



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**HYPERICUM PERFORATUM L. ve SEKONDER
METABOLİTLERİNİN PATOJENİK ORAL BAKTERİLERE
KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Feride BALLI

**Samsun
Eylül-2016**



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI

**HYPERICUM PERFORATUM L. ve SEKONDER
METABOLİTLERİNİN PATOJENİK ORAL BAKTERİLERE
KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Feride BALLI

Doç. Dr. Ayça Tuba ULUSOY YAMAK

**Samsun
Eylül-2016**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Feride BALLI tarafından Doç. Dr. Ayça Tuba ULUSOY YAMAK Danışmanlığında hazırlanan '*Hypericum perforatum* L. ve sekonder metabolitlerin patojenik oral bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 05/09/2016 tarihinde yapılan sınav ile Pedodonti Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Tamer TÜZÜNER, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ayça Tuba ULUSOY YAMAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Emine ŞEN TUNÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Mehmet Serhat ODABAŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bafra Meslek Yüksekokulu, Bilgisayar Teknolojileri Bölümü

Üye : Doç. Dr. Murat ÜNAL, Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her zaman ve her konuda yanımda olan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tezimin her aşamasında emeğini ve yardımını esirgemeyen çok kıymetli hocam, tez danışmanım, ablam Doç. Dr. Ayça Tuba ULUSOY YAMAK'a,

Eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve klinik deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım, Prof. Dr. Alp Erdin KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Aysun AVŞAR'a, Doç. Dr. Emine ŞEN TUNÇ'a, Doç. Dr. Sezin SEZGİN ÖZER'e, Doç. Dr. Erhan SARI'ya

Tezimin her aşamasında emeği olan, bilgi, beceri ve deneyimlerini hiç esirgmeden paylaşan, yoğun çalışma şartları arasında bana zaman ayıran, kendisini tanımaktan onur duyduğum Doç. Dr. Mehmet Serhat ODABAŞ'a,

Eğitimim boyunca fikir ve tecrübeleri ile bana destek olan Doç. Dr. Şule BAYRAK'a,

Çalıştığım süre boyunca ve sonrasında da yanımda olan, benimle her anımı paylaşan Dr. Dt. Türkan EĞİLMEZ ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Nuray TÜLOĞLU'na ve değerli Pedodonti Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca sonsuz sevgileri ve destekleriyle bugüne gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan canım aileme,

Hayatımın neredeyse her anında yanımda olan, koşullar ne olursa olsun sabrını desteğini, anlayışını esirgemeyen, sevgisiyle bana destek olan canım eşim Yrd. Doç. Dr. Umut BALLI'ya, hayatıma girdiği için çok şanslı olduğum, bu süreçte kendisinden kaldığım zaman için sorun çıkarmayan Nefes'ime,

Teşekkürlerimi borç bilirim...

*Bu araştırma projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca PYO.DİS.1904.12.008'numarasıyla desteklenmiştir.

ÖZET

HYPERICUM PERFORATUM L. ve SEKONDER METABOLİTLERİNİN PATOJENİK ORAL BAKTERİLERE KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, *Hypericum perforatum* L.'nin ve içindeki sekonder metabolitlerin, diş çürüğü ve periodontal hastalıklardan sorumlu mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisini araştırarak, bu bitkinin ve sekonder metabolitlerinin insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitelerini in vitro olarak incelemektir.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratı ve 6 ayrı sekonder metabolit (hyperforin, hypericin, hyperoside, quercetin, quercitrin, rutin) kullanıldı. Bu ürünlerin patojenik oral mikroorganizmalara [*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. albicans*] karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile incelenirken, MIC ve MBC değerleri de belirlendi. Tüm test materyallerinin oral dokular üzerine sitotoksitesi, insan gingival fibroblast hücreleri kullanılarak MTT analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerinin çalışmamızda test edilen tüm oral patojenlere etkisi istatistiki olarak klorheksidinden düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, periodontal hastalıkla ilişkili gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a karşı klorheksidine yakın değerlerde inhibisyon zonu oluşturduğu görülen quercitrin'in, gingival fibroblast hücreleri üzerine klorheksidin gibi şiddetli sitotoksite göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada, bitki ekstratlarının saf bileşikler olmaması nedeniyle bu yönde yapılacak çalışmaların sadece bitkileri değil sekonder metabolitleri de incelemesi, yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip, düşük sitotoksik etkili yeni antimikrobiyal ve antifungal bitki ekstratları ve sekonder metabolitlerin bulunmasını mümkün kılacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diş çürüğü; doğal antimikrobiyal ajanlar; hyperforin; hypericum perforatum L.; hyperoside; quercitrin.

Feride BALLI, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Eylül-2016

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE ANTIMICROBIAL EFFECTIVENESS OF HYPERICUM PERFORATUM L. and SECONDARY METABOLITES AGAINST PATHOGENIC ORAL BACTERIA

Aim: The purpose of this study was to investigate the antimicrobial effect of *Hypericum perforatum* L. and secondary metabolites on microorganisms responsible for dental caries and periodontal disease and to investigate their cytotoxic effect on human gingival fibroblast cell *in vitro*.

Material and Method: *Hypericum perforatum* L. plant extract and 6 different secondary metabolites (hyperforin, hypericin, hyperoside, quercetin, quercitrin, rutin) were used. Disk diffusion assay was performed to analyze the antimicrobial activities of these materials against the pathogenic oral microorganisms (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. albicans*) and MIC and MBC values were also determined. Cytotoxicity all test materials was investigated by MTT assay using human gingival fibroblast cells.

Results: According to antimicrobial analysis, the inhibitory effect of all test materials were found to be statistically lower than chlorhexidine. However, the quercitrin which was seen to create an inhibition zone against periodontal disease-associated gram-negative microorganisms and *C. albicans*, did not show severe cytotoxicity as chlorhexidine on gingival fibroblast cells

Conclusion: In this study, plant extracts due to lack of pure compounds, it was concluded that studies must examine not only plant, are also secondary metabolites. In this way, there will enable to find new antimicrobial and antifungal plant extracts and secondary metabolites, have high antimicrobial activity and low cytotoxic effective

Keywords: Dental caries; hyperforin; hypericum perforatum L.; hyperoside; quercitrin; natural antimicrobial products.

Feride BALLI, Ph. D. Thesis

Ondokuz Mayıs University – Samsun, September-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
CPC	: Setilpridinyum klorid
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMEM	: Eagle's Minimum Esseial Medium
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FDS	: Fetal dana serumu
gr	: Gram
IgA	: İmmünoglobulin A
IgG	: İmmünoglobulin G
IL-1β	: İnterlökin-1 β
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
NaF	: Sodyum florür
MDP	: Mikrobiyal dental plak
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μl	: mikrolitre
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre

- MBC** : Minimum bakterisid konsantrasyon
- MIC** : Minimum inhibitor konsantrasyon
- MTT** : 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
- rRNA** : Ribozomal RNA
- rpm** : Revolutions per minute
- SDA** : Sabouraud dextrose agar
- SLS** : Sodyum loril sülfat



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dental Plak.....	3
2.2. Dental Plağa Bağlı Gelişen Hastalıklar.....	4
2.2.1. Diş Çürüğü.....	4
2.2.2. Gingivitis.....	8
2.2.3. Periodontitis.....	10
2.3. Çürük ve Periodontal Hastalık Proflaksisi.....	12
2.3.1. Flor.....	12
2.3.2. Klasik Antibiyotikler.....	14
2.3.3. Enzimler.....	14
2.3.4. Metal İyonları.....	15
2.3.5. Kuarterner Amonyum Bileşenleri.....	15
2.3.6. Fenoller ve Esansiyel Yağlar.....	16
2.3.7. Deterjanlar.....	16
2.3.8. Amin alkoller.....	17
2.3.9. Bisbiguanidler.....	17
2.3.10. Doğal Ürünler.....	18
2.4. Hypericum Perforatum L.....	19
2.4.1. Hypericum Perforatum L. Bitkisinin Aktif Bileşenleri.....	21
2.4.2. Hypericum Perforatum L. Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivite.....	22
2.4.3. Hypericum Perforatum L. ve Diş Hekimliği.....	23
2.5. Araştırmanın Amacı.....	24
3. MATERYAL ve METOT.....	25
3.1. Mikroorganizmalar ve Kültivasyonu.....	25
3.2. Hypericum perforatum L. Bitkisinin Sekonder Bileşenleri.....	26
3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	27
3.3.1. MIC ve MBC testi.....	27

3.3.2. Disk Difüzyon Analizi.....	29
3.4. Sitotoksosite Analizi.....	30
3.4.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	31
3.4.2. MTT Testinin Uygulanması.....	32
3.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Bulguları.....	36
4.2. Sitotoksosite Analiz Bulguları.....	41
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	74

1. GİRİŞ

Diş çürüğü ve dişeti hastalıkları, insanların büyük bir kısmını cinsiyet, yaş, etnik köken gözetmeksizin etkileyen ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen enfeksiyöz hastalıklardır (Burt, 1998; Misra ve ark., 2007). Bu hastalıklarının primer etiyolojik faktörü, mikrobiyal dental plak içerisinde bulunan mikroorganizmalardır (Wilson ve Ashley, 1990). *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* gibi gram-pozitif asidojenik ve asidofilik özellikteki mikroorganizmalar, diş çürüğünün oluşumundan sorumlu bulunmuştur (de Soet ve ark., 1990; Tanzer ve ark., 2001). Özellikle *S. mutans*'lar 1980'li yıllardan itibaren, mikrobiyal florayı oluşturan mikroorganizmalar içerisinde diş çürüğüne neden olan başlıca patojen olarak kabul edilmektedir (Hamada ve Slade, 1980; Loesche, 1986; Haris ve ark., 2004). Lactobasiller ise diş çürüğünü başlatmaktan ziyade dentin dokusunun yıkımından, başka bir deyişle çürük lezyonunun ilerlemesinden sorumlu bulunmuştur (Fitzgerald ve ark., 1980; Brambilla ve ark., 2000; Çakır ve ark., 2010). *Candida albicans* ağız florasından izole edilebilen ve ağız mukozasına tutunabilen en yaygın mantar türüdür. Dentin dokusunda yüksek oranda yerleşim göstermekte, özellikle çocuklarda/adelosanolarda diş çürüğünün patogeneğinde aktif rol oynamaktadır (Gabris ve ark., 1999; Moalic ve ark., 2001; Beighton ve ark., 2004; Klinke ve ark., 2011). *Porphyromonas gingivalis* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ise periodontal hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynayan virülanslı yüksek mikroorganizmalardır (Newman ve ark., 2007).

Mikroorganizmaların bulunduğu mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasıyla diş çürüğü ve dişeti hastalıklarının oluşumunun engellendiği bildirilmiştir (Mc Danold ve ark., 2004; Norman ve ark., 2004; Roberson ve ark., 2011). Ancak çocukların diş fırçalama ve diş ipi kullanımı gibi mekanik temizliği yeterince etkin yapamadıkları, bununla birlikte uygun yapılan mekanik temizliğin bile mikrobiyal dental plağı uzaklaştırmada yeterli olmadığı bildirilmektedir (Loveren ve ark., 2000). Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, mekanik plak kontrolüne ek olarak florürün ve antimikrobiyal kemoteröpatiklerin kullanımının, bu hastalıklara karşı korunmada etkiyi arttırdığı belirtilmiştir (Tedesco, 2000; Davies ve ark., 2003). Ancak gelişmekte olan ülkelerde antimikrobiyal etkili maddelere karşı direnç gösteren oral mikroorganizmaların artmış olması ve kullanılan antimikrobiyal etkili ajanların dişleri

boyama, ağız kuruluğu, ülseratif gingivitis, doku irritasyonu, oral kanserler gibi yan etkilere sahip olmaları nedeniyle (Borrajo ve ark., 2002; Poggi ve ark., 2003; Lee ve ark., 2004; Silverman ve Wider, 2006; Addy, 2008; Lemos-Junior ve Villoria, 2008), bitkilerden elde edilen doğal antimikrobiyal bileşiklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Katsura ve ark., 2001; Botelho ve ark., 2007; Thaweboon ve Thaweboon, 2009; Sereviratne ve ark., 2011).

Halk arasında “sarı kantaron” olarak da bilinen *Hypericum perforatum L.* (*St. John's Wort*), Türkiye ve Avrupa’da yaygın olarak yetişen, antitümör, antiviral, antidepresan, antibakteriyal, antiinflamatuvar ve analjezik etkilere sahip olduğu bilinen, yabani bir bitkidir (Davis, 1988; Colasanti ve ark., 2000; Reichling ve ark., 2001). Rusya’da, değişik isimler altında ticari antibiyotik preparatı bulunan *Hypericum perforatum L.*’nin (Reichling ve ark., 2001; Saddle ve ark., 2010), antimikrobiyal etkinliği ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmış ve gram-pozitif/gram-negatif mikroorganizmalar üzerine etkinliğinin olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Avato ve ark., 2004; Milosevic ve ark., 2007; Sadiqe ve ark., 2010).

Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda *Hypericum perforatum L.* bitki ekstratının ve içerisinde bulunan 6 ayrı sekonder metabolitin, çürük ve periodontal hastalığa neden olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi aynı zamanda insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental Plak

Dental plak; dil, dudak, yanak ve tükürük ile mekanik olarak temizlenmeyen diş yüzeylerine yerleşmiş, beyaz-gri ya da beyaz-sarı renkli organik yığıntı olarak tanımlanmaktadır. Diş yüzeyine sıkıca yapışan, protein ve polisakkaritlerden oluşan, su spreyi ile uzaklaştırılmayan bu kitleler içinde çok sayıda mikroorganizma bulunmaktadır (Koray, 1981; Lindhe, 2008). Ağırlığı 1gr olan 1mm³ dental plakta, 500'den fazla farklı türde mikroorganizma bulunduğu için mikrobiyal dental plak (MDP) olarak tanımlamanın daha doğru olduğu bildirilmiştir (Quirynen, 2006).

MDP'nin diş üzerine birikimi; pelikül oluşumu, kolonizasyon ve olgunlaşma fazlarının sırasıyla gerçekleştiği oldukça organize ve düzenli olaylar zinciridir (Roberson ve Heyman, 2011). Pelikül; dişlerin fırçalanmasından hemen sonra dişler üzerine yerleşen, tükürük proteinleri (lizozim, albumin, IgA ve IgG) içeren, mikroorganizma bulundurmeyen, hücresiz, ince bir film tabakası olarak tanımlanmıştır (Quirynen, 2006; Lindhe, 2008; Roberson ve Heyman, 2011). Pelikülün fonksiyonunun, mineyi asit ataklarına karşı koruyarak demineralizasyonu engellemek ve remineralizasyon için matriks sağlamak olduğu açıklanmıştır. Ayrıca prolinden zengin proteinler, staterin ve musinöz proteinler gibi tükürük elemanları vasıtasıyla mikroorganizmaların diş yüzeyine tutunmasını kolaylaştırarak kolonize olabilecekleri bir ortam yarattığı da bildirilmektedir (Hicks ve ark., 2003).

Mikroorganizmaların pelikülün üzerine göç etmeleri ve diş yüzeyine tutunmaları ile ikinci faz olan kolonizasyon safhası başlamaktadır (Koray, 1981; Kidd, 2004). İlk yığılımı yapan mikroorganizmaların, diş yüzeyine tutunmayı sağlayan fimbriya yüzey yapısına sahip Streptococcus ve Actinomyces türleri olduğu ve MDP'nin iskeletini oluşturdukları bildirilmiştir (Lang ve ark, 2003; Quirynen, 2006). Yirmi dört saatin sonunda, oluşan MDP'nin çoğunlukla gram-pozitif kok olan streptokok türlerini içerdiği ve *Streptococcus sanguinis*'un bu organizmaların en göze çarpanı olduğu bildirilmektedir. İlerleyen süreçte ise, başlangıçta az sayıda görülen gram-pozitif çomakların giderek arttığı ve özellikle Actinomyces'lerin sayıca baskın türler olduğu açıklanmıştır (Roberson ve Heyman, 2011).

Son aşama olan olgunlaşma fazında ise, gram-pozitif kok ve çomakların üzerindeki yüzey reseptörlerinin, pelikula doğrudan tutunma yeteneği zayıf olan gram-negatif bakterilerin tutunmasına yardımcı olduğu bildirilmektedir (Lang ve ark, 2003; Garcia-Godoy ve Hicks, 2008). Mikrokolonilerin gelişmesi ve bakterilerin birbirine tutunması sonucu MDP'nin kalınlığının arttığı, zamanla yapısının daha karmaşık bir hal aldığı, gram-pozitif aerob türlerin artması ve oksijeni tüketmesiyle gram-negatif anaerob mikroorganizmalar (*Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*) için uygun zemin hazırlandığı açıklanmaktadır (Quirynen, 2006).

Lokal çevresel faktörlerin etkisi nedeniyle değişik lokalizasyonlarda yapısal olarak farklı MDP tipleri gelişmektedir (Lang ve ark, 2003; Garcia-Godoy ve Hicks, 2008). Örneğin dil sırtında, *Streptococcus salivarius* bakterisinin, dişlerde ise *Streptococcus sanguinis* ve *Streptococcus mitis* bakterilerinin baskın olduğu bir plak topluluğunun bulunduğu bildirilmiştir (Çakır ve ark., 2010; Roberson ve Heyman, 2011).

Dişler üzerinde oluşan MDP'nin biyofilm yapısında olduğu ve diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların oluşmasında primer etiyolojik faktör olarak kabul edildiği bildirilmektedir (Socransky ve ark, 1998; Suzuki ve ark, 2005).

2.2. Dental Plağa Bağlı Gelişen Hastalıklar

2.2.1. Diş Çürüğü

'Çürük' terimi, klinik olarak belirti vermeyen ve yüzeysel değişikliklerin gözlenmediği durumdan, klinik olarak tespit edilebilen (minenin mikroskobik ve makroskobik madde kaybına dentinin de katıldığı) durumların bütünü olarak tanımlanmıştır (Fejerskov, 1997; Kidd ve Fejerskov 2004; Pitt, 2004). Bu nedenle diş çürüğünün, kavite oluşumundan ziyade bir hastalık süreci olduğu bildirilmiştir (Featherstone, 2004; Kidd, 2011; Pitt, 2004).

Diş sert dokularının lokalize ve ilerleyici yıkımı ile karakterize hastalığı olan diş çürüğü, plak içerisindeki mikroorganizmaların karbonhidratları fermente ederek asit oluşturmaları ile başlayan, ardından diş sert dokularını oluşturan inorganik kalsiyum fosfat kristallerinin yıkımı sonucu kavite gelişimi ile sonuçlanan patolojik bir süreçtir (Loesche, 1986; Marcotte ve Lavoie, 1998; Abrams, 2010). Günümüzde enfeksiyöz bir hastalık olarak kabul edilen diş çürüğünün (Bowen, 1972), epidemiyolojik açıdan

bakıldığında çocukluk çağında gözlenen en yaygın kronik hastalık olduğu bildirilmiş ve astımdan 5 kez, yüksek ateşten 7 kez daha yaygın görüldüğü rapor edilmiştir (Krol 2003).

Diş Çürüğü Etiyolojisi

Diş çürüğü oluşum mekanizması ile ilgili olarak günümüze kadar pek çok hipotez öne sürülmüştür (Theilade, 1986; Loesche, 1992; Marsh; 1994; Balakrishnan ve ark, 2000). 16. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek'un mikroskop altında, plak bakterilerini belirlemesiyle çürük ve mikroorganizmalar arasındaki olası bağlantı kurulmuştur (Balakrishnan ve ark, 2000). Bunu takiben, pek çok araştırmacı tarafından mikroorganizmaların diş çürüğü ile olası ilişkisi incelenmiş ve 18. yüzyılın sonlarına doğru Willoughby Miller tarafından, değişime uğrayarak günümüze kadar ulaşan kemoparazitik teori öne sürülmüştür. Oral kavitede bulunan tüm bakterilerin potansiyel patojen kabul edildiği bu teori 'non-spesifik plak hipotezi' olarak bilinmektedir (Loesche, 1986; 1992; Marsh; 1994).

Clark (1924) tarafından diş çürüğü etiyojisinde streptokokların belirlenmesiyle ve insan diş çürüğü lezyonlarında bulunan karakteristik özelliklere sahip olan streptokoklara '*Streptococcus mutans*' ismi verilmesiyle önemli bir adım atılmış ve spesifik mikroorganizmalar üzerinde çalışmalara başlanmıştır. Yapılan birçok araştırmanın ardından Keyes (1960) tarafından albino hamsterlar üzerine yapılan bir çalışma sonucunda, zararlı karyojenik bakterilerin varlığından ilk kez söz edilmiş, aynı zamanda diş çürüğünün bulaşıcı bir hastalık olduğu bildirilmiştir. 'Spesifik plak hipotezi' olarak bilinen bu hipoteze göre; diş çürüğüne *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* gibi belirli bir kaç mikroorganizma türü sebep olmaktadır (Loesche, 1977; 1992).

Ardından spesifik ve non-spesifik plak hipotezlerinin bir araya getirilmesiyle ortaya çıkan ve günümüzde de geçerli olan ekolojik plak hipotezi ortaya çıkmıştır. Bu hipoteze göre diş çürüğü, oral kavitedeki mikrofloranın dengesindeki değişiklikler sonucu oluşmaktadır (Marsh, 1994; Fejerskov, 2004; Scheie ve Peterson, 2004). Ekolojik plak hipotezi, mikroorganizmaların sağlıklı bölgelerde de bulunabildiğini ancak klinik olarak çok düşük sayıda olduklarını ve hastalık oluşabilmesi için mikrofloranın dengesinin, lokal çevresel faktörlerden etkilenerek bozulması gerektiğini vurgulamaktadır (Fejerskov, 1997; Marsh, 1999; Featherstone, 2004).

Multifaktöriyel bir hastalık olan diş çürüğünün oluşumunda, mikroorganizmaların yanı sıra uygun konak, diyetle alınan karbonhidratlar ve zaman gibi direkt katkı sağlayan faktörlerle birlikte, tükürük, vücut savunma sistemi, sosyoekonomik durum, eğitim seviyesi, florid kullanımı, oral hijyen alışkanlıkları gibi kişisel ve çevresel faktörlerin de önemi açıklanmıştır (Koray, 1981; Newburn, 1989; Reich ve ark., 1999; Bowden, 2000; Haris ve Gorcia-Goday, 2004).

Diş Çürüğü Oluşumu

Çürük lezyonu, dişin belirli bir yüzeyinde, olgun biyofilm altında ve uzun bir süreçte oluşmaktadır (ten Cate, 2006). Diş çürüğünün oluşabilmesi için oral kavitedeki dengenin, lokal çevresel faktörlerle değişmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu değişiklik, tekrar eden şeker alımı ile birlikte asidofilik ve asidojenik mikroorganizmaların plak pH'sını düşürmeleri şeklindedir. Düşük pH durumunda mikroorganizmaların biyofilm içinde baskın hale geldikleri ve karbonhidratları metabolize ederek laktik, formik, asetik ve propionik asit gibi zayıf asitleri ürettikleri bildirilmiştir. Bu asitler, pH'ı kiritik değer (5,0-5,5) altına düşürerek minedeki hidroksiapatit kristallerinin demineralizasyonuna neden olmaktadır (Hics ve ark., 2003; Garcia-Godoy ve Hics, 2008). Bu hastalık mekanizması tüm diş çürüğü tiplerinde aynıdır ve mineral kaybıyla ilişkilidir. Mine yüzeyinden kalsiyumfosfat ve karbonatın kaybı minede çürük kavitesinin oluşumuna yol açmaktadır (Selwitz ve ark., 2007).

Bu demineralizasyon sürecinin erken safhada geri dönüşebilir olduğu; kalsiyum, fosfat ve floridin yakalanması ile remineralizasyonun gerçekleşeceği bildirilmiştir. Remineralizasyon, tükürükten demineralize diş yüzeyine mineral difüzyonunu içeren dişin doğal tamir mekanizmasıdır (Marsh ve ark., 1999). Diş yüzeyinde meydana gelen bu demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsü gün içerisinde birçok defa tekrarlanır. Eğer plak diş yüzeyinde uzun süre kalırsa bakteri aktivitesi sonucunda, plak altında geri dönüşümsüz çürük lezyonu oluşumu gerçekleşmektedir (Featherstone, 2004).

Diş Çürüğü Mikrobiyolojisi

Oral kavitedeki mikroorganizmaların karyojenik özellikleri; sert dokular üzerinde yaşama ve üreme yeteneklerine, sükröz tüketimi ile ilgili olarak dental plaktaki kolonizasyon düzeylerinin artmasına, düşük pH'da yaşayabilme özelliklerine, diş

yüzeğine adezyonu ve matriks üretimini kolaylaştıran ekstrasellüler polisakkarit ve intraselüler polisakkarit üretimlerine bağlıdır (Selwitz ve ark., 2007).

İnsanlarda ağız içi, farklı türde bakterin oluşturduğu kompleks bir ekosistem olarak bildirilmektedir (Smiech-Slomkowska ve Jablonska-Zrobek, 2007). Ağız ekosisteminde; dil sırtı, ağız mukozası, dişeti sıvısı, dişler üzerinde lokalize pit, fissür ve bazı düz yüzeyler gibi farklı ekolojik ortamlar bulunmaktadır. Bu ekolojik ortamların özel çevre koşullarına sahip olduğu ve oldukça farklı mikroorganizma topluluklarını barındırdıkları bildirilmiştir (Roberson ve ark., 2011).

MDP içerisindeki mikrofloranın belirlenmesi amacıyla pek çok çalışma yapılmasına rağmen, plakla ilişkili hastalıkların meydana geldiği alanda daha önce belirli bir mikrofloranın bulunması ve karyojenite (asit üretimi, asit toleransı, intraselüler ve ekstraselüler polisakkarit üretimi) ile ilgili özelliklerin tek bir tür ile sınırlandırılmaması, bu çalışmalardan elde edilen verilerin karşılaştırılmamasına neden olmuştur (de Soet ve ark., 2000).

Supragingival plakta bulunan birçok bakterinin glikolitik yolla çeşitli şekerleri metabolize ederek asit ürettiği ve ortamın pH'sını düşürdükleri bilinmektedir. Şeker alımı fazla olduğu zaman mutans streptokoklar, non-mutans streptokoklar ve Actinomyceslerin fazla şekeri intraselüler polisakkarit olarak depolayabildikleri ve şeker yokluğunda enerji üretmek için kullandıkları açıklanmıştır (van Houte ve ark.,1970; Takahashi ve ark.,1991). Ortaya çıkan final pH değerleri dikkate alındığında mutans streptokoklar, lactobasilluslar ve bifidobacterium'ların, non-mutans streptokoklara ve actinomyces'lere oranla daha asidojenik ve asidürik mikroorganizmalar olduğu (Johnson ve ark.,1990; Haukioja ve ark.,2008), ancak non-mutans streptokokların ve actinomyces'lerin de tükürükte bulunan musin gibi glikoproteinlerden şeker ve amino-şekerlerin serbest kalmasını sağlayan ekstraselüler glikozidlere sahip olduğu bildirilmiştir (Beighton ve Whiley, 1990; Whiley ve Beighton, 1998; Paddick ve ark.,2005).

Plak ile örtülü beyaz nokta mine lezyonlarında, mutans streptokok oranının, klinik olarak sağlıklı yüzeylere oranla daha fazla olduğu ancak yine de bu lezyonlardaki majör bakteri grubunun non-mutans streptokoklar olduğu bildirilmiştir (Sansone ve ark.,1993; van Houte ve ark.,1996). Bununla birlikte mutans streptokok ve laktobasil

yokluğunda da erken mikroflora üyeleri tarafından minenin çözünebileceği bildirilmektedir (Takahashi ve Nyvad, 2011).

Dentine ilerlemiş çürük lezyonundaki mutans streptokok oranı, total floranın yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır ve bu bilgi mutans streptokokların çürüğün ilerleyen aşamaları ile ilişkisini desteklemektedir. Bununla birlikte dentin çürüklerinde laktobasillus, prevotellae ve bifidobacterium gibi mikroorganizmaların mutans streptokoklara oranla daha baskın olduğu bildirilmiştir (Munson ve ark.,2004; Chhour ve ark.,2005; Aas ve ark.,2008; Mantzourani ve ark.,2009).

Bütün bu bulgular sonucunda çürüğün ilerlemesi ile birlikte, diş yüzeyindeki mikroflorada bulunan baskın mikroorganizma türünün değiştiği görülmektedir. En son moleküler tanımlayıcı yöntemler sayesinde klinik olarak sağlıklı ve çürük yüzeylerdeki mikrofloranın çok daha farklı olduğu ve %50-%60'ı kulture edilemeyen yüzlerce baskın tür içerdiği ortaya konulmuştur (Aas ve ark., 2008). Yine de bu çalışmalar sonucunda Lactobacillus, Bifidobacterium, Propionibacterium, non-mutans streptokok ve Actinomyces gibi *S. mutans* dışındaki bakteri türlerinin çürük sürecinde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Takahashi ve Nyvad, 2011).

2.2.2.Gingivitis

Periodonsiyum; dişeti, periodontal ligament, kök yüzeyini kaplayan sement ve alveol kemiğinden oluşan dokular bütünüdür. Bu dokularda meydana gelen hastalıklar periodontal hastalıklar olarak isimlendirilmektedir (Lindhe ve ark., 2008). Belirti ve semptomların dişeti ile sınırlı kaldığı, periodontal ataçman kaybının görülmediği veya azalmış periodonsiyuma rağmen ataçman seviyesinin stabil kaldığı marjinal dişeti iltihabı ile karakterize dişeti hastalığı 'gingivitis' olarak tanımlanmıştır (Newman ve ark., 2007).

Gingivitiste gözlenen başlangıç klinik bulgular; kırmızı-ödemli dişeti ve sondalamada kanamadır. Hastalık ilerlediğinde başlangıçta ödemli olan dokular fibrotik hale gelebilir. Normalde bıçak sırtı konturunda olan gingival marjin, yuvarlak formda olabilir, interdental papilla genişleyebilir ve dişetin hipertrofinine ve hiperplazisine bağlı olarak sondalama derinliği artabilir (Oh ve ark., 2002). Dünya Sağlık Örgütü periodontal hastalıkları, tüm toplumlarda görülen oldukça yaygın bir hastalık grubu olarak tanımlamaktadır. Bu hastalıkların sadece yetişkinlerle sınırlı olmadığı, çocuklarda ve adolesanlarda da sıklıkla görüldüğü (Petersen, 2003), gingivitisin, 7 yaş

üstü çocukların %70'ten fazlasını etkilediği açıklanmıştır (Stamm, 1986; Oh ve ark., 2002).

Gingivitisin Etiyolojisi

Gingivitis için primer etiyolojik ajan MDP olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte lokal, sistemik, çevresel ve genetik bir çok faktörün bu hastalığa yol açtığı bildirilmektedir (Newman ve ark., 2007).

Gingivitisin Oluşumu

Gingivitisin oluşması için, direk ve indirek yollarla dokularda patolojik değişimi başlatacak plak bakterilerinin bulunması gerekmektedir. Histopatolojik gözlemler sonucunda gingivitisin üç aşamada oluştuğu bildirilmiştir (The American Academy of Periodontology, 1999).

Başlangıç lezyonu, nötrofillerin infiltrasyonu ile akut inflamatuvar cevabın oluşması şeklindedir. Bu aşamada vasküler, epitelyal hücre değişiklikleri ve kollojen yıkımı görülmektedir. Bu ilk değişiklikler; bakteriyel bileşenler tarafından nötrofillerin kemotaktik çekimi, bakteriyel ürünlerin direk vasodilatör etkisi, konak sisteminin (kinin sistemi, arakinoid asit yolu) aktivasyonu nedeniyle meydana gelmektedir. İkinci aşama olan erken lezyonda, lenfoid hücre infiltrasyonunu sağlayan T lenfositler hakimken, son aşama olan yerleşmiş lezyonda B lenfositler ve plazma hücreleri hakimdir. Her ne kadar gingivitis lezyonunun başlaması ve ilerlemesini açıklayan spesifik mekanizmalar bulunmasa da kronik inflamatuvar infiltrasyon ve kollojen yıkımı erken ve yerleşmiş lezyonda karakteristikdir. Önemli olan nokta, dikkatli bir şekilde plağın uzaklaştırılması ile kalıcı doku yıkımı olmadan kronik gingivitisin iyileştirilebilmesidir (The American Academy of Periodontology, 1999).

Gingivitisin Mikrobiyolojisi

Gingivitisin mikrobiyolojisi her ne kadar kesin olarak tanımlanamasa da streptokok türleri, *Actinomyces viscosus*, *Peptostreptococcus micros* gibi gram-pozitif bakteriler ve *Campylobacter gracilis*, *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella* gibi gram-negatif bakteriler bu hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Kremer ve ark., 2000).

2.2.3.Periodontitis

Periodontitis, ilerleyen periodontal ligament ve alveol kemiği yıkımıyla birlikte periodontal cep oluşumu, dişeti çekilmesi veya her ikisinin birlikte görüldüğü diş destek dokularının kronik inflamatuvar hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Newman ve ark., 2007). Çocuklar ve adolosanlarda periodontitis formlarından herhangi biri (kronik periodontitis, agresiv periodontitis, sistemik hastalığa bağlı gelişen periodontitis) görülebilmekle birlikte agresiv periodontitise daha sık rastlanmaktadır (Oh ve ark., 2002).

Periodontitisin Etiyolojisi

Periodontitis patogenezinde mikrobiyal dental biofilm (MDB) primer etyolojik faktör olarak rol oynamaktadır. Bununla birlikte lokal, sistemik, çevresel ve genetik birçok faktörün de hastalığın etyolojisinde yer aldığı bilinmektedir (Newman ve ark., 2007). Risk, bir bireyin belirli bir süre içerisinde spesifik bir hastalığa yakalanma olasılığıdır. Bu olasılığı arttıran çevresel, davranışsal ve biyolojik faktörler “risk faktörleri” olarak bilinmektedir. Periodontitis için bu faktörler; sigara kullanımı, diabet, patojen bakteriler ve mikrobiyal diş eklentileridir (Newman ve ark., 2007).

Periodontitis Oluşumu

Periodontitisin karakteristik özelliği doku yıkımıdır. Mikroorganizmalar ve ürünleri tarafından konak dokuda yıkım, iki yolla gerçekleşmektedir. Mikroorganizmalar ve ürünlerinin dokuya geçişi ile bakteriyel enzim ve metabolik artıklarının dokuda nekroza ve hücre ölümüne neden olduğu yol, direkt; mikroorganizma ve mikrobiyal enzimlerin kemotaktik ajan olarak nötrofiller gibi konak inflamatuvar hücrelerini uyararak katabolik mekanizma aktivasyonuna neden olduğu yol, indirekt yol olarak tanımlanmaktadır (The American Academy of Periodontology, 1999). MDB içerisinde bulunan periodontopatojen bakterilerin endotoksin [lipopolisakkarit, (LPS)], lökotoksin, proteaz, kollajenaz, kondroitin sülfataz, asit fosfataz, fosfolipaz A, hidrojen sülfid, amonyak, yağ asitleri gibi virülans faktörleri konak ile etkileşime girerek periodontal dokularda yıkımı ve inflamatuvar cevabı başlatır (Socransky ve Haffajee, 1992). Bu etkileşimle periodontal dokularda histopatolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Periodontal vaskülaritede meydana gelen değişikliklerle damarlarda vazodilatasyon ve permeabilite artışı ortaya çıkar. Hastalığın

ilerlemesi ile nötrofiller dişeti oluğu içerisinde artarken; makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri dokuda sayıca artmaya başlamaktadır. Bakteri kaynaklı olan LPS, makrofajları aktive ederek IL-1 β , TNF- α (tümör nekrozu faktörü-alfa), MMP (matriksmetalloproteinaz) ve PGE₂ (prostaglandin E₂) üretimini indüklemektedir. Erken dönemde mikrobiyal saldırı engellenemez ise IL-1 β ve TNF- α ile aktive olan fibroblastlardan da MMP ve PGE₂ sentezi indüklenerek saldırı kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır (Page ve ark., 1997). MMP ve PGE₂ sentezi ile bağ dokusu ve alveol kemiğinde katobolik metabolizma oluşur, böylece periodontal doku yıkımının önemli bir kısmını oluşturan konak savunmasının hem koruyucu hem de yıkıcı özelliği ortaya çıkmış olur (Birkedal-Hansen, 1993).

Periodontitisin Mikrobiyolojisi

Mikrobiyal dental plakta fermente edilmiş organik asitler, sülfür bileşikleri, doku parçalayan enzimler, peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler gibi birçok bioaktif komponentler bulunmaktadır. Bu komponentlerin supragingival plaktan dişeti epitelinin yüzeyine difüze oldukları, periodontal dokulardan gelen inflamatuvar sıvıyı ve dişeti oluğu sıvısını arttırdıkları bildirilmiştir. Bu durum plaktaki ekosistemi değiştirerek, doku hasarını hızlandıran proteazı üreten proteolitik bakterilerin sayısının artmasına yol açmaktadır. Bu bilgiler proteaz üreten *P. gingivalis*, *B. forsythus* ve *T. denticola* gibi bakterilerin kronik periodontitisin başlamasındaki rollerini desteklemektedir (Newman ve ark., 2007). *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus micros*, ve *Treponema* türleri kronik periodontitis ile ilişkili bulunan diğer mikroorganizmalardır (Dzink ve ark., 1989).

Lokalize agresiv periodontitisin etiyolojisinde rol alan en önemli organizma *A. actinomycetemcomitans* olarak bildirilmiş ve hastalıklı alanların %90'ında baskın olarak izole edildiği açıklanmıştır (Zambon, 1994). Bununla birlikte *P. gingivalis*, *E. corrodens* ve *Campylobacter rectus* hastalık ile ilişkili bulunan diğer mikroorganizmalardır (Tatakis ve Kumar, 2005). Generalize agresiv periodontitiste ise hastalık teminolojisi zamanla değiştiği için mikrobiyal etiyoloji tam olarak tanımlanamamaktadır ancak kronik periodontitisten çok farklı olmadığı bildirilmektedir (Lee ve ark., 2003).

2.3. Çürük ve Periodontal Hastalık Proflaksisi

MDP, diş çürüğü ve periodontal hastalıkların etiyolojisinde ve ilerlemesinde belirleyici bir role sahip olduğu için, bu hastalıklardan korunmada birinci adımın MDP'nin uzaklaştırılması ve mikroorganizmaların eliminasyonu olduğu bildirilmiştir. MDP kontrolünün önemli bir parçası olan ve hasta tarafından uygulanabilen günlük mekanik temizliğin, diş çürüğünden ve periodontal hastalıklardan korunmada en etkili yöntemlerden biri olduğu açıklanmıştır (Ernst ve ark., 2005). Ancak pit, fissür ve aproksimal alanlardaki mikroorganizmaların diş fırçalama ve diş ipi kullanımı gibi mekanik yöntemlerle tamamen elimine edilemediği bildirilmektedir (Balakrishnan ve ark., 2000). Bu nedenle araştırmacılar, hastanın günlük ağız bakım rutinine mekanik plak kontrolünü destekleyici olarak florürün veya antimikrobiyal kemoteröpatiklerin eklenmesinin, diş çürüğü ve periodontal hastalıklara karşı korunmada etkiyi arttırdığını bildirmişlerdir (Tedesco, 2000; Davies ve ark., 2003).

2.3.1.Flor:

Flor, insan vücudu için yaşamsal değeri olan yedi eser elementten biridir. Oda sıcaklığında soluk, sarı-yeşil renkte bir gazdır. Bilinen en reaktif elementlerden olup, birçok organik ve inorganik madde ile reaksiyona girer. Doğada serbest halde bulunmaz. Genel olarak kriyolit (Na_3AlF_6), fluorosilikat (Na_2SiF_6), fluoroapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) veya kalsiyumflorid (CaF_2) gibi formlarda bulunmaktadır (Whitford, 1994)

1930'lu yıllarda çürük önleyici etkisinin anlaşılmasının ardından 1945 yılında suların florlanması gerçekleştirilmiş aynı yıllarda flor içeren diş macunu denemelerine de başlandığı bildirilmiştir (Rugg-Gunn ve Banoczy, 2013). 1970'li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü tarafından flor uygulaması, çürüğe karşı korumada uluslararası bir halk sağlığı yöntemi olarak kabul edilmiştir (Roseve ark., 1996; Rose ve Turner, 1998).

Florün çeşitli mekanizmalarla çürüğü önlediği bildirilmektedir:

- Minerin mineral yapısına katılarak hidroksiapatiti daha az çözünür olan fluoroapatite dönüştürdüğü ve asitler karşısında mine çözünürlüğünü azalttığı,
- Dental plağı doğrudan etkileyerek asit nedeniyle demineralize olan alanlarda diş minesinin tamirini sağladığı, remineralizasyonu desteklediği,
- Karyojenik bakterilerin metabolik aktivitelerini inhibe ederek çürük önleyici etki sağladığı açıklanmıştır. Başta enolaz enzimi olmak fosfataz, asetil

kolinesteraz, peroksidaz gibi glikoliz ve şeker taşınmasında yer alan birçok enzimi inhibe ederek bakterilerin asit üretimini engellediği bildirilmiştir (Balakrishnan ve ark., 2000).

Diş çürüğünü önlemek amacıyla diş macunlarına en sık ilave edilen terapötik ajanın florür olduğu bilinmektedir. Diş macunları yoluyla topikal florlama diş fırçalama gerektirdiğinden, işlem bir dereceye kadar plak kontrolü ile sonuçlanmaktadır. Plak tamamen kaldırılmamış olsa bile plak içindeki patojenik bakterilerin gelişmesi kontrol altına alınarak periodontal hastalık riskinin de azalacağı bildirilmektedir (Özalp, 2007).

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO), 1995 yılında diş macunları için maksimum flor iyonu konsantrasyonunu 1500 ppm olarak belirlemiştir (Zimmer, 2001). Diş macunlarında sodyum florür, sodyum monoflorofosfat ve kalay florür olmak üzere üç tip florüre izin verilmiştir. Bunlar içerisinde sadece sodyum florürün direkt olarak serbest florür sağladığı ancak kalsiyum kökenli abrazyivler yerine silika içeren abrazyiv sistem kullanılması gerektiği de bildirilmiştir (Winston ve Bhaskar, 1998). Gargaralarda florür bileşeni olarak sodyum florür, kalay florür, amin florür ve amonyum florür bileşikleri tercih edilebilmektedir. Piyasada rutin satılan preparatlar düşük potansiyelli nötr pH'lı, %0.05'lik NaF'lü olanlardır. Yüksek potansiyelli olanlar ise daha çok okullarda uygulamaya yönelik olarak kullanılmaktadır (Ripa, 1991).

Florun primer koruyucu etkisinin mineyle olan topikal teması sayesinde gerçekleştiği ve bu sayede antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle özellikle çocuklarda uygulanan farklı florür rejimlerinin odaklanması gereken asıl noktanın, maksimum topikal temasın sağlanması, bunun içinde tercihen düşük doz, fazla sıklıkla olan yaklaşımın tercih edilmesi gerektiği bildirilmektedir (Ercan ve ark., 2010).

Florun insan sağlığı üzerine olası riskleri florozis, akut veya kronik flor zehirlenmesi olarak bildirilmiştir.

Florozisin, mine oluşumu döneminde optimal dozun üstünde flor alımı sonucu gelişen, ince beyaz çizgilerle başlayarak tebeşirimsi-opak mineye kadar değişen klinik tablo ile karakterize mine displazisi olduğu belirtilmiştir. Günlük 2 mg ve üzerinde flor tüketiminin, hafif dereceli florozis gelişimine neden olduğu ve genellikle bu durumun içme sularında 1-1.5 ppm (mg/L)'den fazla flor bulunan bölgelerde görüldüğü açıklanmıştır. Renklenmenin, opak noktalardan, vakanın ağırlığına göre sarıdan

kahverengi şeritlere kadar değişebildiği vurgulanmıştır (Bohaty ve ark., 1989; Avcı ve ark., 2009).

Çocuklarda florun toksik dozunun 0.1-0.3 mg/kg, minimum letal dozun 5 mg/kg, letal dozun 15 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Akut flor zehirlenmesi sonucu mide bulantısı, kusma, ishal, karın ve baş ağrısı, baygınlık, uyku hali görüldüğü bunların ardından konvülsiyon, ekstremitelerde kasılma, aritmi, hipotansiyon ve bilinç kaybı olabileceği belirtilmiştir (Whitford, 1990; Akiniwa, 1997).

Kronik flor zehirlenmesi sonucu ise enzim inhibisyonu, hipokalsemi, kardiyovasküler kollaps ile birlikte iskelet sistemi lezyonları, kemik ağrısı, kemik kırıkları, ciltte kızarıklık, ağız ve dudaklarda yaralar görülebileceği açıklanmıştır (Avcı ve ark., 2009).

2.3.2.Klasik Antibiyotikler:

Diş çürüğü ve periodontal hastalıklardan korunmak amacıyla klasik antibiyotiklerin kullanımı üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. İlk olarak McClure ve Hewitt, yiyecek ve içeceklerine eklenen penisilinin ratlarda diş çürüğü ve *L. acidophilus* insidansını azalttığını bulmuşlar (Balakrishnan ve ark., 2000). Ardından hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan antibiyotiklerin test edildiği pek çok çalışma, McClure ve Hewitt'in çalışmasını destekler sonuçlar vermişlerdir (Fitzgerald, 1972; Jordan ve De Paola, 1974; Loesche ve ark., 1977; Maltz ve Zickert, 1982). Ancak klasik antibiyotikler, diş çürüğü ve periodontal hastalıkları önlemesine rağmen spesifik yan etkilerinden dolayı (normal florada dengesizlik oluşturması, hedef mikroorganizmaların direnç geliştirmesi, fırsatçı enfeksiyonlara eğilimin artırılması) günümüzde tercih edilmemektedir (Balakrishnan ve ark., 2000).

2.3.3.Enzimler

İki gruba ayrılmaktadırlar:

Birinci gruptakiler gerçek antimikrobiyal ajandan çok plak uzaklaştırıcı ajanlardır. Dekstranaz, mutanaz ve proteazlar dental plak kontrolünde hem çürüğü hem de gingivitis önleyebilen ajanlar olarak düşünülmüştür fakat bu ajanların özellikle mukozal erozyon gibi lokal yan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Addy ve Martin, 2003).

Konak savunma mekanizmasını artırmak için kullanılan ikinci grup enzimler glukozoksidaz ve amiloglukosidazdır. Amaç tükürük laktoperoksidaz sistemi aracılığıyla endojen ve ekzojen tiosiyanatı oral bakteriler özellikle de streptokoklar üzerinde inhibitör etki oluşturan hipotiyosiyanite çevirmektir. Enzim içeren diş macunları üretilmiştir, fakat gingivitis için faydaları hala şüphelidir ve yararlarıyla ilgili uzun dönem çalışmaları bulunmamaktadır (Addy ve Martin, 2003).

2.3.4.Metal İyonları

Metal tuzlarının plak inhibisyonu ve antimikrobiyal etkinlikleri yıllardır incelenmektedir ve çalışmaların çoğu bakır, kalay ve çinko üzerine yoğunlaşmıştır (Eley, 1999). Bu iyonların, bakterilerin glikolitik aktivitelerini indirgeyerek bakteriyel gelişimi engellediği bildirilmiştir (Philip ve ark., 2012). Tek başlarına kullanıldıklarında yüksek konsantrasyonlarda etkili oldukları ancak bu konsantrasyonlarda tat, toksisite ve dişleri boyama gibi problemlerin ortaya çıktığı belirtilmiştir (Addy ve Martin, 2003). Diğer antiseptiklerle kombine kullanıldıklarında ise bu ürünlerin etkilerini arttırdıkları bildirilmiştir. Örneğin çinkonun hekzetidin, triklosan ve sanguinarin ile birlikte kullanımının plak üzerinde ilave inhibitör etki sağladığı bildirilmektedir (Eley, 1999).

2.3.5.Kuartern Amonyum Bileşikleri:

Benzilkonyum klorid ve Setilpridinyum klorid (CPC), kuartern amonyum bileşiklerinden en çok araştırılanlardır. Bu katyonik antiseptik ve yüzey aktif ajanların gram-pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Philip ve ark., 2012). Özellikle CPC'nin klorheksidine eşdeğerde antimikrobiyal etki gösterdiği ve bu etkiyi pozitif yüklü moleküllerin, bakteri hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfat ile reaksiyona girerek oluşturduğu, böylece bakteri hücre duvarında bozulma sağladığı bildirilmektedir (Balakrishnan ve ark., 2000; Philip ve ark., 2012). Ancak her ne kadar çok iyi bir başlangıç oral retansiyonu ve klorheksidine eşdeğerde antimikrobiyal aktivitesi olsa da plak inhibisyonunda ve gingivitisin engellenmesinde daha az etkili olduğu açıklanmıştır. Bunun sebebi olarak da oral mukozaya tutunur tutunmaz aktivitesini kaybetmesi ya da hızlı yüzeysel salınımı nedeniyle etkisinin sadece 3-5 saat olması verilmektedir (Eley, 1999). CPC'nin etkinliğinin günde dört kez kullanım sıklığı ile artabileceği fakat bu kullanım şeklinin diş renklenmesi, diş taşı oluşumunda artış,

yanma hissi ve deskuamasyon gibi yan etkilere sebep olacağı bildirilmiştir (Addy ve Martin, 2003;).

2.3.6.Fenoller ve Esansiyel yağlar

Fenoller ve esansiyel yağların uzun yıllardır diş macunu, gargara ve pastillerde kullanıldığı bildirilmektedir. Klorheksidin kadar etkili olmamasına rağmen antiplak aktivitesi çok sayıda çalışma ile desteklenmiştir (Eley, 1999; Addy ve Martin, 2003). Triklosan (2,4,4' trichlor-2'-hydroxydiphenyl ether) hem gram-pozitif hem de gram-negatif mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip, iyonik olmayan bir fenoldür. Aynı zamanda micobakteri ve candida türlerine karşı da spesifik bir etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Sitoplazmik membranda görev alarak hücre içerisinde sızıntıya neden olduğu böylece bakteriyoliz ve hücre ölümü gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Philip ve ark., 2012). 1990'ların başında diş macunlarının içine eklenmeye başlanan triklosanın, ağızda birkaç saatten fazla kalmadığı bildirilmiştir. Ancak çinko sitrat veya kopolimer ile kombine kullanıldığında yavaş salınım sağlandığı ve böylece klinik etkinin arttığı bildirilmektedir (Robertshaw ve Leppard, 2007). Bazı çalışmalarda triklosanlı diş macunlarının plak miktarının azaltılmasından daha çok gingivitise yarar sağladığı görülmüş ve bu durum, ajanın prostoglandin ve lökotrienleri inhibe ederek inflamasyonu azaltmasına bağlanmıştır (Addy ve Martin, 2003; Philip ve ark., 2012).

Listerin, esansiyel yağ/fenolik bir ürün olup, FDA (Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi) Dental Plak Komitesi tarafından güvenli ve etkili bulunmuş, antiplak ve antigingivitis özelliklere sahip ağız gargarası olarak tavsiye edilmiştir. Spesifik formülasyonu; %0.092 ekalıptol, %0.042 mentol, %0.06 metil salisilat, %0.064 timol ve %21.6-%26.9 alkol olarak bildirilmiştir (Fine, 1988). Plak inhibisyonu açısından triklosandan daha etkili bulunurken, bakteri hücre duvarını yıkarak veya hücrel enzimatik aktiviteyi inhibe ederek gösterdiği antibakteriyel etki klorheksidinden daha düşük bulunmuştur (Kato ve ar., 1990; Moran ve ark., 1997). Bildirilen yan etkileri kötü tadı ve alkol içeriğinden dolayı oluşan yanma hissidir (Balakrishnan ve ark., 2000).

2.3.7.Deterjanlar

Sodyum loril sülfat (SLS), diş macunu ve gargara gibi ürünlerde günümüzde en yaygın kullanılan, protein moleküllerine yüksek afinitesi olan hidrofobik organik kısma

sahip, anyonik bir deterjandır (Adams ve Addy, 1994). Kararlı yapıdadır, diş macununun diş üzerinde kolay kullanımını sağlayan düşük yüzey gerilimine sahiptir, tadının maskelenmesi kolaydır ve diğer maddelerle uyumludur (Harris ve Garcia-Godoy, 2004). Köpürücü ajan olarak fonksiyon gören bu deterjanın protein denatüre etme yeteneği ve özellikle mutans streptokoklar üzerinde antimikrobiyal aktivitesi bildirilmiştir (Joiner ve ark., 2008). Yüksek dozlarda mukozal deskuamasyona ve ülserasyonlara sebep olabileceği bildirilen SLS'nin ticari olarak izin verilen diş macunu dozunun %1-3 olduğu bildirilmiştir (Kuttan ve ark., 2001; Quirynen ve ark., 2001).

2.3.8.Amin Alkoller

Bu gruptaki bileşikler, antimikrobiyal etkiden çok antiplak özellik göstermektedirler (Simonsson ve ark., 1991; Collaert ve ark., 1992). Oktopenol, antiplak ajan olarak etkili olduğu gösterilen ilk maddedir; fakat toksikolojik nedenlerle vazgeçilmiştir. Delmopinolün, gargaralarda %0,1 ve %0,2'lik konsantrasyonlarda plak inhibitör ve antigingivitis ajan olarak etkili olduğu gösterilmiştir (Collaert ve ark., 1992). Bu etkisini, plak oluşumunun erken safhasında rol alan mikroorganizmaların matriksinin oluşumunu inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir (Simonsson ve ark., 1991). Böylece bakteriyel adezyonu engellediği, plağın diş üzerine bağlanmasını durdurduğu ve mekanik yöntemlerle plağın kolaylıkla uzaklaştırılmasını sağladığı açıklanmıştır (Eley, 1999). Dil ve dişleri boyaması, rahatsız edici tadı, mukozada ağrı, yanma hissi ve ülserasyon gibi yan etkileri nedeniyle günümüzde kullanıldığı ticari bir ürün bulunmamaktadır (Philip ve ark, 2012).

2.3.9.Bisbiguanidler

Klorheksidin, aleksidin ve oktenidin gibi pek çok bisbiguanidin antiplak aktivitesi bildirilmekle birlikte grubun en çok bilinen, en fazla araştırılan ve kullanılan ajanı klorheksidindir (Addy, 1986). Klorheksidin diglukonat (1:6-Di 4'-chlorophenyl-diguanidohexane), katyonik bis-biguanid olup geniş spektrumlu sentetik bir antimikrobiyal ajandır (Adams ve Addy, 1994; Eley, 1999). Antiplak etkisi ilk olarak 1970 yılında Loe ve Schiott tarafından bildirilmiştir (Adams ve Addy, 1994). 1989 yılında Amerika'da %0,12'lik solusyonu piyasaya sürülmüştür ve günümüzde kullanılmaya devam etmektedir (Autio-Gold, 2008).

Klorheksidinin gram-pozitif/gram-negatif mikroorganizmalara, mayalara, mantarlara karşı antimikrobiyal etkisi ve antiplak aktivitesi pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Almas ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2008; Malhotra ve ark., 2011; Todkar ve ark., 2012). Pozitif yüklü klorheksidin molekülünün mine pelikülü, ağız mukozası ve hidroksiapatit gibi çeşitli yüzeylere bağlanabildiği böylece pit, fissür, aproksimal alanlar dahil olmak üzere birçok yüzeyde antiplak aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Balakrishnan ve ark., 2000). Aynı zamanda negatif yüklü bakteri yüzeylerine bağlanarak ve hücre membranı geçirgenliğini arttırarak sitoplazmik makromoleküllerin koagülasyonuna yol açtığı ve böylece antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmektedir (Eley, 1999). Düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etkiye sahipken yüksek konsantrasyonlarda bakteriosidal etki gösterdiği açıklanmıştır (Philip ve ark., 2012).

Klorheksidinin gastrointestinal sistem tarafından emilimi az olduğu için çok düşük toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir. En fazla görülen yan etkileri, kötü tat, dişlerde ve dilde çıkartılması zor olan kahverengi renklenmeler, subgingival diştaşı oluşumunda artış, mukozal erozyon ve parotiste şişlik olarak belirtilmiştir. Bu nedenlerden dolayı klorheksidinin uzun süre kullanımından kaçınılması, 2 hafta gibi kısa zaman periodlarında kullanılması tavsiye edilmiştir (Addy, 1986; Eley, 1999).

2.3.10. Doğal Ürünler

Oral hastalıklardan korunmak ve onları tedavi etmek amacıyla doğal ürünlerin kullanımı yüzyıllar öncesine uzanmaktadır. Bilinen en eski kayıttan, içerisinde diş macunu ve gargara reçetelerinin de bulunduğu belirtilen ve MÖ. 1500'lü yıllarda yazıldığı düşünülen Ebers Papirüs olduğu bildirilmektedir (Jeon ve ark., 2011).

Son yıllarda özellikle gelişmekte olan ülkelerde antimikrobiyal etkili maddelere karşı direnç gösteren oral mikroorganizmaların artmış olması ve ticari ürünlerin çeşitli yan etkilere (kötü tat, boyanma, ağız kuruluğu, ülseratif gingivitis, doku irritasyonu, oral kanserler, hipoglisemi) sahip olmaları, doğal ürünlere olan eğilimi yeniden arttırmıştır (Lee ve ark., 2004). Bitkilerden elde edilecek ilaçların günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik ajanlara iyi bir alternatif oluşturabileceği düşünülmekte ve bu konuda pek çok çalışma yapılmaktadır (Palombo, 2011). Yapılan çalışmalar ve araştırmalar sonucunda bitki ekstraksiyonları ve sekonder metabolitler içeren çeşitli ürünler piyasaya sürülmüştür. Bu ürünlerden biri Amerika ve Kanada'da

yetişen *Sanguinaria Canadensis* adlı bitkinin kök kısmından elde edilen bir alkoloit ekstresi olan **Sanguinarin** (Viadent)'dir (Adams ve Addy, 1994; Eley, 1999). Çinko tuzları ile kombine edilerek diş macunu ve gargaralarda kullanılan Sanguinarin'in antiplak ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Balakrishnan ve ark., 2000). Bir diğer ürün sodyum bikarbonat, sodyum florid ve çeşitli bitki ekstratları içeren **Parodontax** (GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom)'tır. Parodontax'ın, içerisinde bulunan papatya ekstratı ile antiinflamatuvar, ekinezya ekstratı ile immün cevabı stimüle etme, adaçayı ekstratı ile kanamayı azaltma, nane ekstratı ile antiseptik ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Pistorius ve ark., 2003). Biyopolisakkarit kitinden (*Chitin*) elde edilen, polikasyonik karbonhidrat yapısında olan ve diş macunu formülasyonu bulunan bir diğer doğal ürün **Chitosan**'dır. Antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenen Chitosan'ın toksik etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Verkaik ve ark., 2011).

Sistematikçilerin bildirdiğine göre, bugün dünyada tanımı yapılmış yaklaşık beş yüz bin adet bitki bulunmakta ve bu bitkilerin sadece %1'i tıbbi amaçlı araştırılmaktadır (Palombo, 2011).

Tıbbi bitkiler içerisinde özellikle *Hypericum* türleri, farklı biyolojik özelliklere sahip sekonder metabolit içermeleri nedeniyle, bilimsel olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Dünyanın ılıman bölgelerinde doğal yayılış gösteren 400 kadar *Hypericum* türü bildirilmiştir. Ülkemiz *Hypericum* türleri için önemli bir merkezdir ve mevcut 89 türün 43'ü endemiktir. Bu türler içerisinde en yaygın ve popüler olanı ise *Hypericum perforatum L.*'dir (Davis, 1988).

2.4. *Hypericum Perforatum L.*

Hypericum perforatum L. ülkemizde, sarı kantaron, binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu, koyun kıran, mayasıl otu ve yara otu gibi yöresel adlar ile anılmakta olup, Hypericaceae (Guttiferae, Clusiaceae) familyasına ait otsu bir bitkidir (Baytop, 1999). Türkiye'de bütün bölgelerde bulunan, deniz seviyesinden 2500 metreye kadar olan alanlarda yabani olarak yetişen çok yıllık bir bitkidir. Temmuz ayından Eylül ayına kadar çiçeklenen bitki 30-80 cm boyundadır. Yapraklar 10-35 mm uzunlukta, elips biçiminde ve hemen hemen sapsızdır (Şekil 1). Yapraklar ışığa karşı tutulduğunda yağ guddeleri, çok miktarda parlak noktacıklar halinde kolaylıkla görülür ve bu özelliğinden dolayı binbirdelik otu denmiştir (Baytop, 1999). Çiçekler beş parçalı, altın sarısı renkli,

kenarları siyah benekli tüyler ile çevrilidir. Tam olarak açmış bir çiçek parmakla ezildiğinde, ortaya çıkan kırmızı renk, bitkinin önemli bileşenlerinden biri olan hiperisinin rengidir ve bu renk nedeniyle kan otu adı verilmiştir (Yeşilada ve ark., 1995).

Hypericum, ‘huper’ ve ‘eikon’ sözcüklerinin birleşiminden oluşan ve ‘doğaüstü’ anlamına gelen Yunanca bir kelimedir. Eski çağlarda özel kokusu nedeniyle kötü ruhları kovduğuna inanıldığı için, bitkiye bu ismin verildiği düşünülmektedir. Hristiyan inancında kutsal bir yeri olan bu bitkinin, çiçeklenme dönemi yaklaşık olarak Saint John gününe (24 Haziran) denk geldiği için Avrupa’da ‘Saint John’un bitkisi’ (St. John’s Wort) olarak bilinmektedir (Lee, 1999; Linde, 2009).



Şekil 1. *Hypericum perforatum* L.’nin genel görüntüsü (Beerhues’den, 2006)

Hypericum perforatum L., ülkemizde kanser, şeker hastalığı, kronik romatizma, mide ülseri, mide-bağırsak hastalıkları, karaciğer-safra rahatsızlıkları, sarılık, bronşit, diyare, dizanteri, boğaz enfeksiyonları, soğuk algınlıkları, kurt düşürücü, antiseptik gibi çeşitli amaçlarla etnomedikal olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999). Bunların yanı sıra anti-viral özelliğe sahip olduğu ve bu nedenle AIDS tedavisinde kullanılabileceği bildirilen *Hypericum perforatum* L. ile ilgili farklı alanlarda yapılmış pek çok tıbbi çalışma bulunmaktadır (Sosa ve ark., 2007; Uysal ve ark., 2007; Çelik ve ark., 2010). Antiinflamatuvar (Kumar ve ark., 2001), antifungal (Rancic ve ark., 2005; Milosevic ve ark., 2007) ve yara iyileştirici (Rao ve ark., 1991)

etkileri kanıtlanmış olan *Hypericum perforatum* L., tüm dünyada antidepresan olarak tanınmış ve Almanya'da antidepresan ilaç olarak ruhsat almıştır (Kasper ve Schulz, 2000).

2.4.1. *Hypericum perforatum* L. Bitkisinin Aktif Bileşenleri

Hypericum perforatum L. farmakolojik aktiviteye katkıda bulunan birkaç grup komponent içermektedir. Bunlar, çiçek ve dallarında bulunan naphthodianthronlar, yine çiçek ve dallarında bulunan phloroglucinoller, yaprak-çiçek sapı ve dallarında bulunan flavonoidler, biflavonlar, phenylpropanlar gibi gruplardır. Bu majör gruplar dışında kuru *Hypericum perforatum* L. bitkisinin kondanse tanenler, xanthonlar, fenolik asitler ve esansiyel yağlar da içerdiği bildirilmiştir (Nahrstedt and Butterweck, 1997).

Naphthodianthronlar (hyperisin, pseudohyperisin, protohyperisin, protopseudohyperisin); Kırmızı renkleri ve fototoksik özellikleri sebebiyle *Hypericum perforatum* L.'nin karakteristik bileşikleridir. Bu grubun majör komponenti **hyperisin**'dir. Hyperisin, bitkinin kökü, yaprakları ve taze ovüllerinde ışığa tutulunca görülen küçük koyu bezlerde lokalize granüller olarak bulunur (Nahrstedt and Butterweck, 1997).

Düşük dozlarda depresyona karşı kullanılan hyperisin, fotosensibilizasyon meydana getiren bir maddedir. Bu bitkiyi yiyen beyaz tüylü hayvanlarda, güneş ışığı tesiri ile, deri ve mukozada yaralar ve genel metabolizma bozuklukları ile beliren bir hastalık (hypericismus) meydana gelmektedir. Hiperisin'in protein kinaz C inhibisyonu ile tümör hücreleri ve viruslar üzerine güçlü bir fotodinamik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Agostinis ve ark., 2002).

Phloroglucinoller (hyperforin, adhyperforin); Bu grupta bulunan metabolitler hyperforin ve ekstra metil grubu içeren adhyperforin'dir. **Hyperforin** *Hypericum perforatum* L.'in lipofilik bileşimidir. İn vitro olarak pek çok nörotransmitter sistemi inhibe ettiği gösterilmiştir. Serotonin, dopamin ve noradrenalinin güçlü bir inhibitörü olması, antidepresan aktivitede rol aldığını göstermektedir (Chatterjee et al., 1998). Aynı zamanda okside bileşikler ile sülfür-hidrojen grupları arasındaki reaksiyonda görev alan enzimleri ve okside bileşikler ile proteinler arasındaki reaksiyonda görev alan enzimleri toksisitesi ile inhibe ederek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Avato ve ark., 2004).

Flavonoidler (kaempferol, luteolin, rutin, hyperoside, quercitrin, isoquercitrin, quercetin, asbirtin); Aromatik bir halkaya sahip hidrosifenolik bileşiklerdir. Spazmolitik aktiviteye sahip olan bu bileşiklerin monoamin oksidaz A enzimini inhibe ettikleri ve antidepresan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Saddiye ve ark., 2010). Bitki tarafından mikrobiyal enfeksiyonlara cevap olarak sentezlenen bu bileşiklerin çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilerini, bakteri hücre duvarı ve ekstraselüler proteinler ile kompleks oluşturarak gerçekleştirdikleri bildirilmektedir (Tsuchiya ve ark., 1996; Cowan, 1999).

2.4.2. *Hypericum perforatum* L. Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Deri yaraları, yanıklar, nevralji ve depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan *Hypericum perforatum* L.'nin geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Saddiye ve ark., 2010). Flavonoidler, hyperisin özellikle de hyperforin sayesinde gösterdiği bu etki nedeniyle, Rusya'da aseton ekstratının bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. **Novoimanine** ve **Imanine** olarak isimlendirilen bu preparatların özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Reichling ve ark., 2001; Saddiye ve ark., 2010). *Hypericum perforatum* L.'nin antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır (Schempp ve ark., 1999; Meral ve Karabay, 2002; Avato ve ark., 2004; Milosevic ve ark., 2007; Mortensen ve ark., 2012; Rezusta ve ark., 2012). Bu çalışmalar sonucunda *Hypericum perforatum* L.'nin gram-negatif ve gram-pozitif pek çok mikroorganizmaya karşı antibakteriyel ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Antimikrobiyal etkisi sayesinde yara iyileştirici özelliğinin bulunduğu (Asgarpanah, 2012) ve enfekte deri yaralarında topikal antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (Avato ve ark., 2004).

Antimikrobiyal ajanlarda karşılaşılan en büyük problemin, mikroorganizmaların bu ajanlara karşı direnç geliştirmesidir. Hübner (2003), *Staphylococcus aureus*'un *Hypericum perforatum* L. içerisinde bulunan hyperforin'e direnç geliştirip geliştirmedeğini incelediği çalışmasında 0.025 µg/ml'den 4 µg/ml'ye değişen konsantrasyonlarda hyperforin sıvı seleksiyonunu kullanmış ve *Staphylococcus aureus*'un direnç geliştirmedeğini gözlemlemiştir.

2.4.3. *Hypericum perforatum* L. ve Diş Hekimliği

Son yıllarda diş hekimliği alanında da *Hypericum perforatum* L. ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmış olup, az sayıda literatür bulunmaktadır;

Sardella ve ark. (2008), yanan ağız sendromu bulunan bireylerde *Hypericum perforatum* L. ekstratının etkinliğini değerlendirmişlerdir. Yanan ağız sendromu nedeni bilinmeyen kronik yanma hissi ve dental-medikal nedenlerden bağımsız gelişen ağrı hissi ile karakterize bir sendromdur. 43 hasta üzerinde yapılan çalışmada test grubundaki bireylere *Hypericum perforatum* L. ekstratını içeren 300 mg'lık kapsül (hypericin-% 0.31, hyperforin-% 3.0) 12 haftalık süre boyunca kullanılmıştır. Süre sonunda plasebo kullanılan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ağız içerisinde semptomların görüldüğü bölge sayısında azalma gözlemlendi ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir.

Paterniti ve ark. (2010), deneysel olarak dişeti hastalığı oluşturulmuş ratlar üzerinde *Hypericum perforatum* L. ekstratının etkilerini değerlendirmişler ve *Hypericum* tedavisinin, ligatür bağlanması sonucunda meydana gelen gingivomukozal doku yaralanmasının ve alveolar kemik kaybının derecesini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca gingivomukozal dokuya göç eden polimorfonükleer hücrelerin ve proinflatuar sitokinlerden IL-1 β 'nin sayısını azaltarak antiinflatuar etki gösterdiğini açıklamışlardır. Bu bulgular doğrultusunda enflatuar bir hatalık olan periodontal hastalığın tedavisinde *Hypericum perforatum* L. ekstratının uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Lüthi ve ark. (2009), karyojenik bakterilerden *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*'a karşı hypericin'in fotodinamik antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. 0,625 μ g/ml'den 10 μ g/ml'e kadar değişen konsantrasyonlarda hypericin'in test edildiği çalışmada 2,5 μ g/ml hypericin'in *Streptococcus sobrinus*'a etkili olduğu gösterilirken, *Streptococcus mutans*'a hypericin'in yalnız başına etki etmediği ancak 0,625 μ g/ml foslipos ve hypericin karışımının etki ettiği gösterilmiştir.

Süntar ve ark. (2015), *Hypericum perforatum* L.'nin farklı ekstraksiyonlarının (etanol, n-hekzan, kloroform, etil asetat, n-butanol ve su ekstraktları) *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Enterococcus faecalis* üzerine antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmişler. Su ekstratının *S. mutans* (MIC:32 μ g/ml) ve *E. faecalis*'e (MIC:16 μ g/ml) kıyasla *S. sobrinus* ve *L. plantarum* (MIC:8 μ g/ml)'a

karşı daha güçlü antibakteriyal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Diğer ekstratlar *S. sobrinus*'a daha yüksek konsantrasyonda (MIC:16µg/ml) etki göstermiştir.

2.5. Araştırmanın Amacı

Yaptığımız tez çalışmamızın amacı, *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratının ve içeriğindeki antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilen sekonder metabolitlerin (hyperisin, hyperoside, hyperforin, quercetin, quercitrin, rutin) oral florada bulunan çürük ve periodontal hastalık oluşumundan sorumlu mikroorganizmalara [*S. mutans* (ATCC 35668), *S. mitis* (ATCC 903), *S. sanguinis* (ATCC 10556), *S. salivarius* (ATCC 13419), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *L. acidophilus* (ATCC 9224), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (ATCC 43718) karşı antimikrobiyal ve *Candida albicans* (ATCC 14053)'a karşı antifungal aktivitesini değerlendirmektir. Bununla birlikte *Hypericum perforatum* L. ekstratının ve içerisindeki sekonder metabolitlerin insan gingival fibroblast hücrelerine toksik etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma *Hypericum perforatum L.* (Sarı kantaron) bitkisinin antimikrobiyal analizi ve sitotoksisite analizi olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır.

Hypericum perforatum L. ekstratı ve içerisinde bulunan altı ayrı sekonder metabolitin patojen oral mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesinin amaçlandığı antimikrobiyal duyarlılık testleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Bitki ekstratının ve sekonder metabolitlerin insan gingival fibroblastlar üzerine toksik etkisinin değerlendirilmesinin amaçlandığı sitotoksisite analizi AntiMikrop Test Laboratuvarı (Trabzon Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Trabzon)'nda gerçekleştirildi.

3.1. Mikroorganizmalar ve Kültivasyonu

Çalışmamızda toplam 6 adet gram-pozitif bakteri, 2 adet gram-negatif bakteri ve 1 adet mantar türü kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan gram pozitif bakteriler;

- *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- *Streptococcus mitis* (ATCC 903)
- *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)
- *Streptococcus salivarius* (ATCC 13419)
- *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478)
- *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 9224)

Çalışmada kullanılan gram negatif bakteriler;

- *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718)

Çalışmada kullanılan mantar türü;

- *Candida albicans* (ATCC 10231)

Çalışmada kullandığımız mantar türü ve bakteriler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Stok bakteri suşlarının aktivasyonu için, koyun kanlı agar (HBA) (BD BBL, USA) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid, England) besiyerlerinde ekimler yapılmıştır. Gram pozitif bakteriyel suşlar 35 °C 'de 24 saat süre ile inkübe edilirken, gram negatif bakteriyel suşlar %5 CO₂, %10 H₂ ve %85 N₂ gaz karışımı

içeren poşet içerisinde (BD, USA), anaerobik ortamda 37 °C’de 48-72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Mantarların kültivasyonu, SDA içerisinde 37 °C’de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak *p. gingivalis*’in kültivasyonunda 5 µg/ml hemin ve 1 µg/ml vitamin K içeren Trypticase soy broth (TSB) kullanılmıştır. Saf üreme fazındaki mikroorganizma kültürleri, steril fosfat tamponlu salin solüsyonu (Oxoid, England) içerisine alınarak 0.5 McFarland (1x10⁶ hücre/ml) bulanıklığında süspansiyon hazırlanmıştır.

3.2. *Hypericum perforatum* L. Bitkisinin Sekonder Bileşenleri

Hypericum perforatum L. etanol ekstratı ve içerisinde bulunan 6 ayrı sekonder bileşik Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Germany)’ten satın alınmıştır (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışmamızda kullanılan *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve içerisinde bulunan sekonder bileşikler

Test materyalleri		Materyallerin başlangıç konsantrasyonları (mg/ml)
Hypericum perforatum L. ekstratı	SİGMA-1607506	50
Hypericin	SİGMA-56690	2.5
Hyperforin	SİGMA-H1792	1
Hyperoside	SİGMA- 00180585	5
Quercetin	SİGMA-Q4951	50
Quercitrin	SİGMA-Q3001	50
Rutin	SİGMA-84082	50
Klorheksidin	FGM Dental Products	%2 w/v

Satın alınan bu materyallerden *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve hyperforin üreticilerin tavsiyelerine göre çalışma zamanına kadar -20 °C’ de saklanırken diğer materyaller üreticilerin tavsiyelerine uygun olarak +4 °C’de saklandı. Katı halde bulunan *Hypericum perforatum* L., hypericin ve hyperforin üreticilerin tavsiyelerine göre Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek kullanıldı.

3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

3.3.1. MIC ve MBC Testi

Tüm test materyallerinin ve kontrol olarak kullanılan klorheksidinin, bakterilerin üremelerini engelleyecek en düşük konsantrasyon olan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve bakterileri öldürmek için gerekli olan en düşük konsantrasyon olan minimum bakterisid konsantrasyon (MBC) değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), M100-S17 (2007) yönergesine uygun olarak belirlendi.

Test materyallerinin MIC değerlerini belirlemek amacıyla; öncelikle katı besi yerinde üretilen bakterilerden 0.5 McFarland bulanıklığında, 1×10^6 konsantrasyonda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları, Katyon ilaveli Müller Hinton Broth¹ (%5 Koyun kanlı²) besi yeri ile 1/10 oranında dilüe edildi. *Candida albicans* için MOPS (3-[N-morpholino]propane-sulfonic acid, 3-morpholinopropanesulfonic acid) (Amresco, USA) ile tamponlanmış RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Media) (Sigma-Aldrich, Germany) besi yeri kullanıldı ve aynı oranda (1/10) dilüe edildi.

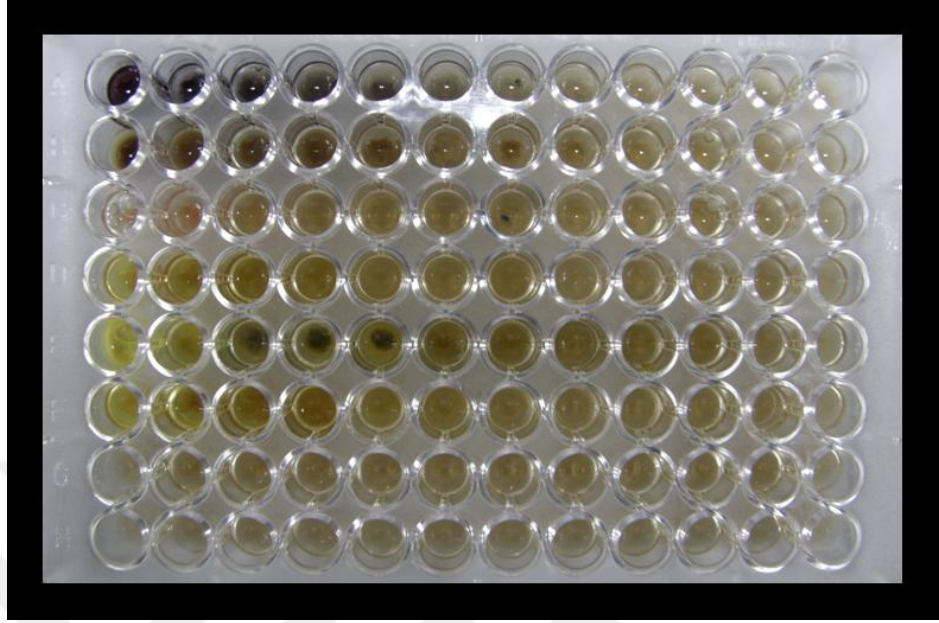
Hazırlanan mikroorganizma+besiyeri içeren bu süspansiyonlardan 100 µl, 96 kuyucuklu U tabanlı pleytlerin her kuyucuğuna yerleştirildi. Ardından ilk kuyucuklara 100µl test edilecek maddeler (Hypericum perforatum L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2.5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml), Rutin (50mg/ml), Klorheksidin (%2v/w) eklendi. Test materyallerinin DMSO ile dilüe edilerek hazırlanan %50, %25, %12,5, %6,25, %3,1, %1,56, %0,78 konsantrasyonları sırası ile bir alt kuyucuğa eklendi (Test materyallerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, konsantrasyonları test edilmiş oldu) (Tablo 2).

Daha sonra tüm kuyucuklara 10 µl mikroorganizma süspansiyonu (1/10 oranında dilüe edilmiş) ilave edildi (Şekil 5). 96 kuyucuklu pleyt'in son iki sırasındaki mikroorganizma-besiyeri süspansiyonları kontrol olarak kullanıldı ve herhangi bir etken madde ilave edilmedi. Ardından 96 kuyucuklu pleyt, 37°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe

¹ Katyon ilaveli Müller Hinton Broth (%5 Koyun kanlı) Hazırlanması: 100 ml'lik besi yeri hazırlamak için; 2.2 gr Muller Hilton Broth (BD BBL,USA) 95 ml distile suya ilave edilip otoklavlandı (121°C, 15 dk). Otoklavlanarak sterilize edilen besi yerine 5ml steril koyun kanı** ilave edildi.

² Besiyerine koyulacak koyun kanının hazırlanması: 1/1 oranında Kan/Steril su 50 ml'lik falkona konulup karıştırıldı. Falkon, -20°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün kan çözdürüldü ve tekrar -20°C'de bekletildi. Dondur-çöz olayı kan, lizis oluncaya kadar devam ettirildi. Lizis olan kan 12000 g'de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım alınıp alikotlanarak -20°C'de saklandı.

edildi. İnkübasyon sonrası mikroorganizma üremesinin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon, test edilen maddelerin MIC değerleri olarak kaydedildi.



Şekil 5. 96 kuyucuklu plate'in inhibisyon öncesi görüntüsü

Test materyallerinin MBC değerlerini belirlemek amacıyla; test materyallerinin 96 kuyucuklu pleytte belirlenen MIC değerleri hangi kuyucuğa denk geliyorsa, o kuyucuğa kadar olan kuyucuklardan 10'ar µl alınıp HBA ve SDA besi yerleri üzerine pasajlar yapıldı ve 37°C'lik etüvde 18-24 saat süre ile inkübe edildi. Koloni oluşumunun tespit edilmediği en düşük madde konsantrasyonu, test materyalinin MBC değeri olarak belirlendi.

Tablo 2: 96 kuyucuklu pleyte eklenen dilüe edilmiş madde konsantrasyonları

Madde konsantrasyonları(mg/ml)									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Hypericum perforatum L.	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.195
Hypericin	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.009
Hyperforin	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039
Hyperoside	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1562	0.0781	0.0390	0.0195
Quercetin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.195
Quercitrin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.1953
Rutin	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812	0.3906	0.1953
Klorheksidin	%2	%1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078

3.3.2. Disk Difüzyon Analizi

Patojen oral mikroorganizmaların *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve içerisinde bulunan sekonder metabolitlere karşı antimikrobiyal duyarlılıklarını test etmek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı.

Disk difüzyon analizi için HBA ve SDA besi yerleri sterilize edilerek (121⁰C, 15 dk Otoklav) 45-50⁰C'ye kadar soğutuldu. Ardından 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına 20'er ml dağıtıldı ve besiyerlerinin petri kutuları içerisinde dağılmaları sağlandı. Besiyerleri katılaştıktan sonra inkübatör içerisinde bir gece kontaminasyon testine tabi tutuldu (37⁰C).

McFarland 0.5 standardına göre 1x10⁶ konsantrasyonda ayarlanmış her bir mikroorganizma süspansiyonunun ekimi, HBA (bakteriyal suşlar için) ve SDA (maya suşu için) besiyerleri üzerine cam baget ile homojen bir şekilde yayılarak yapıldı. Bir bakteri için 3 plak kullanıldı.

6 mm çapındaki steril diskler (Oxoid, England), boş bir steril petriye konuldu ve test materyallerinden 20'şer µl {(Hypericum perforatum L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2.5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml), Rutin (50mg/ml), Klorheksidin (%2v/w)} emdirildi (Şekil 6). Test materyali emdirilmiş steril diskler kuruduktan sonra, deneylerde kullanıldı.



Şekil 6. Test materyallerinin disk difüzyon analizi için hazırlanışı

Madde emdirilmiş diskler, mikroorganizmaların ekiminin yapıldığı besi yeri içeren petrilerin yüzeyine dikkatli bir şekilde birbirine temas etmeyecek şekilde yerleştirildi. Diskler yerleştirildikten sonra 10-15 dk bekletildi ve ardından 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ın ekiminin yapıldığı plak CO₂'li etüvde 48 saat, *Porphyromonas gingivalis* ise anaerobik ortamda 72 saat inkübe edildiler. Süre sonunda petrilerde oluşan üreme inhibisyon zonları milimetrik cetvel kullanılarak ölçüldü. Klorheksidin (%2 w/v) emdirilmiş diskler kontrol olarak kullanıldı.

3.4. Sitotoksiste Analizi

Bitki ekstratının ve sekonder metabolitlerin insan gingival fibroblastlar üzerine toksik etkilerinin değerlendirilmesinin amaçlandığı sitotoksiste analizi için MTT (Metiltiazol difenil tetrazolyum) testi, AntiMikrop Test Laboratuvarı (Trabzon Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Trabzon)'nda ISO 10993- 5 (2009) no'lu protokole uygun olarak yürütüldü. Çalışmamızda tüm test materyallerinin sitotoksiste analizi için kullanılan İnsan Gingival Fibroblast (HGF) hücre kültürü Antimikrop Test Laboratuvarı koleksiyonundan sağlandı.

3.4.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

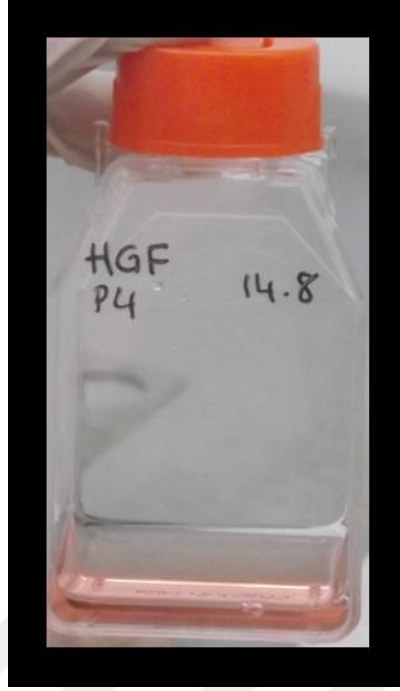
Gingival fibroblast hücreleri saklama ortamları olan -196 °C'den çıkarılarak 37 °C'su banyosunda çözdürüldü ve 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üstteki süpernatant kısım atılarak hücreler %10 fetal dana serumu (FDS), 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 5 µg/ml fungizone içeren EMEM (Eagle's minimal essential medium) (BioWhittaker, Lonza) besi ortamı ile süspansiyon edilerek T25 hücre kültürü kabına alındı.

Hücrelerin kültür kabının yüzeyini kaplamaları ve üremeleri (monolayer hücre tabakası), doku kültürü mikroskopunda (TCM 400, Labomed) kontrol edildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini tamamen kapladığında kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücre tabakası Ca⁺², Mg⁺² içermeyen fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS, pH=7) ile yıkandı. Ardından % 0,25 tripsin+ EDTA solüsyonu ile yıkanarak 37 °C'de 5 dakika inkübasyona (Heal Force, HF90) bırakıldı. Süre sonunda mikroskopik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları görüldü. Yüzeyden ayrılan hücrelere %10 FDS içeren EMEM ilave edilerek süspansiyon edildi ve 15ml'lik tüplere aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj (Elektro-mag M4812M, Turkey) edildikten sonra süpernatant kısım atıldı (Şekil 7).



Şekil 7. Santrifüj sonrası hücrelerin çökmüş hali

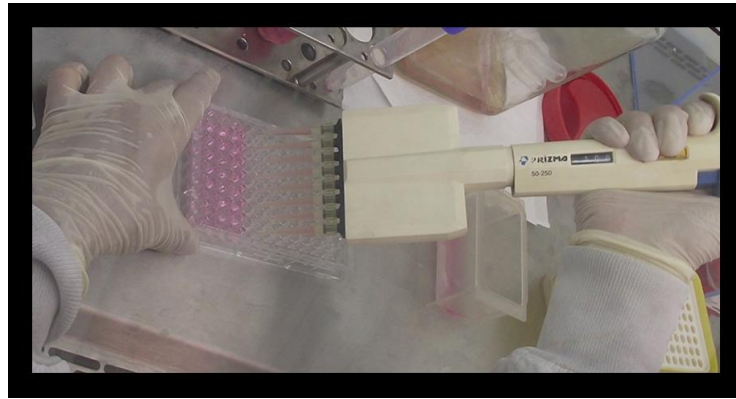
Ardından hücreler %10 FDS ve antibiyotik/antimikotik içeren EMEM besi ortamı ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonu 2 adet T25 cm²'lik kültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlandı. Bu şekilde 4 seri pasaj yapıldı (Şekil 8).



Şekil 8. Pasajlama işlemi sonrası hücrelerin T25 cm²'lik kültür kabına alınışı

3.4.2. MTT Testinin Uygulanması

4. pasajın ardından 96 kuyucuklu kültür kapları için istenen yoğunluktaki hücre sayısı hesaplandı ve mililitresinde $1,3 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta 100 µl olacak şekilde paylaştırıldı (Şekil 9).

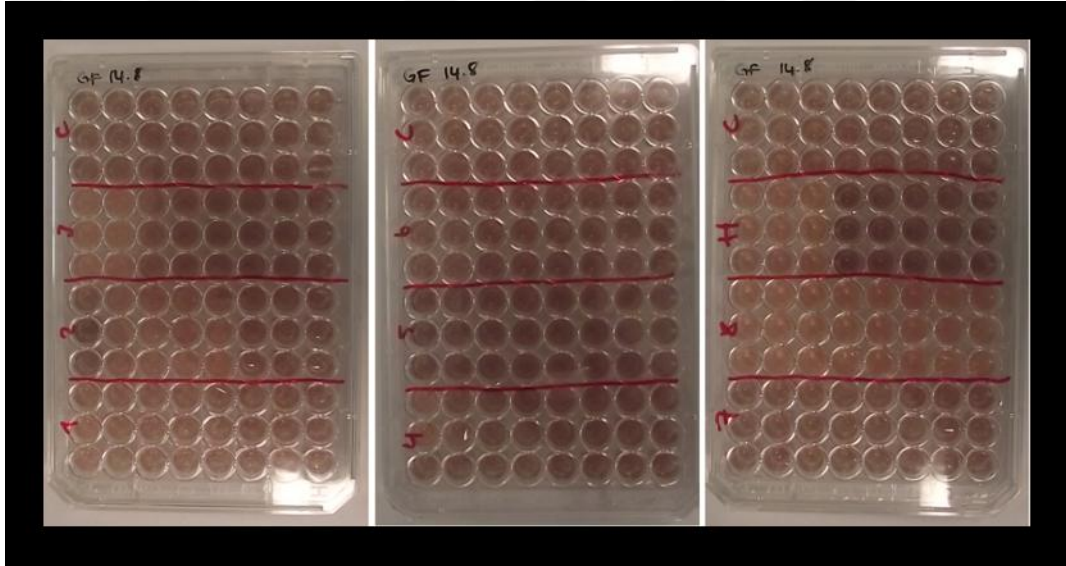


Şekil 9. 96 kuyucuklu kültür kabına hücre süspansiyonlarının eklenmesi

Her bir test materyalinden 100 µl, [(Hypericum perforatum L. ekstratı (50mg/ml), Hypericin (2.5mg/ml), Hyperforin (1mg/ml), Hyperoside (5mg/ml), Quercetin (50mg/ml), Quercitrin (50mg/ml), Rutin (50mg/ml), Klorheksidin (%2v/w)]

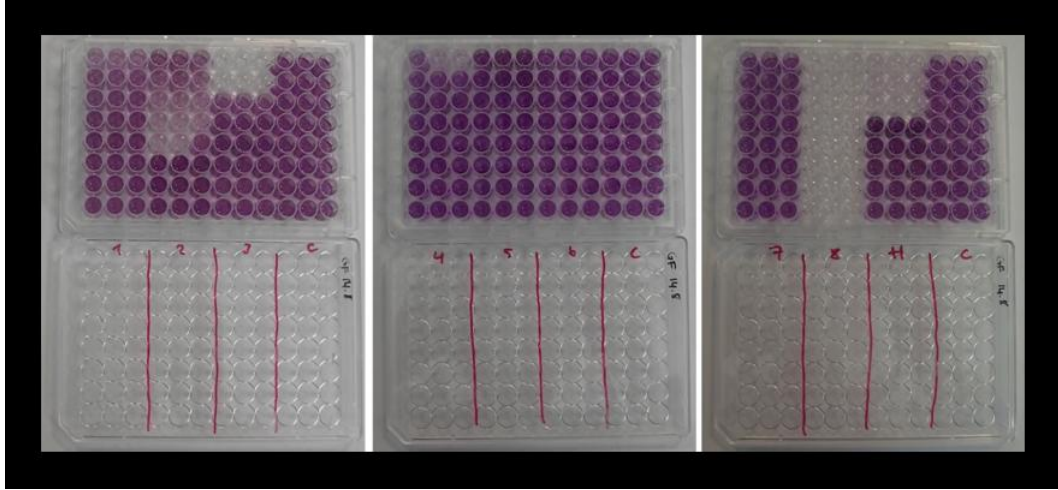
96 kuyucuklu kültür kabının ilk kuyucuklarına ilave edildi. Ardından test materyalleri DMSO ile süspanse edilerek her seferinde %50 oranında azalan konsantrasyonda bir alt kuyucuğa eklendi, böylece materyallerin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, konsantrasyonları test edilmiş oldu (Tablo 2). Bu şekilde hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabı 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat süre ile inkübe edildi.

48 saat inkübasyonun ardından 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki besi ortamı boşaltıldı ve her bir kuyucuğa çoklu pipet ile 0,1 ml EMEM (%0,5 FDS, %1 antibiyotik+ %1 fungizon) ilave edilerek yıkama işlemi yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa tekrar çoklu pipet ile 0,1 ml EMEM (%0,5 FDS, %1 antibiyotik+ %1 fungizon) eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 5-10 dakika süre ile inkübe edildi (Şekil 10).



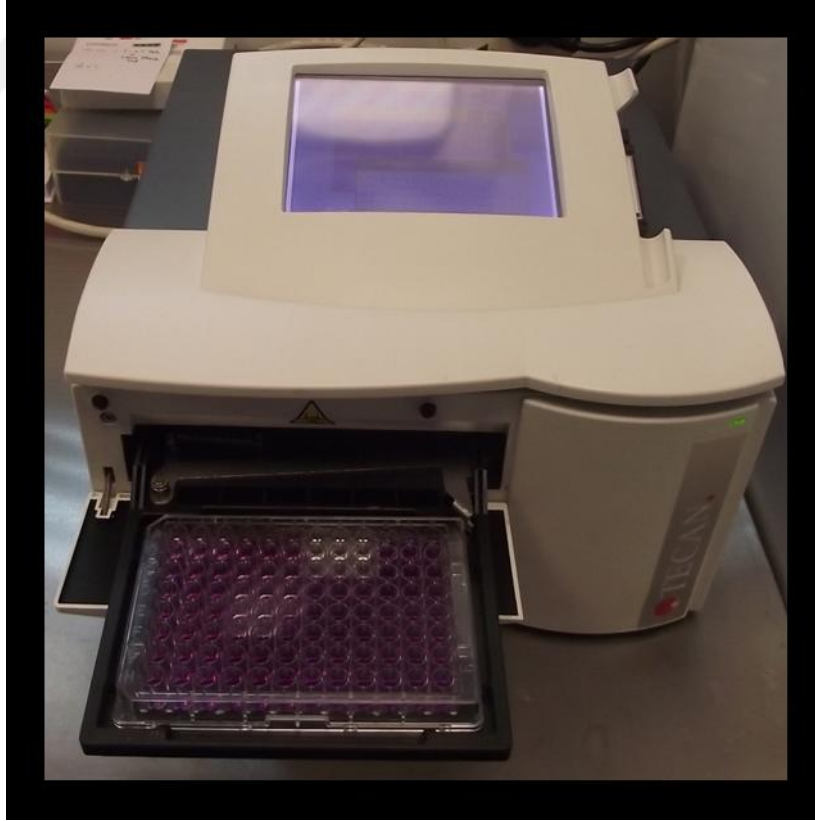
Şekil 10. Hücrelerin test materyalleri ile inkübasyonu sonucu görüntüsü

Bu sırada -20°C'de saklanan MTT boyası (Sigma, St. Louis, MO, USA) derin dondurucudan çıkartılıp erimesi için 37°C'de inkübatöre yerleştirildi. 96 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 10 µl MTT çoklu pipet yardımı ile konuldu. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 2 saat inkübasyonu sağlandı (Şekil 11).



Şekil 11. MTT'nin hücre süspansiyonları üzerine eklenmesi

Ardından MTT boyası boşaltılarak her kuyucuğa 0,1 µl DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) eklendi ve 10-15 dakika 37 °C'de bekletildi böylece formazan krisrallerinin çözülmesi sağlandı. Hücrelerin optik yoğunluğu mikropate okuyucuda (Tecan GmbH, Austria) 570/630 nm dalga boyunda ölçüldü (Şekil 12).



Şekil 12. Hücrelerin optik yoğunluğunun mikropate okuyucuda ölçülmesi

Hücre proliferasyonu çalışmasında her bir test materyali için 3 tekrar yapılarak istatistiksel değerlendirmenin anlamlı olması amaçlandı ve klorheksidin pozitif kontrol ajanı olarak kullanılırken, sadece hücre içeren kuyucuklar negatif kontrol grubu olarak belirlendi.

Her bir kuyucuktaki hücre canlılığı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{\text{Test materyalinin absorbansı}}{\text{Kontrol materyalinin absorbansı}} \times 100$$

Test materyallerinin sitotoksitesi, hücre canlılığı göz önünde bulundurularak ve kontrol grubu karşılaştırılarak sitotoksik olmayan (hücre canlılığı >%90), hafif derecede sitotoksik (hücre canlılığı:%60-%90), orta derecede sitotoksik (hücre canlılığı:%30-%59), şiddetli sitotoksik (hücre canlılığı <%30) şeklinde derecelendirildi (Dahl ve ark., 2006).

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Antimikrobiyal analiz incelemesi, tesadüf parsellemede faktöriyel deneme tertibine göre, 3 tekerrürlü olarak düzenlendi. Örnek büyüklüğü MİNİTAB yazılımı Power and Sample Size yordamında 2-Level Factorial Design komutu ile hesaplanmış olup tahmin edilen testin gücü 1.00 olarak hesaplandı.

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 yazılımı (SPSS 20.0 Software Package Programme Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Çalışmamızın antimikrobiyal analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) uygulanmış olup kontrol grubu olan klorheksidin grubuyla farklılıkların karşılaştırılmasında Dunnet testi uygulandı. Sitotoksite analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde Post-Hoc Bonferroni düzeltmeli Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanıldı. Kontrol grubuyla farklılıkların karşılaştırılmasında ise Dunnet testi uygulandı. *P* değerinin 0,05' in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Bulguları

Disk difüzyon analizi sonucunda kullanılan test materyallerinin mikroorganizmalara karşı oluşturdukları inhibisyon zon değerleri, mm cinsinden ölçüldü ve Tablo 3.'de verildi. Kontrol grubu olarak kullanılan % 2 w/v klorheksidinin, *Hypericum perforatum L.* ekstratı ve sekonder metabolitleri ile kıyaslandığında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı tüm konsantrasyonlarda, istatistiki olarak daha fazla inhibisyon alanı oluşturduğu görüldü ($p<0,001$).

Hypericum perforatum L. ekstratı, gram-pozitif mikroorganizmalara karşı inhibisyon oluşturmazken, gram-negatif mikroorganizmalardan sadece *P. gingivalis*'e ve *C. albicans*'a karşı inhibisyon alanı oluşturduğu görüldü. Ancak oluşan bu inhibisyon alanı klorheksidin ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,001$).

Hypericin ve Rutin'in, test edilen konsantrasyonlarda tüm mikroorganizmalar ve *C. albicans* için inhibitör etkisi olmadığı görüldü.

Hyperforin ve Hyperoside'in, *P. gingivalis* ve *C. albicans* dışında tüm test edilen mikroorganizmalara ve mantara inhibitör etki göstermiş olduğu, ancak bu inhibitör etkisinin kontrol grubu olan klorheksidin ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Quercetin periodontal hastalıklara neden olan gram negatif mikroorganizmalardan *P. gingivalis*'e, Quercitrin ise hem *P. gingivalis* hem *A. actinomycetemcomitans* hem de *C. albicans* 'a karşı inhibitör etki gösterdi. Ancak bu her iki metabolitin de oluşturduğu inhibitör etkinin istatistiki olarak kontrol grubu olan klorheksidinden düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Tablo 3. Test materyallerinin mikroorganizmalar üzerine oluşturduğu inhibisyon zonu (mm) değerleri

Mikroorganizma	Hypericum Perforatum L.	Hypericin	Hyperforin	Hyperoside	Klorheksidin
S. mutans	0,00±0,00b	0,00±0,00b	10,27±0,75b	8,21±0,55b	25,43±0,59a
S. mitis	0,00±0,00b	0,00±0,00b	10,30±0,34b	9,02±0,26b	26,07±0,38a
S.sanguinis	0,00±0,00b	0,00±0,00b	9,00±0,08b	9,05±0,24b	26,13±0,34a
S. salivarius	0,00±0,00b	0,00±0,00b	9,29±0,35b	9,34±0,23b	24,20±0,38a
S. sobrinus	0,00±0,00b	0,00±0,00b	10,20±0,36b	9,14±0,22b	25,13±0,38a
L.acidophilus	0,00±0,00b	0,00±0,00b	10,39±0,31b	9,27±0,42b	25,40±0,10a
P.gingivalis	15,13±0,2b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,8±0,55a
A.actinomycetemcomitans	0,00±0,00b	0,00±0,00b	9,99±0,53b	9,14±0,28b	25,43±0,41a
C. albicans	8,00±0,06b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,63±0,67a
P değeri	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Veriler ortalama ±standart sapma olarak verildi

Tablo 3 (devam). Test materyallerinin mikroorganizmalar üzerine oluşturduğu inhibisyon zonu (mm) değerleri

Mikroorganizma	Quercetin	Quercitrin	Rutin	Klorheksidin
S. mutans	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,43±0,59a
S. mitis	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	26,07±0,38a
S.sanguinis	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	26,13±0,34a
S. salivarius	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	24,20±0,38a
S. sobrinus	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,13±0,38a
L.acidophilus	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	25,40±0,10a
P.gingivalis	17,14±0,22b	23,1±0,34b	0,00±0,00b	25,8±0,55a
A.actinomycetemcomitans	0,00±0,00b	22,57±1,12b	0,00±0,00b	25,43±0,41a
C. albicans	0,00±0,00b	11,8±0,66b	0,00±0,00b	25,63±0,67a
P değeri	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Veriler ortalama ±standart sapma olarak verildi

Test materyallerinin MIC ve MBC değerleri Tablo 4’de verildi.

Tablo 4. Test materyallerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisid konsantrasyon (MBC) değerleri (mg/ml)

Mikroorganizma	Hypericum Perforatum L.	Hypericin	Hyperforin	Klorheksidin
	MIC-MBC	MIC-MBC	MIC-MBC	MIC-MBC
S. mutans	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	0.0097 ^b - 1.25 ^b	0.0078 ^b - 0.125 ^b	6×10^{-7a} - $\geq 0.0002^a$
S. mitis	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0312 ^b - 0.0625 ^b	18×10^{-8a} - 38×10^{-7a}
S.sanguinis	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0312 ^b - 0.125 ^b	0.0078 ^a - 0.0625 ^a
S. salivarius	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0078 ^b - 0.0625 ^b	$\geq 0.0002^a$ - $\geq 0.0002^a$
S. sobrinus	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0312 ^b - 0.25 ^b	$\geq 0.0002^a$ - $\geq 0.0002^a$
L.acidophilus	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0078 ^b - 0.125 ^b	0.0039 ^a - 0.0039 ^a
A.a	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0039 ^b - 0.0625 ^b	$\geq 0.0002^a$ - $\geq 0.0002^a$
P. gingivalis	$\geq 50^b$ - $\geq 50^b$	$\geq 1.25^b$ - $\geq 1.25^b$	0.0039 ^b - 0.0425 ^b	$\geq 0.0002^a$ - $\geq 0.0002^a$
C. albicans	25 ^b - $\geq 50^b$	0.156 ^b - 0.312 ^b	0.0625 ^b - 0.125 ^b	0.0039 ^a - $\geq 0.0002^a$

Tablo 4 (devam). Test materyallerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisid konsantrasyon (MBC) değerleri (mg/ml)

Mikroorganizma	Hyperoside	Quercetin	Quercitrin	Rutin	Klorheksidin
	MIC-MBC	MIC-MBC	MIC-MBC	MIC-MBC	MIC-MBC
<i>S. mutans</i>	0.0781 ^b - 1.25 ^b	0.0976 ^b - 50 ^b	0.0976 ^b - 50 ^b	3.125 ^b - 50 ^b	6x10 ^{-7a} - ≥0.0002 ^a
<i>S. mitis</i>	≥5 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	18x10 ^{-8a} - 38x10 ^{-7a}
<i>S.sanguinis</i>	2.5 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	25 ^b - ≥50 ^b	0.0078 ^a - 0.0625 ^a
<i>S. salivarius</i>	≥5 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a
<i>S. sobrinus</i>	≥5 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a
<i>L.acidophilus</i>	0.3125 ^b - 1.25 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥50 ^b - ≥50 ^b	12,5 ^b - ≥50 ^b	0.0039 ^a - 0.0039 ^a
<i>A.a</i>	1.25 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	6,25 ^b - ≥ 50 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a
<i>P. gingivalis</i>	1.25 ^b - ≥5 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	6,25 ^b - ≥ 50 ^b	≥ 50 ^b - ≥50 ^b	≥0.0002 ^a - ≥0.0002 ^a
<i>C. albicans</i>	0.625 ^b - 1.25 ^b	6.25 ^b - 6.25 ^b	6.25 ^b - 12.5 ^b	3.125 ^b - 6.25 ^b	0.0039 ^a - ≥0.0002 ^a

Tüm test materyallerinin MIC ve MBC değerleri klorheksidin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,05$).

Hypericum perforatum L.'nin *P. gingivalis* ve *C. albicans*'a MIC ve MBC değerleri 1:1/1:2 ve 1:2/1:1 konsantrasyonlarda elde edildi.

Hyperforin'in *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *L. acidophilus* ve *A. actinomycescomitans*'a karşı duyarlı olduğu, MIC ve MBC değerlerinin sırası ile 1:128/1:8, 1:32/1:16, 1:32/1:8, 1:128/1:16, 1:32/1:4, 1:128/1:8 ve 1:256/1:16 olduğu belirlendi.

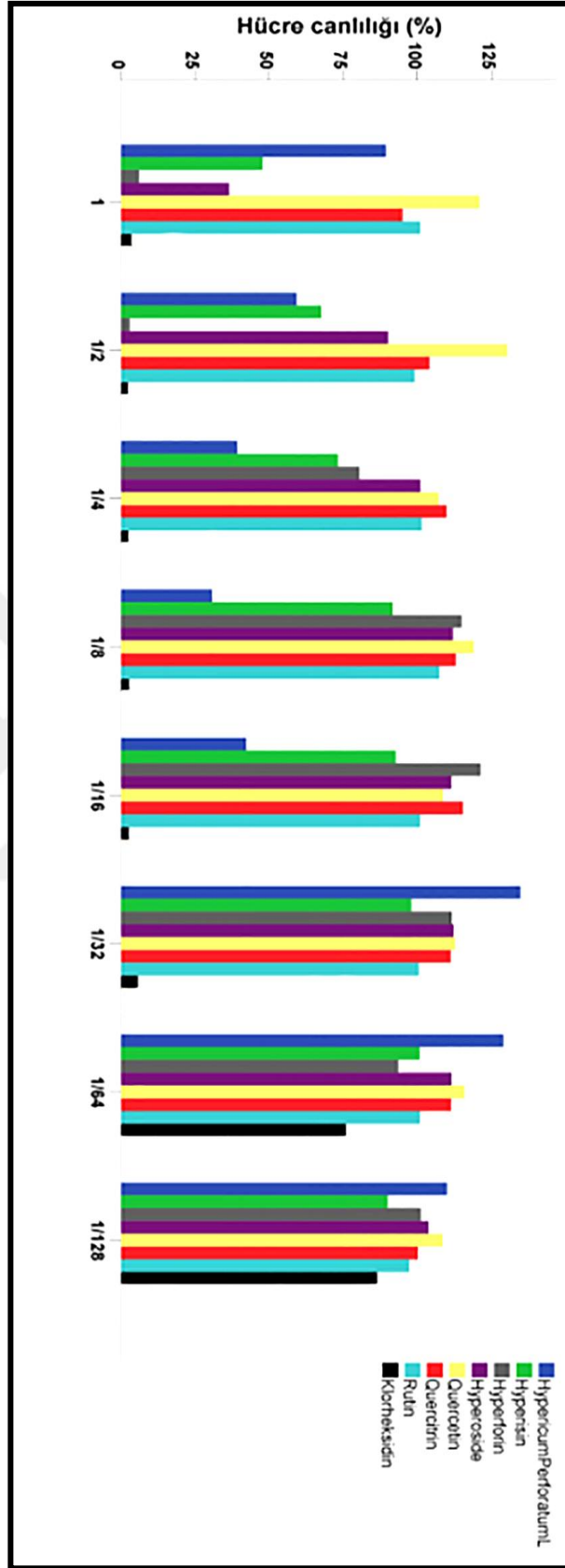
Hyperoside'e karşı en duyarlı mikroorganizma *S. mutans* olarak tespit edildi (MIC/MBC=1:64/1:4 konsantrasyon). Ardından sırası ile *L. acidophilus* (MIC/MBC=1:16/1:4 konsantrasyon), *A. actinomycescomitans* (MIC/MBC=1:4/1:1 konsantrasyon), *S. sanguinis*'a (MIC/MBC=1:2/1:1 konsantrasyon) etkili olduğu görüldü. *S. mitis*, *S. sobrinus* ve *S. salivarius*'un MIC ve MBC değerleri 1:1 olarak tespit edildi.

Quercetin'in *P. gingivalis*'e MIC ve MBC değerleri 1:1/1:1 olarak belirlenirken Quercitrin'in *P. gingivalis*, *C. albicans* ve *A. Actinomycescomitans* için MIC ve MBC değerleri sırasıyla 1:8/1:1, 1:8/1:1, 1:8/1:4 olarak belirlendi.

Klorheksidin tüm mikroorganizmalar üzerine çok düşük konsantrasyonlarda MIC ve MBC oluşturduğu görüldü. En yüksek konsantrasyonda oluşturduğu MIC ve MBC değerleri (1:256/ 1:32 konsantrasyon) *S. sanguinis*'a karşı olurken, diğer tüm mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a çok düşük konsantrasyonlarda MIC/MBC oluşturduğu gözlemlendi.

4.2. Sitotoksosite Analizi Bulguları

MTT analizi sonucunda mikrolate okuyucuda ölçülen test materyallerinin hücre canlılığı yüzdelerinin ortalamaları Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. Dilüe edilen test materyallerinin gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesi

Kontrol grubu olarak kullanılan klorheksidinin, 1:1-1:32 konsantrasyonları arasında gingival fibroblast hücreleri üzerine şiddetli derecede sitotoksik olduğu, 1:64 ve 1:128 konsantrasyonlarda ise hafif derecede sitotoksik olduğu görüldü.

Hypericum perforatum L.'nin 1:32 ve daha düşük konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı görüldü. MIC değerinin elde edildiği 1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarda hafif derecede sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu konsantrasyonlarda klorheksidin ile karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

1:1 ve 1:2 konsantrasyonlarda şiddetli sitotoksik etki gösteren hyperforin'in, bu konsantrasyonlarda kontrol grubu olan klorheksidin ile aralarında anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,001$). MIC oluşturduğu konsantrasyonlarda (1:16-1:128) gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olmadığı ve klorheksidin ile karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Hyperisin'in sitotoksik etkisinin doza bağlı olarak azaldığı görüldü: 1:1 konsantrasyonda orta derecede sitotoksik, 1:2 ve 1:4 konsantrasyonlarda hafif derecede sitotoksik olduğu, 1:8 ve daha düşük konsantrasyonlarda ise gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı tespit edildi. Klorheksidin ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda her iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$).

Hyperoside'in 1:2 ve daha düşük konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı; 1:1 konsantrasyonda ise orta derecede sitotoksik olduğu tespit edildi. Hyperoside'in test edilen tüm konsantrasyonda, klorheksidin ile karşılaştırıldığında sitotoksitesinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,001$).

Çalışmamızda kullandığımız quercetin, quercitrin ve rutin'in test edilen tüm dilüsyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı tespit edildi. Klorheksidin ile karşılaştırıldığında her üç metabolitin test edilen tüm konsantrasyonlarda anlamlı derecede düşük sitotoksitesine sahip oldukları görüldü ($p<0,001$).

5. TARTIŞMA

Diş çürüğü ve periodontal hastalıkların en sık gözlenen enfeksiyöz hastalıklar olduğu bildirilmektedir (Misra ve ark., 2007). Gelişmiş ülkelerde bu hastalıkların görülme sıklığında belirgin bir düşüş gözlenirken Türkiye gibi gelişmekte olan ve koruyucu diş hekimliği uygulamalarının yeterince yaygınlaşmadığı ülkelerde, ağız ve diş sağlığı problemleri ciddi ekonomik ve sosyal sorunlar oluşturmaktadır. Bu nedenle bu hastalıkları önlemeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Gökalp ve ark., 2007).

Mikrobiyal dental plak, içerdiği mikroorganizma çeşitliliği açısından diş çürüğü ve periodontal hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde primer etiyolojik ajan olarak kabul edilir. Bu nedenle bu hastalıklardan korunmada birinci adımın mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılması olduğu bildirilmektedir (Maes ve ark., 2006). Günlük mekanik diş temizliğinin, diş çürüğü ve periodontal hastalıklardan korunmada en etkili yöntemlerden biri olduğu açıklanmıştır (Ernst ve ark., 2005). Mekanik plak kontrolü diş fırçası, diş ipi, ara yüz fırçası, kürdan gibi ara yüz temizleyicileri ile sağlanmaktadır. Ancak özellikle çocukların diş fırçalamayı yeterince etkin yapamamaları (Loveren ve ark., 2000; Hashim ve ark., 2012) ve tek başına mekanik temizliğin MDP'nin uzaklaştırılmasında yeterli olmaması, antimikrobiyal etkili kemaproflaktik ajanların kullanımını gündeme getirmiştir (Tedesco, 2000; Baehni ve Takeuchi, 2003; Davies ve ark., 2003). Genellikle gargara solüsyonları ve diş macunları içerisinde kullanılan enzimler, kuarterner amonyum bileşikleri, amin alkoller, fenoller, deterjanlar ve bisbiquanidler gibi antimikrobiyal özellikteki maddelerin etkinlikleri pek çok çalışma ile değerlendirilmiştir (Adams ve Addy, 1994; Eley, 1999; Balakrishnan ve ark., 2000; Addy, 2003; Almas ve ark., 2005; Robertshaw ve Leppard, 2007; Çelik ve ark., 2008; Joiner ve ark., 2008; Malhotra ve ark., 2011; Todkar ve ark., 2012). Ancak antimikrobiyal etkili maddelere karşı direnç gösteren oral mikroorganizmaların artmış olması ve ticari ürünlerin çeşitli yan etkilere sahip olmaları (Borrajo ve ark., 2002; Santos, 2003; Poggi ve ark., 2003; Addy, 2008; Autio-Gold, 2008; Davies ve ark., 2010), doğal ürünlere olan eğilimi arttırmıştır (Lee ve ark., 2004; Palombo, 2011). Bitkilerden elde edilecek doğal antimikrobiyallerin günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik ajanlara iyi bir alternatif oluşturabileceği düşünülmekte ve bu konuda pek çok çalışma yapılmaktadır. Bilimsel literatürler incelendiğinde ulaşılanın kolay ve

maliyetinin ucuz olması nedeniyle genellikle çalışmanın yapıldığı bölgeye ait bitkilerin çalışmalara dahil edildiği görülmektedir:

Sereviratne ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, Asya yöresine ait olan ve Japon kayısısı olarak da bilinen Prunus Mume ekstratının patojen oral mikroorganizmalara karşı (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *L. acidophilus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) antimikrobiyal etkisini değerlendirmişler. Kontrol grubu olarak klorheksidin kullandıkları çalışmada Prunus mume'nin tüm patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu ($p<0,05$), en duyarlı mikroorganizmanın ise *P. gingivalis*'e olduğunu belirlemişler. Aynı zamanda Human Oral Keratinositleri üzerine sitotoksitesini değerlendirmişler ve oral dokular üzerine zararlı etkisinin olmadığını bildirmişler.

Katsura ve ark. (2001) Çin'de yetişen Paoralea Corylifolia bitkisinin tohumları ve yapraklarından elde edilen, fenolik bir isoprenoid olan Bakuchiol'un oral mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesini in vitro olarak değerlendirmişler ve ekstratın 1-4 µg/ml'sinin test edilen *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *L. asidophilus*, *L. casei*, *L. plantorum*, *Actinomyces viscosus* ve *P. gingivalis* gibi oral patojenlere karşı bakteriyostatik etki gösterdiğini; 5-20 µg/ml'sinin 15 dakika sürede test edilen tüm mikroorganizmalara karşı bakterisidal etkili olduğunu belirlemişler.

Thaweboon ve Thaweboon (2009), Asya ve Afrika'ya ait olan ve daha önce farklı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal özellik gösteren Ocimum Americanum L. bitki ekstratının, *S. mutans*, *L. casei* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal ve antifungal aktivitesini değerlendirmişler ve *L. casei* ile karşılaştırıldığında *S. mutans* ve *C. albicans*'a karşı daha etkili olduğunu belirlemişler.

Botelho ve ark. (2007), Brezilya'da yetişen ve 'Alecrim-pimenta' olarak bilinen Lippia sidoides ekstratının ve içeriğinde fazla miktarda bulunduğu bildirilen carvacrol ve tyhmol gibi phenolik bileşiklerin *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis* ve *C. albicans* gibi oral patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişler. Carvacrol ve tyhmolün minimum inhibitör konsantrasyon değerinin 2.5-5 mg/ml arasında değiştiğini oysa ki bitki ekstratının kendisinin minimum inhibitör konsantrasyon değerinin 5-10 mg/ml olduğunu dolayısıyla bitkinin kendisinin içeriğinde bulunan carvacrol ve tyhmole göre daha az etkili olduğunu bildirmişler.

Çalışmada kullandığımız *Hypericum perforatum* L. tüm dünyada yaygın olarak yetişen (Barnes ve ark., 2001; Bilia ve ark., 2001; Butterweck ve Schmidt, 2007) ve ülkemizde de 43 endemik türü bulunan Hypericaceae familyasına ait bir bitkidir (Davis, 1988). Bu bitkinin halk arasında deri yaraları, yanıklar ve nevralji tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir (Beerhues, 2006). Bu etkilerin yanında herpes simpleks virüs tip 1 ve tip 2'ye karşı antiviral aktivitesi (Tang ve ark., 1990; Jacobson ve ark., 2001), antiinflamatuvar (Tedeschi ve ark., 2003; Medina ve ark., 2006), antidepresan (Gaster ve Holroyd, 2000; Southwell ve Bourke, 2001; Muller, 2003; Lawvere ve Mahoney, 2005; Medina ve ark., 2006) ve antitümöral etkinliği (Agostinis ve ark., 2002; Schempp ve ark., 2002; Hostanska ve ark., 2003; Quiney ve ark., 2007) yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Çalışmada, bugüne kadar yapılmış pek çok çalışma ile antimikrobiyal aktivitesi bildirilen (Schempp ve ark., 1999; Reichling ve ark., 2001; Mortensen ve ark., 2012; Laakmann ve ark., 1998; Ebrey, 1999; Avato ve ark., 2004; Zanolli, 2004; Beerhues, 2006; Medina ve ark., 2006; Milosevic ve Solujic, 2006) hatta Rusya'da antimikrobiyal etkili ticari preparatı bulunan *Hypericum perforatum* L.'nin (Reichling ve ark., 2001; Saddiçe ve ark., 2010) oral florada bulunan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisini değerlendirmek amaçlandı.

Hypericum perforatum L.'nin antimikrobiyal aktivitesinin, içerisinde bulunan sekonder metabolitler sayesinde gerçekleştiği bilinmektedir. Phloroglucinollerden Hyperforin'in (Schempp ve ark., 1999; Reichling ve ark., 2001), naphthodianthronlardan Hypericin'in (Avato ve ark., 2004; Milosevic ve Solujic, 2006) ve Rutin, Hyperoside, Quercitrin, Quercetin gibi flavonoidlerin (Cowan, 1999) antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratının yanı sıra bu sekonder metabolitlerin de antimikrobiyal etkisi araştırıldı.

Bir maddenin antimikrobiyal etkinliğini belirlemede kullanılan yöntemlerin agar difüzyon testleri (disk difüzyon, E-test), sıvı makro ve mikrodilüsyon testleri, agar dilüsyon testi, akım sitometrisi ve moleküler yöntemler olduğu bildirilmiştir. Disk difüzyon yöntemi, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakteriler için önerilen ucuz, kolay uygulanabilen ve laboratuarlarda rutin olarak tercih edilen bir testtir. Bir petri kutusunda 5-6 maddeye karşı duyarlılığın belirlenebilmesi ve en etkili olanın

saptanması disk difüzyon testi ile mümkün olmaktadır. Sıvı dilüsyon testleri ise, antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek (MIC) veya mikroorganizmaları öldürmek (MBC) için gerekli olan minimum konsantrasyonu belirlemenin mümkün olması nedeniyle en sık tercih edilen yöntemlerden biridir (Toroğlu ve Çenet, 2006). Bu nedenle çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. ekstati ve sekonder metabolitlerin antimikrobiyal analizinde disk difüzyon analizi ve gerekli olan minimum konsantrasyonları belirleyebilmek için de sıvı dilüsyon testleri tercih edildi.

Dental materyallerin antimikrobiyal etkinlik çalışmaları incelendiğinde, kontrol grubu olarak farklı antibakteriyel ajanların kullanıldığı görülmüştür. Test edilen mikroorganizma türüne göre ampisillin (Yu ve ark., 2003), vankomisin (Botelho ve ark., 2007), siprofloksasin (Eick ve ark., 2004; Abdollahzadeh ve ark., 2011) spiramisin (Iauk ve ark., 2003), gatiflokzaasin ve moksiflokzasin (Eick ve ark., 2004), tetrasiklin, amoksisilin (Al-hebshi ve ark., 2005) ve gentamisin (Yu ve ark., 2003) gibi çeşitli antibiyotiklerin yanı sıra, oral floradaki mikroorganizmalar için kontrol ajanı olarak klorheksidinin pek çok çalışmada tercih edildiği görülmektedir. (Fathilah ve ark., 2009; Rasooli ve ark., 2009; Sampaio ve ark., 2009; Thaweboon ve Thaweboon, 2009; Wong ve ark., 2010; Sereviratne ve ark., 2011).

Klorheksidin, aerop ve anerop olmak üzere hem gram-pozitif hem de gram-negatif mikroorganizmalara, mayalara ve mantarlara karşı etkisi kanıtlanmış (Almas ve ark., 2005; Çelik ve ark., 2008; Malhotra ve ark., 2011; Todkar ve ark., 2012) antiplak aktiviteye sahip yaygın kullanılan antibakteriyel bir ajandır (Todkar ve ark., 2012). Düşük konsantrasyonlarda hücre membran enzimlerini inhibe ederek ve hücre zarının geçirgenliğini arttırarak bakteristatik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmik makromoleküllerin koagülasyonuna yol açtığı ve böylece bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (Malhotra ve ark., 2011). Bu nedenlerle çalışmamızda bitki ekstratının ve içerisindeki sekonder metabolitlerin antimikrobiyal analizinde kontrol ajanı olarak klorheksidin kullanıldı.

Hypericum perforatum L.'nin farklı yöntemler kullanılarak antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır.

Suntar ve ark., (2015), *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının ve n-hexane, chloroform, ethyl-acetate, n-butanol ve su sub-ekstratlarının oral florada

bulunan *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. plantarum*, *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesini kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirmişler ve ampisilin ile karşılaştırmışlar. Su ekstratının, özellikle *S. sobrinus* ve *L. plantarum* üzerinde güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu (MIC=8µg/ml) bulmuşlar. Etonal ekstratının *S. sobrinus*'a 16 µg/ml'de, *S. mutans*'a 64 µg/ml'de MIC oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullandığımız *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratı, *S. sobrinus* ve *S. mutans*'a antimikrobiyal etki göstermezken, *P. gingivalis* ve *C. albicans*'a inhibisyon zonu oluşturdu ancak klorheksidin ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı fark olduğu görüldü (p<0,001). İki çalışma arasındaki sonuç farklılığının uygulanan antimikrobiyal duyarlılık test farklılığından kaynaklandığı düşünülmekle birlikte kullanılan *Hypericum perforatum* L. bitkisinin içerisindeki bileşen farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Milosevic ve ark. (2007), *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının meyve ve sebzelerden izole edilebilen gram-negatif (*Pseudomonas fluorescens*, *P. phaseolicola*, *P. glycinea*, *Erwinia carotovora*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azotobacter chroococcum*) ve gram-pozitif (*B. mycoides*, *B. subtilis*) bakterilere karşı etkinliğini değerlendirmişler. Test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini, kontrol grubu olarak kullandıkları antibiyotigin (sinasilin) bu bakteriler üzerine inhibisyon oluşturmadığını, *Hypericum perforatum* L.'nin oluşturduğu inhibisyon zon değerlerinin 5-8mm arasında değiştiğini bildirmişler. Bu çalışmadan farklı olarak Mazandarani ve ark. (2007), *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının gram-pozitif (*E. faecalis*, *S. aureus*) ve gram-negatif (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu olarak gentamisin kullandıkları çalışmada gram-pozitif bakterilerde sırası ile 25-26 mm'lik inhibisyon zonları olduğu bildirilmiş ancak gram-negatif bakterilere etki etmediği açıklanmıştır. Bu çalışmaların sonucundan farklı olarak bizim çalışmamızda *Hypericum perforatum* L.'nin etanol ekstratının gram-pozitif mikroorganizmalara (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *L. acidophilus*) etkili olmadığı gram negatif mikroorganizmalardan da sadece *P. gingivalis*'e (15,13 mm) ayrıca *C. albicans*'a (8 mm) inhibitör etkisinin bulunduğu

ancak klorheksidinin istatistiki olarak daha fazla inhibitör etkisinin olduğu görüldü ($p < 0,001$).

Meral ve Karabay (2002), 1mg/ml *Hypericum perforatum* L.'nin metanol ekstratının çalışmalarında kullandıkları mikroorganizmaların tamamına karşı [gram-pozitif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*), gram-negatif (*P.s aeruginose*, *E. cloacae*, *E. coli*)] antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişler. *Hypericum perforatum* L.'nin oluşturduğu inhibisyon zon değerlerinin kontrol grubu olarak kullandıkları sulbaktam/ampisilin ve amoksisilin'den daha yüksek bulunduğunu açıklamışlar.

Avato ve ark. (2004), *Hypericum perforatum* L.'nin 2 farklı toz örneğinin petrolum-eter, kloroform, etil-asetat ve metanol ile ayrı ayrı ekstrakte ederek kullandıkları çalışmada bu ekstraksiyonlara ek olarak hyperforin, hyperforin tuzları, hyperisin ve flavonoidlerin (guercetin, isoguercitrin, rutin ve hyperfoside'in karışımı) antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmişler. Tüm test materyallerinin gram-pozitif (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*) bakterilere karşı etkili olduğunu ancak gram-negatif (*P. aeruginosa*, *Acinebacter calcoacetius*, *A. baumannii*) bakterilere antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir. Mikroorganizmalar üzerine en düşük MIC değeri (12,5 µg/ml) oluşturanın etil-asetat ekstratı olduğunu, 2 ayrı örnekle elde edilen metanol ekstratlarının, farklı inhibitör etkilerinin bulunduğunu bildirmişler ve bu sonuçların 2 ayrı toz *Hypericum perforatum* L.'nin içeriğindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini açıklamışlar. Yine bu çalışmada hyperisin'in hyperforinden daha düşük konsantrasyonda mikroorganizmalar üzerine MIC oluşturduğu, hyperforin'nin ise yalnızca *S. aureus*'a karşı etkili olduğu açıklanmıştır. Aynı şekilde Mortensen ve ark. (2012), *Hypericum perforatum* L.'nin metanol ekstratının ve hyperforin, hyperisin ve pseudohyperisin'nin, patojenik olmayan Mycobacterium türlerine (*M. JLS*, *M. KMS*, *M. MCS*, *M. Smegmatis*, *M. phlei*) karşı antimikrobiyal etkisini değerlendirmişler ve pozitif kontrol ajanı olarak gram-pozitif *B. subtilis*'i negatif kontrol ajanı olarak da gram-negatif olan *E.coli*'yi kullanmışlar. *Hypericum perforatum* L.'nin metanol ekstratının gram-negatif bakterilere etkili olmadığını, gram-pozitif mikroorganizmalar üzerine oluşturduğu inhibitör etkinin de hyperforin, hyperisin ve pseudohyperisin'e göre daha düşük konsantrasyonda elde edildiğini bildirmişler. Bu iki çalışma sonucunda da *Hypericum perforatum* L.'nin metanol ekstratının gram-pozitif mikroorganizmalara etkili olduğu, gram-negatif mikroorganizmalara inhibitör etkisinin bulunmadığı

sonucuna varılmış ve total bitki ekstratının ayrı ayrı test edilen sekonder metabolitlere göre daha etkili olduğu ve bunun total ektrat içerisinde bulunan pek çok metabolit'in sinerjistik etkisinden kaynaklandığı açıklanmış. Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratının gram-pozitif mikroorganizmalar karşı antimikrobiyal etkisi görülmezken gram-negatif mikroorganizmalardan sadece *P. gingivalis*'e ayrıca *C.albicans*'a inhibitör etkisinin olduğu, bu etkinin kontrol grubu olan klorheksidinle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü ($p<0,001$). Bununla birlikte sekonder metabolitlerden quercitrin ve guercetin'in *P. gingivalis*'e karşı *Hypericum perforatum* L.'den daha geniş inhibisyon zonu oluşturduğu görüldü.

Çelen ve ark. (2008), *Hypericum perforatum* L.'nin aseton ekstratının *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*'e karşı antibakteriyel *C. albicans*, *C. krusei*'ye karşı antifungal aktivitesini değerlendirmişler ve gentamisin ile flukonazol'ü kontrol olarak kullanmışlar. *S. aureus* en duyarlı mikroorganizma olarak belirlenirken *Hypericum perforatum* L. 'nin aseton ekstratının *C. albicans*'a inhibitör etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda *Hypericum perforatum* L., *C. albicans*'a karşı inhibisyon zonu (8mm) oluşturdu. Ancak klorheksidin ile karşılaştırıldığında oluşturduğu bu etkinin anlamlı olmadığı görüldü ($p<0,001$).

Görüldüğü üzere *Hypericum perforatum* L.'nin antimikrobiyal etkinliğini test etmek için pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmalarda kullanılan çözücünden test edilen mikroorganizmalara kadar birçok değişken bulunmaktadır. Bu nedenle de çalışma sonuçlarında tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır. Aynı zamanda Avato ve ark., (2004)'nin çalışmasında olduğu gibi aynı çözücü kullanılsa bile aynı bitkinin farklı örneklerinin, farklı sonuçlar doğurabileceği görülmüştür. Bunun nedeni bitki içerisindeki aktif komponent miktarının, bitkinin yetiştiği bölgeye, toplanma zamanına, ilk ekstraksiyon işlemi süresince maruz kaldığı ışığa bağlı olarak değişebilmesidir (Vattikuti ve Ciddi, 2005).

Hypericum Perforatum L. içerisindeki antimikrobiyal aktiviteye sahip sekonder metabolitlerden birinin, hyperisin olduğu bildirilmiştir (Silva ve ark., 2005; Milosevic ve ark., 2007). Lüthi ve ark. (2009), karyojenik bakterilerden *S. mutans* ve *S. sobrinus*'a karşı hypericin'in fotodinamik antibakteriyel etkisini araştırmışlar. Hypericin'in

karyojenik mikroorganizmalara etkisinin incelendiği bu çalışma, bizim çalışmamız açısından önem arz etmektedir. 0,625µg/ml'den 10µg/ml'e kadar değişen konsantrasyonlarda hypericin'in test edildiği çalışmada, 2,5µg/ml hypericin'in *S. sobrinus*'a etkili olduğu bildirilirken, *S. mutans*'a yalnız başına etki etmediği, 0,625µg/ml foslipos ve hypericin karışımının etki ettiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda disk difüzyon analizi sonucunda, 2,5-0,009 mg/ml arasındaki konsantrasyonları kullanılan hypericin'in test edilen hiçbir mikroorganizmaya inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlendi.

Hypericum perforatum L. içerisinde antimikrobiyal aktiviteye sahip bir diğer metabolit'in hyperforin olduğu bildirilmektedir. Rusya'da geliştirilen ve *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı Sulfanilamid'den daha etkili olduğu bildirilen Novoiamine ve İmanine isimli antibakteriyel ürünlerin içeriğinde hyperforin bulunduğu açıklanmıştır (Saddiqa ve ark., 2010). Schempp ve ark. (1999), *Hypericum perforatum* L'den elde edilen hyperforin'in gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerine (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) antibakteriyel etkisini ve *C. albicans* üzerine antifungal etkisini değerlendirmişlerdir. Hyperforin'in farklı konsantrasyonlarının (0.1, 1.0, 10, ve 100 µg/mL) kullanıldığı çalışmada en düşük konsantrasyonun (0.1µg/ml) tüm gram-pozitif mikroorganizmalar üzerine etkili olduğunu, gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a inhibitör etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak bizim çalışmamızda hyperforin'in *P. gingivalis* ve *C. albicans* dışında test edilen tüm gram-pozitif/gram-negatif mikroorganizmalara karşı inhibitör etkisi gözlemlendi. Ancak oluşan bu inhibitör etkinin klorheksidin ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı görüldü ($p < 0,001$).

Hypericum perforatum L. içerisindeki aktif komponentlerden biri de flavonoidlerdir. Pek çok bitkide bulunan ve bitkiler tarafından mikrobiyal enfeksiyonlara cevap olarak sentezlenen bu bileşiklerin antimikrobiyal etkileri, bakteri hücre duvarı ve ekstraselüler proteinler ile kompleks oluşturmalarına bağlanmıştır (Tsuchiya ve ark., 1996; Cowan, 1999). Çeşitli bitkilerden elde edilen flavonoidlerden rutin'in (Hidalgo Baez ve ark., 1998; van der Watt ve Pretorius, 2001; Fabjan ve ark., 2003), hyperoside'in (van der Watt ve Pretorius, 2001), quercetin'in (Fabjan ve ark., 2003; Conforti ve ark., 2005; Vaquero ve ark., 2007) ve quercitrin'in (Arima ve ark.,

2002; Fabjan ve ark., 2003) antimikrobiyal aktivitesi çeşitli yayınlar ile gösterilmiş, gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı etkili oldukları açıklanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız hyperosid, disk difüzyon analizinde hyperforin'e benzer şekilde *P. gingivalis* ve *C. albicans* dışında tüm gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı inhibisyon oluşturdu, quercetin ise yalnızca *P. gingivalis*'e karşı etkili bulundu. Ancak kontrol grubu olan klorheksidin ile karşılaştırıldığında her iki flavonoidin antimikrobiyal etkinliği anlamlı bulunmadı. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız rutin'in test edilen mikroorganizmalardan hiçbirine inhibisyon oluşturmadığı görüldü.

Quercitrin'in ise gram-pozitif mikroorganizmalara karşı inhibisyon oluşturmazken, gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a karşı etkili olduğu, klorheksidin ile kıyaslandığında bu antimikrobiyal etkinin istatistiki olarak düşük bulunmasına karşın, klorheksidine yakın derecede inhibisyon alan çapı oluşturduğu görüldü.

Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine, basit öncül test yöntemleri ile başlanması, ardından hayvan testleri ile devam edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde (insanlarda) kullanım testlerine geçilmesi gerektiği açıklanmıştır (Schmalz, 2009). İn vitro sitotoksosite testlerinde (öncül testler) kullanılan biyolojik sistemler; doku kültürleri, organ kültürleri, hücre kültürleri ve hücre organelleri olarak bildirilmiştir (Schierholz ve ark, 1998). Günümüzde dental materyallerin akut toksisitelerinin saptanmasında; bireysel faktörlerden etkilenmedikleri, tekrarlanabilir özellikte olmaları, ara aşamalarda kontrollerinin kolay olması, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları ve hayvan deneylerinde olduğu gibi canlı varlıkların zarar görmemesi gibi nedenlerden dolayı en yaygın kullanılan biyolojik sistemlerin hücre kültürü olduğu bildirilmiştir (Browne, 1988; Jorge ve ark., 2003). Çalışmamızda bu avantajları nedeniyle *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratının ve sekonder metabolitlerin sitotoksiteleri in vitro koşullarda hücre kültürü test yöntemi ile değerlendirildi.

Hücre kültürü çalışmalarında 2 farklı (primer ve devamlı) hücre tipinin kullanıldığı bildirilmiştir. Primer hücre kültürleri, dokulardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültüre edilmesiyle elde edilirler. Orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri ve kromozomal anomalilerin görülmemesi nedeniyle pek çok çalışmada

kullanılan primer hücre kültürlerinin, hassas hücreler oldukları, üretimlerinin ve kontrollerinin son derece güç olduğu ve çalışma sırasında pek çok soruna yol açtığı bildirilmiştir (Helgason ve Miller, 2005). Devamlı hücre kültürleri hücre koleksiyonlarından veya ticari olarak elde edilen, stabil bir fenotipe sahip, süresiz çoğalabilen hücrelerdir. Elde edilmeleri ve üretilmeleri primer hücre kültürlerine göre daha kolaydır. Doğru pasajlandıklarında uzun süre yaşatılmaları mümkündür. Genetik ve metabolik olarak stabil olduklarından test sonuçlarının standardizasyonunun kolay gerçekleştirildiği ve uzun dönem fenotipik özelliklerinde kayıp söz konusu olmadığı bildirilmiştir (Craig, 1996). Bu avantajları nedeniyle tez çalışmamızda devamlı hücre kültürlerinin kullanımı tercih edildi.

Bağ dokusunun majör bileşeni olan fibroblast hücreleri proteoglikan, glikozaminoglikan, glikoprotein gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerini sentezleyebilme aynı zamanda matriks metalloproteinaz üretebilme özelliğine sahip hücrelerdir (Bartold ve ark., 2000). Gingival fibroblastlar, çeşitli inflamatuvar sitokinleri ve büyüme faktörlerini sentezlemekten ve ekstrasellüler matriksin yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin sağlanmasından sorumludurlar. Bu dengenin bozulması durumunda periodontal dokularda yıkım gerçekleştiği bildirilmiştir (Takashiba 2003). Diş eti dokularının büyük bir kısmını oluşturan gingival fibroblast hücrelerinin yara iyileşmesinde kollojen sentezleyerek aktif rol oynadığı bilinmektedir. Kültür şartlarına çok kolay uyum sağlayarak mükemmel büyüme potansiyeline sahip oldukları ve hücre kültürü çalışmalarında çok sık kullanıldıkları açıklanmıştır (Kent ve ark., 1999; Palmer ve ark., 2005). Bu nedenlerle tez çalışmamızın sitotoksisite analizi bölümünde gingival fibroblast hücreleri kullanıldı.

MTT analizinin, sitotoksisite testleri içerisinde tekrarlanabilir olması, hızlı sonuç elde edilmesi, materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin bile değerlendirilmesine imkan vermesi nedeniyle güvenilir bir test yöntemi olduğu (Schmalz, 1994; Sipahi ve ark., 2005), ayrıca hücre canlılığının tespiti ve yaşayan hücrelerdeki proliferasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Vellonen ve ark., 2004) Çok sayıda test materyali varlığında uygulama kolaylığı nedeniyle ISO tarafından tavsiye edilen MTT analizinin, büyüme döngüsünün herhangi bir aşamasındaki canlı hücre yoğunluğu hakkında fikir verebildiği bildirilmektedir (Schmalz, 1994; Thumwanit ve ark., 1999). Bu avantajları nedeniyle çalışmamızda canlı

hücre yoğunluğunun belirlenmesinde enzimatik test yöntemlerinden MTT testi tercih edildi.

Hypericum perforatum L.'nin sitotoksitesisi ile ilgili yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde fototoksitesisi üzerine odaklanıldığı görülmektedir. Hypericin fototoksiteden sorumlu bileşen olarak bildirilmiş ve aşırı miktarda bitki tüketen hayvanlarda güneş ışığına maruz kalınması sonucu ciltte kızarıklık ve ödem olduğu açıklanmıştır (Vandenbogaerde ve ark., 1998; Traynor ve ark., 2005). İnsan keratinosit hücre kültüründe yapılan bir çalışmada hiperisin'in yanı sıra, bitkinin içerdiği flavonoidlerden biri olan rutin'in de fototoksitesiteye neden olduğu belirtilmiştir (Wilhelm ve ark., 2001). *Hypericum perforatum* L. ile ilgili bu tip yan etkiler bildirilse de yapılan klinik çalışmalar sonucunda, bitkinin fototoksik etkilerinin son derece seyrek olarak ortaya çıktığı ve yüksek dozlarda, aşırı kullanımı sonucu olduğu rapor edilmiştir (Schempp ve ark., 2003). Çalışmamızda *Hypericum perforatum* L. bitki ekstratı'nın gingival fibroblastlar üzerine sitotoksitesisi incelendiğinde doza bağlı olarak değişen bir grafik gösterdiği ve 1,56 mg/ml (1:32 konsantrasyon) ve daha düşük dozlardaki bitki ekstratının gingival fibroblastlar üzerine sitotoksik olmadığı görüldü.

Rezusta ve ark. (2012), hypericin'in keratinositler ile dermal fibroblastlara karşı yan etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, keratinosit ve fibroblastların 1µg ve daha düşük hypericin konsantrasyonlarında zarar görmediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda değişen konsantrasyonlarda (1:1-1:256) test edilen hypericin'in, 1:8 ve daha ve daha düşük konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine toksik etkisi olmadığı görüldü.

Schempp ve ark. (2000), periferik kan mononükleer hücreleri üzerine hyperforin'in biyouyumluluğu test ettikleri bir çalışmada, hyperforin'in toksik etkisinin bulunmadığını açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda hyperforin'in gingival fibroblast hücreleri üzerine doza bağlı olarak 1:1 ve 1:2 dilüsyonda şiddetli sitotoksik etkisi bulunurken, 1:8 ve daha düşük konsantrasyonda sitotoksik olmadığı görüldü.

Diaz ve ark. (2008), çeşitli flavonoidlerin üç farklı insan hücre hattına (HL-60, U937 ve SK-MEL-1) karşı sitotoksitesilerini inceledikleri çalışmalarında hyperoside'in toksik etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde bizim çalışmamızda da 2,5mg/ml (1:2 konsantrasyon) ve daha düşük konsantrasyonlardaki hyperoside'in gingival fibroblastlar üzerine toksik etkisi görülmedi.

Soares ve ark. (2006), quercetin ve rutin'in fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesitelerini inceledikleri çalışmalarında quercetin'in doza bağlı olarak toksik etki gösterdiğini, rutin'in ise non-toksik bir flavonoid olduğunu bildirmişlerdir. Matsuo ve ark. (2005), rutin'in ve quercetin'in de içerisinde bulunduğu 9 ayrı flavonoid'in embriyonik akciğer fibroblast hücreleri ve göbek endotelial hücreleri üzerine sitotoksitesitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında rutin'in toksik etkisinin olmadığını, quercetin'in ise doza bağlı toksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda quercetin'in ve rutin'in test edilen tüm konsantrasyonlarda, gingival fibroblast hücreleri üzerine toksik etkileri görülmedi.

Çalışmamızda kullandığımız quercitrin, uygulanan tüm konsantrasyonlarda gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik bulunmadı. Araştırabildiğimiz ölçüde quercitrin'nin sitotoksitesitesinin değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışmamızın literatürdeki bir eksikliği tamamladığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; *Hypericum perforatum* L. ekstratı ve sekonder metabolitlerinin çalışmamızda test edilen tüm oral patojenlere etkisi istatistiki olarak klorheksidinden düşük bulunmuştur. Bununla birlikte gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitesiteleri göz önüne alındığında quercitrin'in periodontal hastalıkla ilişkili gram-negatif mikroorganizmalara ve *C. albicans*'a karşı klorheksidine yakın değerde inhibisyon zonu oluşturduğu ve gingival fibroblast hücreleri üzerine klorheksidin gibi şiddetli sitotoksitesite göstermediği tespit edilmiştir. Bitki ekstratlarının saf bileşikler olmadığı için bu yönde yapılacak çalışmalar ile içerdikleri sekonder metabolitlerin de incelenmesiyle, yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip, düşük sitotoksik etkili yeni antimikrobiyal ve antifungal bitki ekstratları ve sekonder metabolitler için kapı aralanacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızın sınırlamaları dâhilinde elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

1. *Hypericum perforatum* L. ekstratı'nın test edilen mikroorganizmalardan *P. gingivalis* ve *C. albicans*'a antimikrobiyal etki oluşturduğu ancak klorheksidin ile karşılaştırıldığında oluşan bu etkinin istatistiki olarak anlamsız olduğu görüldü ($p < 0,001$).
2. Hypericin ve rutin'in oral patojenler üzerinde inhibitör etkisi görülmezken quercetin'in yalnızca *P. gingivalis*'e inhibisyon oluşturduğu tespit edildi. Ancak quercitrin'in oluşturduğu antimikrobiyal etkinin klorheksidin ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p < 0,001$).
3. Hyperforin ve hyperoside'in *P. gingivalis* ve *C. albicans* dışında tüm gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara inhibitör etkisi görülürken klorheksidin ile karşılaştırıldığında oluşan bu etkinin istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p < 0,001$).
4. Quercitrin'in gram-negatif mikroorganizmalara (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) ve *C. albicans*'a oluşturduğu inhibisyon zon değerlerinin, klorheksidin ile kıyaslandığında istatistiki olarak düşük bulunmasına karşın, klorheksidinin oluşturduğu inhibisyon zon değerlerine çok yakın olduğu ayrıca gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde klorheksidin gibi şiddetli sitotoksikite göstermediği, hatta çalışmamızda test edilen tüm konsantrasyonlarda (1:1-1:256) sitotoksik etkisinin bulunmadığı görüldü.
5. Çalışmamızın bulgularına göre, quercitrin'in özellikle periodontal hastalıktan sorumlu gram-negatif mikroorganizmalara (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) ve *C. albicans*'a antimikrobiyal etkili olduğu ve gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik olmadığı tespit edildiğinden, periodontal hastalık tedavisinde alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini ve bu bulgumuzu destekleyecek çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;46:1407-1417.
- Abdollahzadeh SH, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J Dent* 2011;8(1):1-6.
- Abrams S. Healing Dental Caries. *Oral Health* 2010;100:12-14.
- Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 1994;8(2):291-301.
- Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. *J Clin Periodontol* 1986;13:957-964.
- Addy M. The use of antiseptics in periodontal therapy. In: Linde J, Korrring T, Lang NP (eds.). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4th Ed., Munksgaard, Blackwell Publishing Ltd. 2008;464-493.
- Addy M, Martin MV. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis* 2003;9(1):38-44.
- Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(3):221–241.
- Akiniwa K. Re-examination of acute toxicity of fluoride. *Fluoride* 1997;30:89-104.
- Al-hebshi N, Al-haroni M, Skaug N. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 2006;51(3):183-188.
- Almas K, Skaug N, Ahmad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. *Int J Dent Hyg* 2005;3(1):18-24.
- Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66(5):1009-1014.
- Asgarpanah J. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012;6(19):1387-1394.
- Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent* 2008;33(6):710-716.

- Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res* 2004;18(3):230-232.
- Avcı B, Baysal SU, Gökçay G. Çocuklarda flor kullanımının yarar ve zararlarının değerlendirilmesi. *J Child* 2009;9(1):8-15.
- Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases. *Oral Dis* 2003;9(1):23-29.
- Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J* 2000;45(4):235-245.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(5):583-600.
- Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000;24:28-55.
- Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 1999;166-167.
- Beerhues L. Hyperforin. *Phytochemistry* 2006;67(20):2201-2207.
- Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, Harris R, Lo EC, Naidoo S, Ramos-Gomez F, Soo TC, Burnside G, Pine CM. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent Health* 2004;21:96-101.
- Beighton D, Whiley RA. Sialidase activity of the “*Streptococcus milleri* group” and other viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 1990;28:1431-1433.
- Bilia AR, Bergonzi MC, Morgenni F, Mazzi G, Vincieri FF. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *Int J Pharm* 2001;213(1-2):199-208.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64(5):474-84.
- Bohaty BS, Parker VA, Seale NS. Prevalance of fluorosis like lesions associated with topical systemic fluoride usage in an area of optimal water fluoridation. *Pediatr Dent* 1989;11:125-128.
- Borrajo JLL, Varela AG, Castro GL, Nunez IR, Figueroa MG, Torreira MG. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Peridontol* 2002;73:317-321.

- Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, Montenegro D, Heukelbach J, Rao VS, Brito GA. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(3):349-356.
- Bowen WH. Dental Caries. *Arch Dis Child* 1972;47(256):849-853.
- Brambilla E, Garcia-Godoy F, Strohmer L. Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. *Dent Clin North Am* 2000;44(3):507-540.
- Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role?. *Int Endod J* 1988;21:50-58.
- Burt BA. Prevention policies in the light of the changed distribution of dental caries. *Acta Odontol Scand* 1998;56:179-186.
- Butterweck V, Schmidt M. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr* 2007;157(13-14):356-361.
- Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A, Muller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci* 1998;63:499-510.
- Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005;43:843-849.
- Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Brit J Exp Pathol* 1924;5:141-147.
- CLSI 2007. Antimicrobial Susceptibility Test. <http://clsi.org/standards/micro/pdf>, 2016.
- Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, Quarto M, Riccio P, Roberti G, Tramontano D, Villani F. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B* 2000;54(2-3):103-107.
- Collaert B, Attstrom R, DeBrune N, Mover R. The effect of delmopinol rinsing on dental plaque formation and gingivitis healing. *J Clin Periodontol* 1992;19:274-280.
- Conforti F, Statti GA, Tundis R, Bianchi A, Agrimonti C, Sacchetti G, Andreotti E, Menichini F, Poli F. Comparative chemical composition and variability of biological activity of methanolic extracts from *Hypericum perforatum* L. *Nat Prod Res* 2005;19(3):295-303.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):564-582.

- Craig RG. Restorative Dental Materials, 3rd Edition, Boston, Mosby-Year Book. 1996; 35-50.
- Çakır FY, Gürkan S, Attar N. Çürük mikrobiyolojisi. Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2010;34(3-4):78-91.
- Çelen G, Özkan S, Ayhan F. The phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and their antimicrobial activities. Hacettepe J. Biol. & Chem 2008;36(4):339-345.
- Çelik A, Ersoy ÖF, Kayaoğlu A, Özkan N, Lortlar N, Ömeroğlu S, Çakır EA. The effect of *Hypericum perforatum* extract on topical burn injury: a comparative study with iodine. J Clinic Analytic Medicine 2010;1(3):4-7.
- Çelik EU, Sirin TC, Ergucu Z, Turkun M, Ates M. Can different chlorhexidine agents be used as cavity disinfectants? Gen Dent 2008;56(6):33-37.
- Davies RM, Davies GM, Ellwood RP, Kay EJ. Prevention. Part 4: What advice should be given to patients? Br Dent J 2003;195:135-141.
- Davis PH. Flora of Turkey and East Aegean Island. 1th Edition, England, University of Edinburg. 1988.
- de Soet JJ, Holbrook WP, Vanamerongen WE, Schipper E, Homburg CHE, Degraaff J. prevalence of streptococcus-sobrinus in relation to dental-caries in children from Iceland and the Netherlands. J Dent Child 1990;57:337-342.
- de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res 2000;34(6):486-490.
- Diaz JG, Carmona AJ, Torres F, Quintana J, Estevez F, Herz W. Cytotoxic activities of flavonoid glycoside acetates from *Consolida oliveriana*. Planta Med 2008;74(2):171-174.
- Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC 3rd, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiol Immunol 1989;4:1-5.
- Ebrey RJ. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort. Lancet 1999;28:354: 777.
- Eick S, Schmitt A, Sachse S, Schmidt KH, Pfister W. In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. J Antimicrob Chemother 2004;54(2):553-556.
- Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review. Br Dent J 1999;186(6):286-296.
- Ercan E, Bağlar S, Çolak H. Diş hekimliğinde topikal florür uygulama metotları. CHD 2010;13(1):27-33.

- Ernst CP, Canbek K, Dillenburger A, Willershausen B. Clinical study on the effectiveness and side effects of hexetidine and chlorhexidine mouthrinses versus negative control. *Quintessence Int* 2005;36(8):641-652.
- Fabjan N, Rode J, Kosir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J Agric Food Chem* 2003;51(22):6452-6455.
- Fathilah AR, Rahim ZH, Othman Y, Yusoff M. Bacteriostatic effect of Piper betle and *Psidium guajava* extracts on dental plaque bacteria. *Pak J Biol Sci* 2009;12(6):518-521.
- Featherstone JD. The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;39-42.
- Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25:5-12.
- Fine DH. Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 1988;1(6):259-263.
- Fitzgerald RJ. Inhibition of experimental dental caries by antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1972;1:296-302.
- Fitzgerald RJ, Fitzgerald DB, Adams BO, Duany LF. Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J Dent Res* 1980;59(5):832-837.
- Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, Banoczy J. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res* 1999;33:191-195.
- Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc* 2008; 139:25-34.
- Gaster B, Holroyd J. St John's wort for depression. *Arch Intern Med* 2000;160(2):152-156.
- Gökalp S, Güçüz Doğan B, Tekçiçek M, Berberoğlu A, Ünlüer Ş. Beş, on iki ve on beş yaş çocukların ağız diş sağlığı profili, Türkiye-2004. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2007;31(4):3-10.
- Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44(2):331-384.
- Hargreaves JA. The level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to caries resistance. *J Dent Res* 1992;71(5):1244-1248.

- Haris NO, Garcia-Goday F. Introduction to Primary Preventive Dentistry. 6th Edition, New Jersey, Prentice Hall. 2004; 46-72.
- Hashim R, Williams S, Thomson WM. Oral hygiene and dental caries in 5- to 6-year-old children in Ajman, United Arab Emirates. *Int J Dent Hyg* 2013;11(3):208-215.
- Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Res* 2008;42:449-453.
- Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization. *J Clin Pediatr Dent* 2003;28: 47-52.
- Hidalgo Báez D, de los Ríos C, Crescente O, Caserta A. Antibacterial and chemical evaluation of *Chromolaena moritziana*. *J Ethnopharmacol* 1998;59(3):203-206.
- Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:121- 132.
- Hübner AT. Treatment with *Hypericum perforatum* L. does not trigger decreased resistance in *Staphylococcus aureus* against antibiotics and hyperforin. *Phytomedicine* 2003;10(2-3):206-208.
- Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phyther Res* 2003;17(6):599-604.
- Jacobson JM, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, Cabana BE, Lee D, Spritzler J, Prince AM. Pharmacokinetics, safety and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):517–524.
- Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* 2011;45(3):243-263.
- Johnson JL, Moore LV, Kaneko B, Moore WE. *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:273-286.

- Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M. The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *J Dent* 2008;36:360-368.
- Jordan HV, De Paola PF. Effect of a topically applied 3% vancomycin gel on *Streptococcus mutans* on different tooth surfaces. *J Dent Res* 1974;53:115-120.
- Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *J Prosthet Dent* 2003;90:190-193.
- Kasper S, Schulz V. St John's wort extract as plant antidepressant. *Praxis* 2000;89:2169-2177.
- Kato T, Iijima H, Ishihara K, Kaneko T, Hirai K, Naito Y, Okuda K. Anti-bacterial effects of listerine on oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll* 1990;31:301-307.
- Katsura H, Tsukiyama R, Suzuki A, Kobayashi M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(11):3009-3013.
- Kent LW, Rahemtulla F, Michalek SM. Interleukin 1 and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived from healthy or periodontally diseased human gingival tissue. *J Periodontol* 1999;70:274-282.
- Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1960;1:304-320.
- Kidd E. The implications of the new paradigm of dental caries. *J Dent* 2011;39:3-8
- Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? histopathology of caries enamel and dentin related to the actions of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004;83:35-38.
- Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res* 2011;45(2):100-106.
- Koray F. Diş Çürükleri.1. Baskı, İstanbul, Dünya Tıp Kitapevi. 1981.
- Kremer BH, Loos BG, van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Craandijk J, Bulthuis HM, Hutter J, Varoufaki AS, van Steenberghe TJ. Peptostreptococcus microsmooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J Periodontol* 2000;71(2):209-218.
- Krol DM. Dental caries, oral health, and pediatricians. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2003;33(8):253-270.

- Kumar V, Singh PN, Bhattacharya, SK. Anti-stress activity of Indian *Hypericum perforatum* L. *Indian J Exp Biol* 2001;39:344–349.
- Kuttan NA, Narayana N, Moghadam BK. Desquamative stomatitis associated with routine use of oral health care products. *Gen Dent* 2001;49(6):596-602.
- Laakmann G, Schule C, Baghai T, Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 1998;31(1):54–59.
- Lang NP, Mombelli A, Attström R. Dental Plaque and Calculus. In: Linde J, Karring T, Lang NP editörs. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 4th Ed., Munksgaard, Blackwell Publishing Ltd. 2003;81-105.
- Lawvere S, Mahoney MC. St. John's wort. *Am Fam Physician* 2005;72(11):2249–2254.
- Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, et al. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003;74:1329–35.
- Lee MR. Saint John's wort (*Hypericum perforatum*). A balm for hurt minds? *Proc R Coll Physicians Edinb* 1999;29:253-257.
- Lee SS, Zhang W, Li Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices. *JADA* 2004;135:1133-1141.
- Lemos-Junior CA, Villoria GEM. Reviewed evidence about the safety of the daily use of alcohol-based mouthrinses. *Braz Oral Res* 2008;22:24-31.
- Linde K. St. John's wort - an overview. *Forsch Komplementmed* 2009;16(3):146-155.
- Lindhe J, Karring T, Araujo M. The anatomy of periodontal tissues. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th Ed., Munksgaard, Blackwell Publishing Company. 2008;3-49.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol Rev* 1986;50(4): 353-380.
- Loesche WJ. The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update* 1992;19:68–74.
- Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP. Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term kanamycin treatment. *J Dent Res* 1977;56:254-265.
- Loreven CV, Buijs JF, Cate JM. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. *J Antimicrob Chemother* 2000;45(2):153-158.

- Lüthi M, Gyenge EB, Engström M, Bredell M, Gratz K, Walt H, Gmür R, Maake C. Hypericin and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Medical Laser Application* 2009;24:227-236.
- Maes L, Vereecken C, Vanobbergen J, Honkala S. Tooth brushing and social characteristics of families in 32 countries. *Int Dent J* 2006;56:159-167.
- Malhotra N, Rao SP, Acharya S, Vasudev B. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Candida albicans*. *Oral Health Prev Dent* 2011;9(3):261-268.
- Maltz M, Zickert I. Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, and *lactobacilli* in hamsters and in man. *Scand J Dent Res* 1982;90:193-199.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M. The isolation of *Bifidobacteria* from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 2009;43:308-313.
- Marcotte H., Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(1):71-109.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271.
- Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull* 2005;28(2):253-259.
- Mazandarani M, Yassaghi S, Rezaei MB, Mansourian AR, Ghaemi EO. Ethnobotany and antibacterial activities of two endemic species of *Hypericum* in North-East of Iran. *Asian J Plant Sci* 2007;6:354-358.
- Mc Donald RE, Avery DR, Dean JA. *Dentistry For The Child and Adolescent*. 8th Edition, Indiana, Mosby Year Book. 2004; 340-356.
- Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* 2006;79(2):105-111.
- Meral GE, Karabay NÜ. In vitro antibacterial activities of three *Hypericum* species from West Anatolia. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* 2002; 6-10.
- Milosevic T, Solujic S. Antimicrobial activity of the *Hypericum perforatum* L. plant. *Bull Chem Technol Macedonia* 2006;25(2):127-130.
- Milosevic T, Solujic S, Sukdolak S. In vitro study of ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. on growth and sporulation of some bacteria and fungi. *Turkish J Biol* 2007;31:237-241.

- Misra S, Tahmassebi JF, Brosnan M. Early childhood caries--a review. *Dent update* 2007;34(9):556-564.
- Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. *Caries Res* 2001;35:149-155.
- Moran J, Addy M, Newcombe R. A 4-day plaque regrowth study comparing an essential oil mouthrinse with a triclosan mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1997;24:636-639.
- Mortensen T, Shen S, Shen F, Walsh MK, Sims RC, Miller CD. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytother Res* 2012;26(9):1327-1333.
- Muller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* 2003;47(2):101-109.
- Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023-3029.
- Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 1997;30:129-134.
- Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology Middle East and Africa Edition*. 10th Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Company. 2007;99-208.
- Norman OH, Garcia- Godoy F. *Introduction to Primary Preventive Dentistry*. 6th edition, New Jersey, Pearson Prentice Hall. 2004; 23-45.
- Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol* 2002;29:400-410.
- Özalp Ş. Kitosan ve propolis içeren yeni geliştirilmiş diş macunlarının diş dokuları üzerine etkilerinin ve biyomekanik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora tezi*, 2007; 28-35.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997;14:216-48.
- Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2467-2472.
- Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005;32(6):180-195.

- Palombo EA. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:1-15.
- Paterniti I, Briguglio E, Mazzon E, Galuppo M, Oteri G, Cordasco G, Cuzzecrea S. Effect of *Hypericum perforatum*, in rodent model of periodontitis. *BMC Complement Altern Med* 2010;10(73):1-10.
- Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31(1):3-23.
- Philip G, Dayakar MM, Divater V, Prasad S. Emerging concepts in oral chemical plaque control--an overview-. *Int J Dent Clin* 2012;4(2):49-51.
- Pistorius A, Willershausen B, Steinmeier EM, Kreisler M. Efficacy of subgingival irrigation using herbal extracts on gingival inflammation. *J Periodontol* 2003;74:616-622.
- Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res* 2004;83:43-47.
- Poggi P, Baena RR, Rizzo S, Rota MT. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effect on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 2003;74:623-629.
- Quiney C, Billard C, Faussat AM, Salanoubat C, Kolb JP. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leuk Lymphoma* 2007;48(8):1587-1599.
- Quirynen M. Microbiology of Periodontal Disease In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA editörs. *Clinical Periodontology*. 8th Ed., Newyork, WB Saunders Co. 2006;134-169.
- Quirynen M, deSoete M, Pauwels M, Goossens K, Teughels W, vanEldere J. Bacterial survival rate on tooth- and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. *J Clin Periodontol* 2001;28:1106-1114.
- Rancic A, Sokovic M, Vukojevic J, Simic A, Marin P, Duletic-lausevic S, Djokovic D. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Myrrhis odorata*(L.) scop, *Hypericum perforatum*(L.) and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J Essen Oil Research* 2005;17:341-345.
- Rao SG, Udupa AL, Rao G, Rao PGM, Kulkarni DR. Wound healing activity of *Calendula officinalis* and *Hypericum*: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia* 1991;62:508-510.

- Rasooli I, Shayegh S, Astaneh S. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *Int J Dent Hyg* 2009;7(3):196-203.
- Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 2001;34(1):116-118.
- Rezusta A, Lopez-Chicon P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Diez D, Agut M, Semino C, Nonell S, Revillo MJ, Aspiroz C, Gilaberte Y. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochem Photobiol* 2012;88(3):613-619.
- Ripa LW. A critique of topical fluoride methods (dentifrices, mouthrinses, operator-, and self-applied gels) in an era of decreased caries and increased fluorosis prevalence. *J Public Health Dent* 1991;51(1):23-41.
- Roberson TM, Heyman HO, Swift EJ. *Introduction to Art and Science of Operative Dentistry*. 5th Edition, St. Louis, Mosby Co. 2011;67-134.
- Robertshaw H, Leppard B. Contact dermatitis to triclosan in toothpaste. *Contact Dermatitis* 2007;57(6):383-384.
- Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res* 1996;30:458-464.
- Rose RK, Turner SJ. Fluoride-induced enhancement of diffusion in streptococcal model plaque biofilms. *Caries Res* 1998;32:227-232.
- Rugg-Gunn A, Banoczy J. Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use. *Acta Med Acad* 2013;42(2):168-178.
- Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 2010;131(3):511-521.
- Sampaio FC, Pereira Mdo S, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MAJ. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Ethnopharmacol* 2009;124(2):289-294.
- Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 1993;72:508-516.
- Santos A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003;30(5):13-16.
- Sardella A, Lodi G, Demarosi F, Tarozzi M, Canegallo L, Carrassi A. *Hypericum perforatum* extract in burning mouth syndrome: a randomized placebo-controlled study. *J Oral Pathol Med* 2008;37:395-401.

- Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 1999;353(19):21-29.
- Schempp CM, Winghofer B, Lütke R, Simon-Haarhaus B, Schöpf E, Simon JC. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol* 2000;142(5):979-984.
- Schempp CM, Winghofer B, Müller K, Schulte-Monting J, Mannel M, Schopf E, Simon JC. Effect of oral administration of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin erythema and pigmentation induced by UVB, UVA, visible light and solar stimulated radiation. *Phytother Res* 2003;17(2):141-146.
- Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hosp Infect* 1998;40:257-262.
- Schmalz G. *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st Edition, Verlag, Springer Berlin Heidelberg. 2009;13-40.
- Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994;22:6-11.
- Selwitz RH, Ismail A, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007;369:51-59.
- Sereviratne CJ, Wong RWK, Hagg U, Chen Y, Herath TDK, Samaranayake PL, Kao R. *Prunus mume* extract antimicrobial activity against pathogenic oral bacteria. *Int J Pediatr Dent* 2011;21(4):299-305.
- Silverman S, Wilder R. Antimicrobial mouthrinse as part of a comprehensive oral care regimen safety and compliance factors. *JADA* 2006;137:22-26.
- Simonsson T, Bondesson H, Rundegren J, Edwardsson S. Effect of delmopinol on in vitro dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in human saliva. *Oral Microbiol and Immunol* 1991;6:305-309.
- Sipahi C, Özen J, Ural AU, Dalkız M, Beydemir B. Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi. *Gülhane Tıp Der* 2005;47:275-278.
- Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod* 2007;29(2):157-160.
- Soares VC, Varanda EA, Raddi MS. In vitro basal and metabolism-mediated cytotoxicity of flavonoids. *Food Chem Toxicol* 2006;44(6):835-838.

- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63(4):322-331.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cuigini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
- Southwell IA, Bourke CA. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 2001;56(5):437-441.
- Sosa S, Pace R, Bornancin A, Morazzoni P, Riva A, Tubaro A, Loggia RD. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharm Pharmacol* 2007;59:703-709.
- Stamm JW. Epidemiology of gingivitis. *J Clin Periodontol* 1986;13:360-370.
- Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by taqman real-time PCR. *Clin Med Res* 2005;3:176-185.
- Süntar I, Oyardı O, Akkol EK, Özçelik B. Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharm Biol* 2016;54(6):1065-1070.
- Takahashi N, Iwami Y, Yamada T. Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:299-304.
- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011;90(3):294-303.
- Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;74(1):103-110.
- Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antivir Res* 1990;13:313-326.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001;65:1028-1037.
- Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005;49(3):491-516.
- Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(1):254-261.

- Tedesco LA. Behavioral research related to oral hygiene practices: A new century model of oral health promotion. *Periodontol* 2000 1995;8:15-23.
- ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006;94(1):1-9.
- Thaweboon S, Thaweboon B. In vitro antimicrobial activity of *Ocimum americanum* L. essential oil against oral microorganisms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009;40(5):1025-1033.
- The American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70(4):457-470.
- Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986;13:905-911.
- Thimothe J, Bonsi IA, Padilla-Zakour OI, Koo H. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem* 2007;55(25):10200-10207.
- Thumwanit V, Kedjaruna U. Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust Dent J* 1999;44:248-252.
- Todkar R, Sheikh S, Byakod G, Muglikar S. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol - a clinical study. *Oral Health Prev Dent* 2012;10(3):291-296.
- Torođlou S. Çenet M. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi* 2006;9(2):12-20.
- Traynor NJ, Beattie PE, Ibbotson SH, Moseley H, Ferguson J, Woods JA. Photogenotoxicity of hypericin in HaCaT keratinocytes: implications for St. John's Wort supplements and high dose UVA-1 therapy. *Toxicol Lett* 2005;158(3):220-224.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Inuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 1996;50:27-34.
- Uysal Y, Ural AU, Avcu F, Sobacı G, Hürmeriç V, Erdem Ü, Durukan AH, Bayer A, Bayraktar MZ. Meme kanseri (MCF-7) ve Burckitt lenfoma (raji) hücre dizileri üzerine in vitro ortamda hiperisin ile fotodinamik tedavi araştırma sonuçları. *Gülhane Tıp Derg* 2007;49:147-152.

- Vandenbogaerde AL, Kamuhabwa A, Delaey E, Himpens BE, Merlevede WJ, De Witte PA. Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *J Photochem Photobiol B* 1998;45(2-3):87-94.
- van der Watt E, Pretorius JC. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *J Ethnopharmacol* 2001;76(1):87-91.
- van Houte J, de Moor CE, Jansen HM. Synthesis of iodophilic polysaccharide by human oral streptococci. *Arch Oral Biol* 1970;15:263-266.
- van Houte J, Lopman J, Kent R. The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 1996;75:1008-1014.
- Vaquero MJR, Alberto MR, Manca de Nadra MC. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007;(18):93-101.
- Vattikuti UMR, Ciddi V. An overview on *Hypericum perforatum* Linn. *NPR* 2005;4(5):1-6.
- Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci* 2004;23:181-188.
- Verkaik MJ, Busscher HJ, Jager D, Slomp AM, Abbas F, van der Mei HC. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. *J Dent* 2011;39(3):218-224.
- Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP. Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine* 2001;8(4):306-309.
- Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:195-216.
- Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res* 1994;8:5-14.
- Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res* 1990;69:539-549.
- Wilson RF, Ashley FP. The relationship between the biochemical composition of dental plaque from both approximal and free smooth surfaces of teeth and subsequent 3-year caries increment in adolescents. *Arch Oral Biol* 1990;35(12):933-937.
- Winston AE, Bhaskar SN. Caries prevention in the 21st century. *J Am Dent Assoc* 1998;129(11):1579-1587.

- Wong RW, Hagg U, Samaranayake L, Yuen MK, Seneviratne CJ, Kao R. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39(6):599-605.
- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmac* 1995;46:133-152.
- Yu HH, Kim YH, Kil BS, Kim KJ, Jeong SI, You YO. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Artemisia iwayomogi*. *Planta Med* 2003;69(12):1159-1162.
- Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. *J Periodontol* 1994;65:892-3.
- Zanoli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's wort. *CNS Drug Rev* 2004;10(3):203-218.
- Zimmer S. Caries-preventive effects of fluoride products when used in conjunction with fluoride dentifrice. *Caries Res* 2001;35(1):18-21.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Feride BALLI

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Tarihi: 03.05.1984

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

1990-1995 İlköğretim, Oğulbey Mahallaesi İlköğretim Okulu, Ankara

1995-1998 Orta öğretim, Gölbaşı İnönü İlköğretim Okulu, Ankara

1998-2002 Lise Öğrenimi, Gölbaşı Anadolu Lisesi, Ankara

2002-2007 Lisans, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

2008- Doktora, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti A.D.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

2011-2013 Araştırma Görevlisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti A.D.

2013-2016 Diş Hekimi, Zonguldak Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi

E-posta: feride.cil@hotmail.com

