
69. Yilmaz D, Gokduman ME. Adaçayı ( Salvia officinalis i .) Bitkisinin Farklı Nem

- Düzeylelerinde Fiziko-Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg. 2015;10(1):73–82.
70. More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJM. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(3):473–7.
71. Beheshti-rouy M, Azarsina M, Rezaie-soufi L, Alikhani MY. The antibacterial effect of sage extract ( *Salvia officinalis* ) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque : a. *Iran J Microbiol.* 2015;7(3):173–7.
72. Karakaya S. Bazı Bitkisel Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri , Antioksidan Aktiviteleri ve Siyah Çay Polifenollerinin in vitro Biyoyararlılığı. *GOÜ Ziraat Fakültesi Derg.* 2006;23(1):1–8.
73. Mart AL, Gonz ME. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L . var . *mexicana* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2007;109:140–5.
74. Hosadurga R, Boloor VA, Rao SN, MeghRani N. Effectiveness of two different herbal toothpaste formulations in the reduction of plaque and gingival inflammation in patients with established gingivitis – A randomized controlled trial. *J Tradit Complement Med [Internet].* 2018;8(1):113–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.04.005>
75. Thakkar PJ, Badakar CM, Hugar SM, Hallikerimath S. Comparative evaluation of effect of use of toothbrush with paste and mundident on levels of *Streptococcus mutans* and gingival health in children: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2017;35(4):312–8.
76. Sharif MO, Catleugh M, Merry A, Tickle M, Dunne SM, Brunton P, et al. Replacement versus repair of defective restorations in adults: resin composite. *Cochrane Libr [Internet].* 2014;(2). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD005971.pub3>
77. Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling

- materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements - A literature review. *Dent Mater* [Internet]. 2015;31(4):e89–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.12.005>
78. Ünlü N, Çetin AR. Kompozit Rezin Materyallerin İçeriklerindeki Yeni Gelişmeler. *Türkiye Klin J Dent Sci*. 2008;4(3):156–67.
79. Mg RA, Sahrman P, Pr S, Davis D. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(3).
80. Mutluay MS, Mutluay AT. Süt dişlerinde restoratif materyal seçimi ve etkileyen faktörler. *Selcuk Dent J*. 2016;3:151–8.
81. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, Van Der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010;89(7):657–65.
82. Burke FM, Ray NJ, Mcconnell RJ. Fluoride-containing restorative materials. *Int Dent J*. 2006;56:33–43.
83. Küçükeşmen C, Öztaş D, Küçükeşmen Ç, Kaplan R. Farklı Tiplerdeki Geleneksel ve Rezin-Modifiye Cam İyonomer Simanların Su Emilimi ve Suda Çözünürlüğü. *AÜ Diş Hek Fak Derg*. 2005;32(1):25–34.
84. Fúcio SBP, Carvalho FG, Sobrinho LC, Sinhoreti MAC, Puppim-Rontani RM. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic restorative materials-An in vitro study. *J Dent*. 2008;36(10):833–9.
85. Compomers PRC. Poliasit Modifiye Reçine Kompozitler ( Kompomerler ). *Ondokuz Mayıs Üni Dişhekimliği Fakültesi Derg*. 2001;6:36–43.
86. Bourbia M, Ma D, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y. Cariogenic bacteria degrade dental resin composites and adhesives. *J Dent Res*. 2013;92(11):989–94.
87. Gautam AK, Thakur R, Shashikiran ND, Shilpy S, Agarwal N, Tiwari S. Degradation of Resin Restorative Materials by *Streptococcus Mutans*: A Pilot

- Study. *J Clin Pediatr Dent.* 2017;41(3):225–7.
88. Duque C, De Cássia Negrini T, Spolidorio DMP, Hebling J. Effect of light-activation on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *Brazilian J Oral Sci.* 2013;8(4):175–80.
  89. Ionescu A, Wutscher E, Brambilla E, Schneider-Feyrer S, Giessibl FJ, Hahnel S. Influence of surface properties of resin-based composites on in vitro *Streptococcus mutans* biofilm development. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(5):458–65.
  90. Brambilla E, Ionescu A, Gagliani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: An in situ study on the effect of chlorhexidine mouthrinses. *Int J Artif Organs.* 2012;35(10):792–9.
  91. Orłowski M, Tarczydło B, Chałas R. Evaluation of marginal integrity of four bulk-fill dental composite materials: In vitro study. *Sci World J.* 2015;2015.
  92. Atalayın Ç, Yaşa E, Karaçolak G, Sarı T, Türkün LŞ. Farklı modlarda kullanılan ışık kaynağı ile sertleştirilen bulk- fill kompozit rezinlerin pulpa odasında oluşturduğu sıcaklık değişimlerinin değerlendirilmesi : ex vivo. *Off J Gazi Univ Fac Dent.* 2017;34(2):55–60.
  93. Wongpraparatanana I, Matangkasombut O, Thanyasrisung P, Panich M. Effect of Vital Tooth Bleaching on Surface Roughness and Streptococcal Biofilm Formation on Direct Tooth-Colored Restorative Materials. *Oper Dent [Internet].* 2017;16–366–L. Available from: <http://www.jopdentonline.org/doi/10.2341/16-366-L>
  94. Teranaka A, Tomiyama K, Ohashi K, Miyake K, Shimizu T, Hamada N, et al. Relevance of surface characteristics in the adhesiveness of polymicrobial biofilms to crown restoration materials. *J Oral Sci.* 2017;(6):1–8.
  95. Samoilova Z, Muzyka N, Lepekhina E, Oktyabrsky O, Smirnova G. Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014;105(4):709–22.
  96. Güneş Altuntaş E, Diani M, Badali MN, Yener İlçe B, Akçelik N, Akçelik M.

Comparison of two different evaluation methods for biofilm formation of bacteria isolated from teeth. In: ECCMID, 27-30 April 2013, Berlin, Almanya. 2013.

97. Halkman K. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. 2005.
98. Choi JE, Waddell JN, Lyons KM, Kieser JA. Oral Rehabilitation Intraoral pH and temperature during sleep with and without mouth breathing. *J Oral Rehabil.* 2016;43:356–63.
99. Ma Y, Marquis RE. Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic-acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 1997;72(2):91–100.
100. Kim I, Yang M, Lee O, Kang S. Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *Int J Mol Sci.* 2011;12:4120–31.
101. Babu V, Gangadevi T, Subramoniam A. Antidiabetic Activity of Ethanol Extract of *Cassia kleinii* Leaf In Streptozotocin -Induced Diabetic Rats and Isolation of An Active Fraction and Toxicity Evaluation of The Extract. *Indian J Pharmacol.* 2003;35:290–6.
102. Lucke F, Schillinger U. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(8):1901–6.
103. Sanger F, Nicklen S. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463–7.
104. Güngör ÖE, Kirzioğlu Z, Dinçer E, Kivanç M. Who will win the race in childrens' oral cavities? *Streptococcus mutans* or beneficial lactic acid bacteria? *Benef Microbes.* 2013;4(3):237–46.
105. Liu Y, Chu L, Wu F, Guo L, Li M, Wang Y, et al. Influence of pH on inhibition of *Streptococcus mutans* by *Streptococcus oligofermentans*. *Eur J Oral Sci.* 2014;122(1):57–61.
106. Welin-Neilands J, Svensäter G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus*

- mutans. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(17):5633–8.
107. George DE, Shetty R, Shetty PJ, Gomes LA. An In vitro Study to Compare the Effect of Different Types of Tea with Chlorhexidine on *Streptococcus mutans*. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(9):ZC05-ZC07.
  108. Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB. Consumption of high doses of chlorogenic acid , present in coffee , or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:532–8.
  109. Fitsiou I, Tzakou O, Hancianu M, Poiata A. Volatile constituents and antimicrobial activity of *tilia tomentosa moench* and *tilia cordata miller* oils. *J Essent Oil Res.* 2007;19(2):183–5.
  110. Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia* (*Tilia argentea Desf ex DC*), sage (*Salvia triloba L.*), and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem.* 2000;48(10):5030–4.
  111. Yadav P, Gupta S, Singh C, Anand S, Masih U, Hegde DY. Comparative Evaluation of Antimicrobial Potential of Ginger, Garlic and Cinnamon Extracts Againsts *Streptococcus Mutans* and *Lactobacillus Acidophilus*. *Int J Adv Res Int J Adv Res [Internet].* 2017;5(53):2320–5407. Available from: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/3519>

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Burcu TÜRKMEN

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 08.09.1990

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi (2004-2008)

**Lisans:** Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği (2008-2013)

### **İş Tecrübesi**

**Kurumu:** Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

**Görevi:** Gıda Mühendisi

**Yılları:** 2016- ...

## 9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

### Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler

**Türkmen, B.**, Ayhan, K., Altuntaş, E.G. 2016. Dental Plak Oluşumundan Sorumlu Mikroorganizmalar ve Bunların Tüketilen Gıdalarla İlişkisi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı: 51-61.

### Ulusal Kongrelerde Sunulan Posterler

Gür, G., Demirsoy, F.F.K., Demirel, G., Altuntaş, E.G., İlçe, B.Y., **Türkmen, B.**, Kılıçarslan, M.A. 2017. Bulk-fill kompozitlerin fibroblast hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin ICELLigence sistemi ile belirlenmesi. 15. Ulusal Tıbbi biyoloji ve Genetik Kongresi. 26-29 Ekim 2017, Fethiye, Muğla, Türkiye.

Altuntaş, E.G., **Türkmen, B.**, Ayhan, K. 2015. Dental plak oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar ve bunların tüketilen gıdalarla ilişkisi. İç Anadolu Bölgesi, 2. Tarım ve Gıda Kongresi, Poster No: 17, Syf No: 270, 28-30 Nisan 2015, Nevşehir.

TCCAGG - CGTGAA TCCAGG CGTGAA  
AACGGG AAGGCA AACGGG AAGGCA  
AGTCTT GAAGG GAAGG GAAGG  
GGACAG ATTACG GGACAG ATTACG  
TATCCA CTGCTC TATCCA CTGCTC  
CGTGTAGTGC CGTGTAGTGC  
ACACCACTT ACACCACTT  
GGAGTTG GGAGTTG  
ATAAGSSTG ATAAGSSTG  
AAGAGATAGAA AAGAGATAGAA  
AGGTT CAGCTT AGGTT CAGCTT  
CTCTAC GAACCA CTCTAC GAACCA  
AGGGG CATTAT AGGGG CATTAT  
GGTAG TGGGT TAGAGC GGTAG TGGGT  
GGGCGC GCTAAT GGGCGC GCTAAT  
GAAC CCAT TGTG CTGT



# ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ

ULUSLARARASI KATILIMLI

26-29 EKİM 2017  
Liberty Lykia Resort Hotel  
ÖLÜDENİZ FETHİYE

# KONGRE KİTABI

[www.tbqder.org](http://www.tbqder.org)

d

## PS - 153

**Bulk-fill kompozitlerin fibroblast hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin ICELLigence sistemi ile belirlenmesi**

Gürkan Gür<sup>1</sup>, Fatma Funda Kaya Demirsoy<sup>2</sup>, Gülbike Demirel<sup>1</sup>, Evrim Güneş Altıntaş<sup>2</sup>, Burcu Yener İlçe<sup>2</sup>, Burcu Türkmen<sup>2</sup>, Mehmet Ali Kılıçarslan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Bölümü, Ankara, 06500 Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Enstitüsü, Ankara, 06100, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Bilimler Bölümü, Ankara, 06500, Türkiye

**Amaç:** Yeni 10 düşük büzülmeli bulk-fill kompozitin L-929 insan gingival fibroblast hücreleri üzerine olası sitotoksik etkisi gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi olan ICELLigence Sistemi ile değerlendirilmiş ve eş zamanlı olarak restoratif materyallerin biyofilm oluşumuna yatkınlık düzeyleri tespit edilmiştir.

**Gereç-Yöntem:** Sitotoksik etkinin araştırıldığı denemede ICELLigence sistemi tercih edilmiştir. Kompozit üzerinde bakteriyel biyofilm üretiminin tespiti için ise 12 kuyucuklu plaka yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada daha önce diş yüzeyinden izole edilmiş olan ve biyofilm üretme yeteneğinde olan 8 bakteri ve *Streptococcus mutans* ATCC 25175 kullanılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından materyaller yıkanmış ve fosfatlanmış tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile seyreltilmiştir. Tutunan bakteri sayısı Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri ile sayılmıştır.

**Bulgular:** Bu çalışmada, optimum hücre yoğunluğu 300 µL besiyerinde 2500 hücre olarak gözlenmiş olup, tüm kompozitlerin hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. "GC everx posterior" diğerlerine oranla en fazla sitotoksik etkiye sahip kompozit iken "Filtek Bulk-fill" daha düşük sitotoksik etki sergilemiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre her bir materyale tutunan bakteri sayısı 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> kob (koloni oluşturan birim) arasındadır. Materyal yüzeyi 50 mm<sup>2</sup> olarak hesaplanmış olup, biyofilm oluşum düzeyi 2x (10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup>) kob/mm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır.

**Sonuç:** Literatüre sağladığı katkının yanı sıra, bu çalışmadan elde edilen sonuçların, klinisyenlerin materyal seçiminde faydalı olacağı düşünülmektedir.

**The evaluation of cytotoxic effect of bulk-fill dental composites on fibroblast cells with ICELLigence system**

Gürkan Gür<sup>1</sup>, Fatma Funda Kaya Demirsoy<sup>2</sup>, Gülbike Demirel<sup>1</sup>, Evrim Güneş Altıntaş<sup>2</sup>, Burcu Yener İlçe<sup>2</sup>, Burcu Türkmen<sup>2</sup>, Mehmet Ali Kılıçarslan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Dentistry Department of Restorative Dentistry, Ankara University, Ankara, 06500, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University Biotechnology Institute System Biotechnology Advanced Research Unit, 06100, Ankara-Turkey

<sup>3</sup>Faculty of Dentistry Department of Prosthetic Dentistry, Ankara University, Ankara, 06500, Turkey

**Objective:** The cytotoxic effect of novel 10 low contraction bulk-fill composites on L-929 fibroblast cells were evaluated with ICELLigence system which is a real time cell analyse method, and simultaneously the biofilm formation tendency of the restorative material was determined.

**Materials-Methods:** ICELLigence system was chosen for the cytotoxic assay. The bacterial biofilm formation on these tested 10 novel composites was determined by 12-well plate technique. Eight bacteria from tooth surfaces previously isolated and the standard strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175 were used for this assay. After incubation at the 37 °C for 24 hours, the materials were washed, then diluted with phosphate buffered saline (PBS). Finally the microorganisms were counted on Tryptic Soy Agar (Merck) then the microbial adhesions were calculated.

**Results:** In this study, the optimal cell density was screened as 2500 cells in 300 µL medium and the results showed that all the composites incorporated to the study had cytotoxic effect on the cells. While the composite "GC everx posterior" was found the most cytotoxic one, "Filtek Bulk-fill" showed the minimal cytotoxic effect on the fibroblast cells. According to the results of this experiment the bacterial counts were determined between 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> cfu (colony forming unit) for each bulk-fill material which surface area was approximately 50 mm<sup>2</sup>. So it can be declared that the average of the biofilm formation on the materials was 2x(10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup>) cfu/mm<sup>2</sup>.

**Conclusion:** Finally besides the contribution to literature, the results of this study may be beneficial for material selection criteria of the clinicians.