

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENTAL PLAK GİDERİMİNDE MİKROBİYOTA KAYNAKLI
POST-BİYOTİK MEDIATÖRLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Emine OMER OGLOU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DENTAL PLAK GİDERİMİNDE MİKROBİYOTA KAYNAKLI POST-BİYOTİK MEDIATÖRLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emine OMER OGLOU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fadime KIRAN

Dünya çapında en yaygın hastalıklardan biri olarak kabul edilen diş çürükleri aynı zamanda önemli bir halk sağlığı sorunudur. Diş plağına (biyofilm) neden olan temel karyojenik bakteriler arasında yer alan *Streptococcus mutans* ise diş çürüğünün temel etiyolojik patojeni olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatörlerin (PM) diş çürüğü patogenezindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, yeni doğan bebek fekal mikrobiyotası kaynaklı *Lactobacillus plantarum* EIR/IF-1, yunus bağırsak mikrobiyotası kaynaklı *Lactobacillus curvatus* EIR/DG-1 ve bal arısı bağırsak mikrobiyotası kaynaklı *Lactobacillus curvatus* EIR/BG-2 suşlarından elde edilen PM'lerin *Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşuna karşı antibakteriyel etkileri kuyu difüzyon yöntemi ile antibiyofilm etkinlikleri ise kristal viyole boyama esasına göre belirlenmiştir. Yetersayı algılama ilişkili gen ifadelerinin seviyeleri ise moleküler teknikler kullanılarak değerlendirilmiştir. En yüksek antibakteriyel etki (pH'ya bağlı), EIR/IF-1'den elde edilen PM kullanımı neticesinde gözlemlenmiştir. PM'lerin sub-MİK dozları, birlikte inkübasyon ve ön-muamele neticesinde karyojenik biyofilm oluşumunu ortadan kaldırmıştır. Hücre canlılığının azalması ve biyofilm oluşumundaki kayda değer değişiklikler, hem cam yüzeyler hem de *ex vivo* insan diş yüzeyleri üzerinde mikroskopik olarak da doğrulanmıştır. PM'lerin düşük dozları ise hücre canlılığını inhibe etmeksizin virülans ve yetersayı algılama ilişkili *gtfC*, *comA* ve *comX* genlerinin ifadelerini baskılamıştır. Çoklu etki gösteren PM'lerin organik asit, yağ asiti ve vitamin içerikleri de kromatografik analizler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İçerik analizleri neticesinde tüm PM'lerde en yüksek oranda tespit edilen organik asit laktik asit olarak belirlenmiştir. B-vitamin kompleksleri ise en yüksek bulunan vitaminler olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, biyolojik olarak aktif ve işlevsel moleküller içeren PM'lerin, diş çürüğü patogenezinin önlenmesinde yeni, doğal ve güvenli bir strateji olarak tasarlanabileceğine işaret etmektedir.

Haziran 2021, 105 sayfa

Anahtar Kelimeler: Dental plak, biyofilm, *Streptococcus mutans*, mikrobiyota, post-biyotik

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MICROBIOTA DERIVED POST-BIOTIC MEDIATORS IN DENTAL PLAQUE REMOVAL

Emine OMER OGLOU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fadime KIRAN

Dental caries is considered not only one of the most prevalent diseases worldwide, but also a public health problem, undoubtedly. Among the various types of cariogenic bacteria that cause dental plaque, *Streptococcus mutans* draws attention as the major etiological pathogen of dental caries. The present study aimed to assess the influence of microbiota-derived post-biotic mediators (PM) on the pathogenesis of dental caries. Within this aim, the antibacterial activity of PMs obtained from *Lactobacillus plantarum* EIR/IF-1 derived from infant fecal microbiota, *Lactobacillus curvatus* EIR/DG-1 derived from dolphin gut microbiota, and *Lactobacillus curvatus* EIR/BG-2 derived from honey bee gut microbiota, against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 were analyzed by agar well diffusion assay and antibiofilm activities were determined according to crystal violet staining principle. The levels of quorum sensing related gene expressions were also evaluated using molecular techniques. The highest antibacterial effect (dependent on pH) was observed with the use of PM from EIR/IF-1. Sub-MIC doses of PMs were eliminated the cariogenic biofilm formation following the co-incubation and pretreatment assays. The reduction of cell viability and notable changes in biofilm formation was also confirmed microscopically both on glass coverslips and *ex vivo* human teeth surfaces by microscopic tools. Low doses of PMs down-regulated the expression of *gtfC*, *comA*, and *comX*, without any significant growth inhibition. Organic acid, fatty acid and vitamin content analyzes of multi-functional PMs were also carried out using chromatographic analyses. As a result of the content analysis, the highest organic acid detected in all PMs was determined as lactic acid. B-vitamin complexes were found to be the most abundant vitamins. The obtained data indicate that PMs containing biologically active and functional molecules can be designed as a new, natural and safe strategy for the prevention of dental caries pathogenesis.

June 2021, 105 pages

KeyWords: Dental plaque, biofilm, *Streptococcus mutans*, microbiota, post-biotic

TEŞEKKÜR

Hayallerimi gerçekleştirip hedeflerime ulaşmak için çıktığım bu yolun ilk adımlarında, bana tüm zorluklarla nasıl başa çıkmam gerektiğini, eğer bir şeyi gerçekten istiyorsam asla vazgeçmeden savaşmam gerektiğini öğreten, ailemden uzak olduğum zamanlarda bana kol kanat gerip yalnız hissettirmeyen, tek dokunuşuyla hayatımda adeta sihirli bir etkisi olan saygıdeğer danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fadime KIRAN'a,

Tez sürecimde desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, laboratuvarındaki tüm imkanlardan sonuna kadar yararlanmama izin veren Sayın hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.) ve Öğr. Gör. Okan ONAR'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.), tez jürimde yer alarak değerli katkılarını sunan Sayın hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a (Gazi Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.), tezin deneysel aşamalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen, her daim bildiklerini ve tecrübelerini paylaşmaktan yana olan değerli hocalarım Arş. Gör. Başar KARACA (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D.) ve Arş. Gör. Dr. Sedat SEVİN'e (Ankara Üniversitesi, Farmakoloji ve Toksikoloji A.B.D.),

Hem tez çalışmamın hem de günümün her anında yanımda olup bana destek olan Ankara'daki ailemin vazgeçilmez üyeleri Hazal KİBAR, Diaa ZATARİ, Ozan HALİŞÇELİK, Muhsin AKYOL, Buket ÇELİK, Emin ELDEMİR ve Yağmur TAŞKIRAN'a (Ankara Üniversitesi, Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Grubu),

Bu süreçte de olduğu gibi her zaman arkamda bir dağ gibi duran, mesafeleri yok zoru kolay eden canım babam Gürhan OMER OGLOU'na, canım annem Perihan SOUKLA'ya ve evimizin küçüğü canım kardeşim Hikmet Can OMER OGLOU'na,

Yüksek lisans bursiyeri olduğum YURT DIŞI TÜRKLER ve AKRABA TOPLULUKLAR BAŞKANLIĞI'na her daim desteklerinden dolayı
Son olarak hayaller kurduğu, hep elimden tuttuğu, ben olduğu ve yolundan dönmediği için kendime teşekkür ederim...

Bu tez çalışması, "Periodontal hastalıklar için post-biyotik mediatörleri içeren kollajen/keratin temelli membranların geliştirilmesi ve *in vitro/in vivo* koşullarda etkinliklerinin değerlendirilmesi" konulu TÜBİTAK (1001, 119S865) projesi tarafından desteklenmiştir.

Emine OMER OGLOU
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Ağız ve Diş Sağlığının Önemi.....	5
2.2 Diş Çürükleri	8
2.3 Dental Plak (Biyofilm)	10
2.3.1 Dental plak (biyofilm) oluşum aşamaları.....	11
2.3.2 Dental plak (biyofilm) oluşum nedenleri.....	14
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	15
2.4.1 Genel özellikleri.....	15
2.4.2 Biyofilm formasyonu.....	17
2.4.3 Stres toleransı	17
2.4.4 Yetersayı algılama (QS; Quorum Sensing) mekanizması	18
2.5 Dental Plak (Biyofilm) Giderimi İçin Kullanılan Yaklaşımlar.....	19
2.6 Diş Çürüklerinin Önlenmesine Yönelik Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Bileşiklerdeki Son Gelişmeler	21
2.6.1 Mikrobiyal karyojenik biyofilm inhibitörleri: Probiyotikler	22
2.6.2 Mikrobiyal karyojenik biyofilm inhibitörleri: Post-Biyotik Mediatörler	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
3.1 Materyal	32
3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişim koşulları	32
3.1.2 Besiyerleri, tampon ve çözeltiler	32
3.1.3 Bakteri kültürlerinin saklanması	33
3.2 Yöntem	34
3.2.1 İzolatların tanımlanması	34
3.2.2 Mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatörlerin eldesi.....	35
3.2.3 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi.....	36
3.2.3.1 Kuyu-difüzyon yöntemi ile inhibisyonun tespiti	36
3.2.3.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi.....	37
3.2.3.3 Minimum bakteriyosidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi	37
3.2.4 Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi.....	38
3.2.4.1 <i>Streptococcus mutans</i> 'ın biyofilm üretim koşullarının optimizasyonu.....	38
3.2.4.2 PM'lerin antibiyofilm etkisinin mikrotitre plakalar üzerinde belirlenmesi	39
3.2.4.3 PM'lerin antibiyofilm etkisinin diş yüzeylerinde belirlenmesi	40
3.2.4.4 SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) analizleri	41
3.2.4.5 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop analizleri.....	41

3.2.5 Quorum sensing (yetersayı algılama)-ilişkili gen ifadelerinin kantitatif Real Time-PZR ile belirlenmesi	43
3.2.6 PM'lerin metabolit içeriğinin belirlenmesi.....	45
3.2.6.1 Organik asit içerik analizi	45
3.2.6.2 Yağ asiti içerik analizi.....	47
3.2.6.3 Vitamin içerik analizi.....	48
3.2.7 İstatistiksel analizler	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
4.1 İzolatların Tanımlanması	51
4.2 Post-Biyotik Mediatörlerin Antibakteriyel Aktiviteleri	54
4.3 Post-Biyotik Mediatörlerin Antibiyofilm Aktiviteleri	56
4.3.1 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun ideal biyofilm üretim parametreleri.....	56
4.3.2 PM'lerin <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine etkisi....	59
4.3.3 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun üretmiş olduğu biyofilmin ve PM'lerin antibiyofilm etkisinin SEM ile değerlendirilmesi	64
4.3.4 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun üretmiş olduğu biyofilmin ve PM'lerin antibiyofilm etkisinin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile değerlendirilmesi.....	69
4.3.5 PM'lerin <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun QS ve virülans ilişkili gen ifadesi üzerine etkisi	74
4.3.6 PM'lerin metabolit içerikleri	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
KAYNAKLAR	88
EKLER.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

cm ²	Santimetre kare
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
r	Çap
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
>	Büyük
<	Küçük
°C	Santigrat (Celcius) derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

A	Absorbans
A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AHL	Açillenmiş homoserin lakton
AMP	Antimikrobiyal peptid
ATCC	American Type Culture Collection Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
Ca	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid tri fosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Food and Agriculture Organization Gıda ve Tarım Örgütü
G	Guanin

GRAS	Generally Recognized as Safe Genel olarak güvenli kabul edilir
HBE	Hücre bağımsız ekstrakt
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
Kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterileri
Lux	Lusiferaz
LPS	Lipopolisakkarit
Mg	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PM	Post-biyotik mediatörler
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe besiyeri
MRSA	Metisilin-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Normalite
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OD	Optik yoğunluk
P	Fosfor
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
pH	Hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
QS	Quorum-sensing Yeter sayı algılama
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SF	Serum fizyolojik
T	Timin
TBE	Tris Borik asit EDTA
TLR	Tool benzeri reseptör
TSB	Triptik Soy Broth
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Ağız hastalıklarının genel etkileri	6
Şekil 2.2 Diş çürük lezyonları.....	8
Şekil 2.3 Diş çürüklerinin etiolojisinde önemli kabul edilen faktörler	10
Şekil 2.4 Dental plak (biyofilm) oluşum aşamaları	12
Şekil 2.5 Pelikül oluşumu, yapışma ve kolonizasyona şematik bir genel bakış	14
Şekil 2.6 <i>Streptococcus mutans</i> 'ın serotiplerine göre polisakkarit yapısı	16
Şekil 2.7 Probiyotik Laktobasiller tarafından mikroorganizmalar üzerinde önerilen lokal etki mekanizmaları	24
Şekil 2.8 Post-biyotik mediatörlerin ana gruplarının gösterimi	28
Şekil 2.9 Post-biyotik mediatörlerin konakçı üzerindeki etki mekanizmaları	28
Şekil 2.10 Biyofilm oluşumunun beş aşaması	30
Şekil 3.1 Toz formda PM eldesinin aşamaları	36
Şekil 3.2 Kaplama işlemi (a) ve Taramalı Elektron Mikroskobu, SEM (b) genel görüntüleri	42
Şekil 3.3 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop genel görüntüsü	43
Şekil 3.4 Organik asit analizinde kullanılan UV Dedektörlü HPLC cihazı.....	46
Şekil 3.5 Organik asit analizi amacıyla UV Dedektörlü HPLC'de kullanılan koşullar..	46
Şekil 3.6 Yağ asiti analizinde kullanılan GC-MS cihazı ve standardı	47
Şekil 3.7 Yağ asiti analizi amacıyla GC-MS'de kullanılan koşullar	48
Şekil 3.8 Vitamin analizinde kullanılan LC-MS MS cihazı ve standardı	49
Şekil 3.9 Vitamin analizi amacıyla LC-MS MS'de kullanılan koşullar	50
Şekil 4.1 İzolatlara ait 16S rRNA PZR ürününün (1492 bç) agaroz jel elektroforez görüntüsü	52
Şekil 4.2 Bebek fekal mikrobiyotasından izole edilen EIR/IF-1suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri	53
Şekil 4.3 Yunus bağırsak mikrobiyotasından izole edilen EIR/DG-1suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri.....	53
Şekil 4.4 Bal arısı bağırsak mikrobiyotasından izole edilen EIR/BG-2 suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri.....	54
Şekil 4.5 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşuna karşı sergilenen antibakteriyel aktivitenin petri görüntüleri	55
Şekil 4.6 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşuna karşı sergilenen antibakteriyel aktivitenin 96 kuyucuklu mikrotitre plakadaki görüntüleri	56
Şekil 4.7 Aerobik koşullar altında iki farklı besiyerinde (TSB-BHI) ve farklı sükröz konsantrasyonlarında <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi	57
Şekil 4.8 Anerobik koşullar altında iki farklı besiyerinde (TSB-BHI) ve farklı sükröz konsantrasyonlarında <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi	58
Şekil 4.9 İdeal biyofilm oluşumunda inkübasyon süresi ve sıcaklığı ile sükröz konsantrasyonunun kümülatif etkilerinin değerlendirilmesi	59

- Şekil 4.10 a. *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$, ** $p<0.01$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi ...61
- Şekil 4.11 a. *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$, ** $p<0.01$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi ...61
- Şekil 4.12 a. *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$; ** $p<0.01$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi ...62
- Şekil 4.13 a. *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi 62
- Şekil 4.14 a. *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi 63
- Şekil 4.15 a. *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi 63
- Şekil 4.16 Bakterilere ait PM'lerin sub-MİK (MİK-50) dozlarının *S. mutans* ATCC 25175 suşunun dış yüzeyinde oluşturduğu biyofilm üzerine olan etkisini gösteren kristal viyole boyama sonuçları 64
- Şekil 4.17 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşunun ideal koşullara biyofilm üretiminin farklı büyütmelerdeki SEM mikrografları..... 65
- Şekil 4.18 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan ekisini gösteren SEM mikrografları 66
- Şekil 4.19 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan ekisini gösteren SEM mikrografları 67
- Şekil 4.20 *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan ekisini gösteren SEM mikrografları 68
- Şekil 4.21 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri..... 70
- Şekil 4.22 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri..... 71

Şekil 4.23 <i>L. curvatus</i> EIR/BG-2 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri.....	72
Şekil 4.24 PM'lerin sırasıyla MİK-50 ve MİK-75 konsantrasyonları ile birlikte inkübasyon sonucunda oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri.....	73
Şekil 4.25 Gen ifadelerinin değişim katsayıları	75
Şekil 4.26 PM'lerin farklı konsantrasyonları ile birlikte muamele edilen <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun hücre sayım sonuçları (log kob/mL)	76
Şekil 4.27 Organik asit standartlarına ait kromatogram.....	78
Şekil 4.28 <i>L. plantarum</i> EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı.....	78
Şekil 4.29 <i>L. curvatus</i> EIR/DG-1 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı	79
Şekil 4.30 <i>L. curvatus</i> EIR/BG-2 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı	79
Şekil 4.31 FAME standartlarına ait kromatogram	81
Şekil 4.32 <i>L. plantarum</i> EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı	81
Şekil 4.33 <i>L. curvatus</i> EIR/DG-1 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı	82
Şekil 4.34 <i>L. curvatus</i> EIR/BG-2 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Biyofilm modeli kullanılarak incelenen probiyotikler ve karyojenik mikroorganizmalara karşı biyoaktiviteleri.....	25
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan izolatların kodları, gelişim koşulları ve izolasyon kaynakları.....	32
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözeltilerin içerikleri.....	33
Çizelge 3.3 cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	44
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin dizileri.....	45
Çizelge 4.1 MALDI-TOF analizi neticesinde izolatların tanımlama sonuçları.....	51
Çizelge 4.2 İzole edilen DNA'ların saflık ve miktar (ng/μL) tayinleri.....	52
Çizelge 4.3 Üç farklı parametrenin <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan etkisi.....	58
Çizelge 4.4 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşunun biyofilm giderimi üzerine PM'lerin etkisi (% giderim).....	60
Çizelge 4.5 PM'lerin metabolit içerikleri.....	77
Çizelge 4.6 Çalışma kapsamında analiz edilen yağ asitleri.....	80

1. GİRİŞ

Ağız ve diş sağlığı yaşamın her evresinde genel sağlık durumunun önemli bir bileşeni olmuştur. Sadece diş ve dişle ilişkili dokulara değil vücudun farklı sistemlerine de zarar verebilen dental hastalıklar ise, büyük kitleler üzerindeki önemli etkileri ve sosyo-ekonomik zararları dikkate alındığında “sessiz” ancak küresel bir salgın olarak dikkat çekmektedir. Dental hastalıkların ilerlemesine neden olan en önemli etiyolojik faktör “**Mikrobiyal dental biyofilm (plak)**” oluşumudur. Dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen diş çürükleri ise, biyofilm ile ilişkili en yaygın dental hastalıklar arasına ilk sırada yer almaktadır. Küresel Ağız Sağlığı Veri Bankası bilgilerine göre hemen hemen tüm yaş gruplarını olumsuz yönde etkileyen daimi dişlerde çürük görülme sıklığı % 49 ile % 83 arasında değişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise daimi dişlerde tedavi edilmemiş diş çürüklerinin en yaygın sağlık sorunu olduğunu rapor etmektedir.

Diş çürüklerinin oluşumu üzerindeki etkilerine ilaveten, diş eti altında meydana gelen mikrobiyal dental biyofilm içerisinde bakterilerin birikmesi çevre dokularda inflamasyona neden olmakta, bu durum ise gingivitis (diş eti iltihabı) olarak tanımlanmaktadır. Eğer meydana gelen mikrobiyal dental biyofilm ortamdan uzaklaştırılmaz ise diş etinde gelişen enfeksiyon periodontiyumun diğer dokularını etkileyerek alveolar (çene kemiği) kemiğe ilerleyebilmekte ve sonrasında agresif bir patoloji olarak nitelendirilen periodontitisin oluşmasına neden olmaktadır. Başarılı bir şekilde tedavi gerçekleştirilemediğinde ise, erken diş kayıpları kaçınılmaz son olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü periodontal hastalıkların tüm dünyada kalp hastalıklarından sonra en yaygın görülen ikinci kronik hastalık olduğunu ve dünya çapında % 11 prevalans ile yaklaşık 743 milyon insanı etkilediğini bildirmektedir. Mikrobiyal dental biyofilmin giderilememesi neticesinde ortaya çıkan ağız ve diş sağlığı sorunları ise bireyleri gerek ekonomik gerekse sosyal bakımdan oldukça etkilemektedir. Dolayısıyla, diş çürükleri başta olmak üzere periodontal hastalıkların etkin şekilde tedavi edilmesi halk sağlığı yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Ağız ve diş sağlığı sorunlarının tedavisi genellikle evrensel sağlık sigortasının bir parçası olmayıp pahalı işlemleri kapsamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü çoğu yüksek gelirli ülkelerde, diş tedavisinin toplam sağlık harcamalarının ortalama % 5'ini oluşturduğunu rapor etmektedir. Ağız ve diş sağlığı sorunlarının önemli bir kısmı büyük ölçüde önlenilmekte ve erken evrelerinde tedavi edilebilmektedir. Olgun biyofilm oluşumunu engellemek için özellikle mekanik işlemlerle (diş fırçalama, ağız gargarası, diş ipi) plağın giderilmesi tavsiye edilse de, kendi kendine yapılan bu işlemlerin kalitesi her zaman yeterli olmayabilmektedir. Diş macunları başta olmak üzere çeşitli dental ürünler içerisinde yer alan klorheksidin, triklosan ve florür gibi antimikrobiyal kimyasal ajanlar ise olgun biyofilmleri penetre yeteneğine sahip olmadığından dolayı etkinlik açısından sınırlı kalmakta ve biyofilmleri rezervuar olarak kullanan patojenlere etki edememektedir. Kimyasal içerikli bu antimikrobiyal ajanların gereğinden fazla miktarda ve sürede kullanılması da diş yüzeyi renklenmelerine, ağız kuruluğuna ve yanmasına, mide ve bağırsak hastalıklarına ve tat almada bozukluklara neden olabilmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar bu antimikrobiyal kimyasal ajanların sinirsel toksisite gibi önemli yan etkilere sebebiyet verdiğini ve aynı zamanda doğal oral mikrobiyota dengesini bozarak dizbiyozise neden olabileceğini rapor etmektedir (Vijayakumar vd. 2021). Dolayısıyla, ağız ve diş sağlığını koruyabilmek adına sadece patojen inhibisyonunu değil aynı zamanda biyofilm yapılarını hedefleyen ancak oral mikrobiyota üzerinde olumsuz etkiler sergilemeyecek, etkin ve güvenilir önlemlerin alınması oldukça önemli kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar; tanımlanmış bir prosesle sürekli olarak üretilebilen, üretimi kolay ve düşük maliyetli, yan etkileri oldukça az olan, doğal ve güvenilir metabolitlerin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır.

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeterli miktarda tüketildikleri takdirde konak sağlığı üzerinde olumlu etkiler sergileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotikler, oral mikrobiyotanın da önemli bir parçası olmaları ve dolayısıyla genel olarak güvenilir kabul (GRAS, Generally Recognized as Safe) edilmelerinden dolayı ağız ve diş sağlığı açısından umut vaat eden önemli bir araştırma alanıdır. Probiyotik mikroorganizmaların ağız ve diş sağlığı alanında kullanımı oldukça yeni bir kavram olmasına rağmen, son yıllarda hız kazanan

çalışmalar, probiyotiklerin ağız ve diş sağlığı üzerindeki potansiyel etkinliklerine dikkat çekmektedir (Seminario-Amez vd. 2017). Probiyotik uygulamalar; ağız boşluğundaki önemli patojenlerin gelişimini engellemekte ve diş çürümelerini, periodontal hastalıkları ve ağız kokusunu kontrol altına alabilmektedir. Son zamanlarda oral probiyotikleri içeren pastil, tablet, sakız, kapsül, gargara ve diş macunu ürünlerinin marketlerde yerini alması, ağız ve diş sağlığını hedef alan probiyotik pazarını hareketlendirmektedir. Bakteriyosin üreticisi *Streptococcus salivarius* K12 suşu, ağız kokusunu engellemek amacıyla gargaralara ilave edilmiş ticari bir probiyotik olarak tanımlanmaktadır. Üç farklı probiyotik suşu içeren ve ProBiora3® olarak adlandırılan gargaranın diş çürükleri ve periodontitis ile ilişkili bakterilerin sayısında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (Zahradnik vd. 2009). EvoraPlus ise Amerika Birleşik Devletleri'nde ağız ve diş sağlığı için spesifik olarak üretilen ilk probiyotik içerikli tablet ürünüdür. Tablet düzenli günlük kullanımının diş eti ve diş sağlığını olumlu yönde etkilediği, diş beyazlamasına katkıda bulunduğu, doğal ve ferah bir nefes sağladığı belirtilmektedir. GUM® Periobalance® ise plak oluşumunu engellemek için nane pastili olarak piyasaya sunulan bir diğer probiyotik üründür. Kanada'da marketlerde bulunan ve BLIS K12 olarak adlandırılan sakız ise ağız ve diş sağlığı için tasarlanmış probiyotik bir üründür. PerioBiotic™ ise *Lactobacillus paracasei* suşu ile birlikte ksilitol ve kalsiyum gliserofosfatı içeren bir diş macununun ise düzenli kullanıldığı takdirde biyofilm ilişkili patojenlerin sayısında azalmalara neden olduğu rapor edilmektedir (Jose vd. 2013).

Son zamanlara güçlü antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri ile dikkat çeken ve güvenilir olarak kabul edilen probiyotiklerin, ağız boşluğunda hedef lokasyonlarda istenilen sayıda canlı olarak kalınamaları ve bunu takiben kolonizasyon sınırlamaları ile karşılaşılması, bununla birlikte oldukça düşük bir olasılık olsa da sepsis risklerinin rapor edilmesi, üstesinden gelinmesi gereken önemli zorluklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Probiyotiklerin güçlü antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin esas olarak fermentasyon sürecinde üretmiş oldukları antimikrobiyal peptitler, organik asitler ve hidrojen peroksit gibi biyoaktif bileşiklere bağlı olduğu bilinmektedir. Bu özellikleri dikkate alındığında belirtilen güncel sorunların üstesinden gelebilmek adına post-biyotik mediatörlerin (PM) kullanımına yönelik alternatif bir saha oluşmaktadır. Bilimsel arenada yeni bir terim olmasına rağmen, post-biyotikler (metabiyotikler, biyojenikler),

canlı hücreler tarafından salgılanan (ürünler veya metabolik yan ürünler) veya enzimler, peptitler, teikoik asitler, peptidoglikan türevli muropeptitler, polisakkaritler, hücre yüzey proteinleri ve organik asitler gibi bakteriyel liziden sonra ortaya çıkan çözünebilir faktörleri ifade etmektedir (Zolkiewicz vd. 2020). Özellikle sinyal yolları ve bariyer fonksiyonu üzerinde canlı hücreler kadar etkili olduğu belirtilen post-biyotikler net kimyasal yapıları, güvenilir doz parametreleri, memeli enzimleri tarafından hidrolize karşı dirençli olmaları, uzun raf ömürleri ve antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antihipertansif, antikarsinojenik ve antioksidan aktiviteye sahip olabilecek çeşitli sinyalleşme moleküllerini (mediatörler) içermelerinden dolayı son yıllarda dikkat çekmektedir. Bu özellikler, PM'lerin spesifik fizyolojik fonksiyonları geliştirerek konak sağlığının iyileştirilmesine çoklu katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir (Nakamura vd. 2016, Aguilar-Toala vd. 2018).

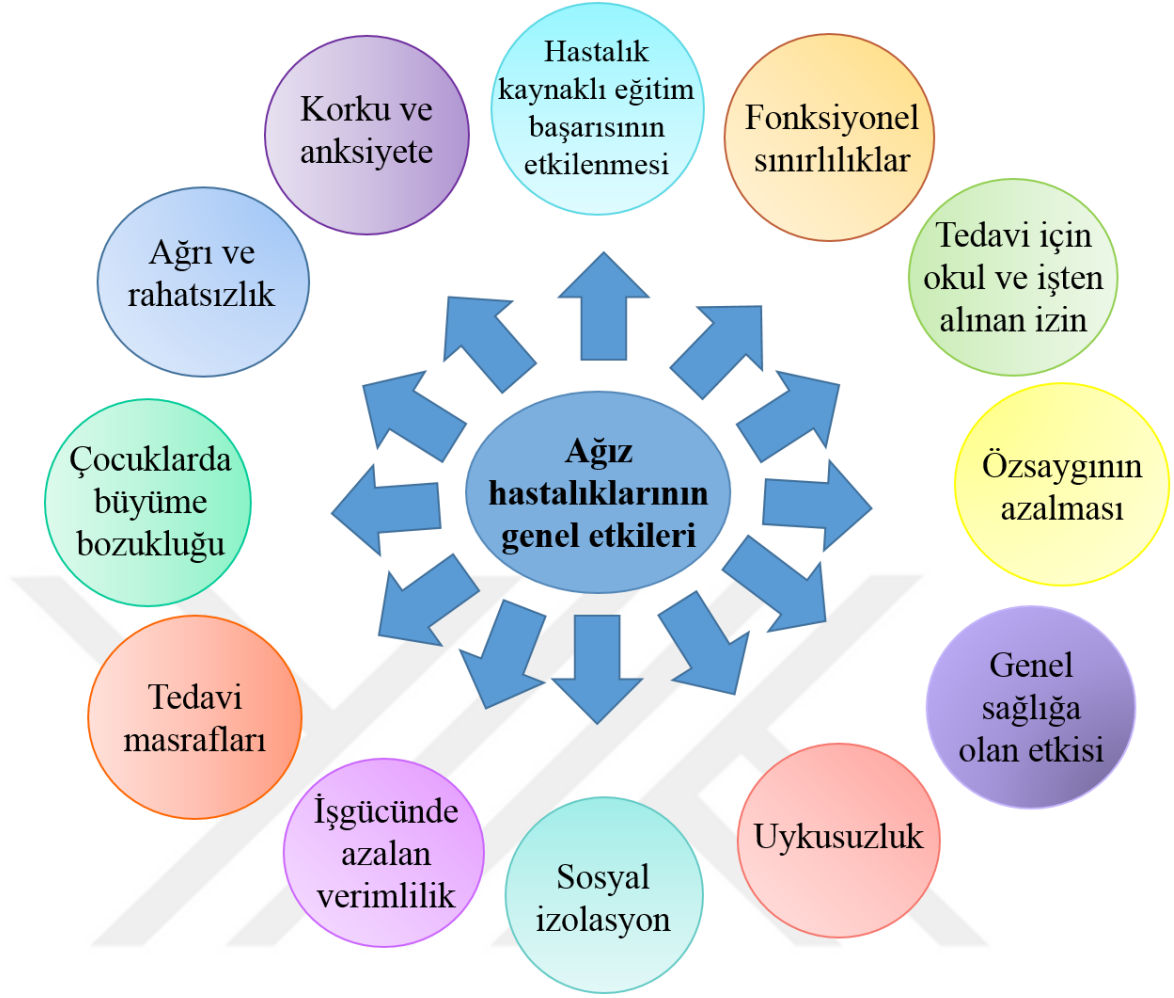
Günümüzde PM'ler, doğrudan veya dolaylı olarak konakçı üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle her geçen gün daha da artan bir ilgi görmektedir. Bu tez çalışmasının hipotezi, PM'lerin diş çürüğü patogeneğinde etkili bir koruma sağlayıp sağlayamayacağı üzerine kurulmuş olup, diş çürüklerinin başlıca etiyolojik patojeni olarak kabul edilen *Streptococcus mutans*'a karşı PM'lerin etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çeşitli mikrobiyota nişlerinden izole edilen ve canlı hücrelerinin *Streptococcus mutans* üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenen potansiyel üç izolat seçilmiş, PM'leri elde edilmiş, *S. mutans*'ın büyümesi ve biyofilm oluşumu üzerindeki engelleyici etkileri mikrobiyolojik analizler ve mikroskopik değerlendirmeler [Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu (LTKM)] neticesinde analiz edilmiştir. *Streptococcus mutans*'ın biyofilm oluşumunda kilit rol oynayan yetersayı algılama (QS; Quorum Sensing) ilişkili genlerin ifadesi üzerine olan etkileri ise moleküler genetik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise PM içerisinde bulunan biyoaktif bileşikler kromatografik araçlar ve Kütle Spektrofotometrisi (MS) kullanılarak belirlenmiştir. Bugüne kadar gerçekleştirilen mevcut literatüre dayanarak, PM'lerin karyojenik biyofilmlerin kontrolü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için *ex vivo* olarak diş yüzeyleri üzerinde gerçekleştirilen ilk çalışma olmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Ağız ve Diş Sağlığının Önemi

Ağız ve diş sağlığı, genel sağlığımızın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Dünya Diş Hekimleri Birliği çok yönlü bir kavram olarak genel ağız sağlığını; “ağrı, rahatsızlık, ve kraniasiyal komplekste hastalık olmaksızın güvenle konuşabilmek, gülümsemek, koku ve tat almak, dokunmak, çiğnemek, yutabilmek ve yüz mimikleri ile bir takım duyguları ifade edebilmek” olarak tanımlamaktadır (FDI; World Dental Federation 2016). Ağız hijyenine dikkat edilmemesi durumunda ise ağız ve diş sağlığı olumsuz yönde etkilenmekte ve genel sağlık koşulları üzerinde birçok olumsuz sonuca neden olmaktadır (Şekil 2.1). Gerçekleştirilen çalışmalar, ağız ve diş hastalıklarının sadece oral boşluğu ve dişleri etkilemediğini, aksine birçok sistemik hastalıkların gelişme riskini arttırdığını ve kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve diyabet başta olmak üzere birçok kronik hastalık ile ilişkili olduğunu rapor etmektedir. Bununla birlikte ağız sağlığının bozulması, insanların yemek yemelerini ve konuşmalarını etkileyebilmekte, yaşam kalitelerini ve refahlarını değiştirerek fiziksel ve psikolojik sorunlara hatta kişinin kendini sosyal olarak izole etmesine neden olabilmektedir (Heilmann vd. 2015). 1976 yılında Cohen ve Jago, diş hekimliğinin en büyük katkısının yaşam kalitesini iyileştirmek olduğunu savunmuştur. Günümüzde karşılaştığımız tüm bu kümülatif sonuçlar dikkate alındığında ise, çağdaş sağlık kavramları ağız sağlığının sadece ağız durumu ile ilgili değil; genel, fiziksel, psikolojik ve sosyal iyilik hali terimleriyle de tanımlanması gerektiğini öne sürmektedir.

Klinik açıdan değerlendirildiğinde; şeker tüketiminin, tütün ve alkol kullanımının, kötü hijyen koşulları dahil olmak üzere bir dizi önlenemez risk faktörlerinin ve bunların altında yatan sosyal ve ticari belirleyicilerin, ağız ve diş hastalıklarının temel nedenleri olduğu belirtilmektedir. Bu belirleyiciler, bulaşıcı olmayan hastalıklar tarafından paylaşılan ortak risk faktörleriyle birlikte, önleme ve kontrol amacıyla entegre stratejiler geliştirmek için temel sağlamaktadır (WHO 2020).



Şekil 2.1 Ağız hastalıklarının genel etkileri

Ağız ve diş hastalıkları, kronik hastalıklar arasında en sık rastlanılan durum olmakla birlikte; yaygınlığı, birey ve toplum üzerindeki etkileri ve tedavilerinin maliyeti dikkate alındığında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak da önem arz etmektedir. Diş çürüğü, periodontal (diş eti) hastalıklar, diş kaybı, dudak ve ağız boşluğu kanserleri ağız hastalıkları arasında sıklıkla rapor edilen olgular arasında yer almaktadır. Bu hastalıklar büyük ölçüde önlenebilir olmalarına rağmen, küresel olarak en yaygın gözlemlenen bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında rapor edilmektedirler (WHO 2020). Dünya Diş Hekimleri Birliği tarafından yayımlanan araştırma sonuçları, 1990 ile 2017 yılları arasında 3.5 milyardan fazla insanın ağız hastalıklarından muzdarip olduğunu göstermektedir. Kalıcı dişlerdeki tedavi edilmemiş diş çürükleri ise, 2.3 milyar insanı etkileyerek dünya çapında en yaygın görülen olgu olarak rapor edilmektedir. Toplam diş kaybının başlıca nedenlerinden biri olan şiddetli periodontal hastalığın ise, özellikle

yaşlılar başta olmak üzere 267 milyon insanı etkilediği belirtilmektedir. Dudak ve ağız boşluğu kanserleri ise her yıl 500.000'den fazla vaka ve yaklaşık 180.000 ölümlle dünya çapında en yaygın 15 kanser olgusu arasında yer almaktadır. Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinin bazı kısımlarında, erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni arasında gösterilmektedir. Ağızda başlayan, etkilenen çocukların % 90'ı için ölümcül olan ve nekrotizan bir hastalık olarak tanımlanan Noma ise aşırı yoksulluğun bir göstergesi olarak nitelendirilmekte ve sıklıkla yaşam boyu sosyal dışlanma ile sonuçlanmaktadır (WHO 2020).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ağız hastalıklarının birçok ülkede tedavi edilmesi en pahalı olan dördüncü hastalık olduğunu bildirmektedir (Petersen 2003). 2015 yılında dünya çapında diş hastalıklarının tedavi maliyetinin 357 milyar ABD Doları olduğu, aynı yıl Avrupa Birliği genelinde ağız hastalıklarının tedavisine 90 milyar Euro harcandığı belirtilmektedir. Bu maliyet, bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında diyabet ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra üçüncü en yüksek harcama olarak dikkat çekmektedir (Peres vd. 2019). Ağız sağlığı, genellikle birinci basamak sağlık hizmetleri kapsamında bulunmadığından, bireyler ve toplum için önemli masraflara yol açmaktadır. Bu durum, özellikle dezavantajlı nüfusları olumsuz yönde etkilemektedir.

Dünya'da ağız ve diş hastalıklarının önemi yeterli düzeyde anlaşılabilmiştir. Malesef Türkiye'de de bu alandaki olumsuz veriler kaygı uyandırmaktadır. 2017 yılında ağız ve diş sağlığı haftası kapsamında Türk Dişhekimleri Birliği tarafından yapılan değerlendirmeler, gelişmiş ülkelerde dişhekimine başvuru sıklığının yıllık kişi başı 5 kez, ülkemizde ise 0.9 kez olduğunu, her 10 kişiden dokuzunun ağız problemi yaşadığını, her iki evden birinde diş fırçası bulunmadığını, 65 yaş üstü insanların yüzde 50'sinin dişlerinin tümünün eksik olduğunu belirtmektedir. Ülkemizde diş ve diş eti hastalıklarının çağdaş ülke seviyelerine getirilebilmesi amacıyla kişilere bireysel sorumluluklar düşmektedir. Diş fırçalama, diş ipi kullanma ve şeker alımını sınırlama gibi uygun ağız hijyeni alışkanlıkları ne kadar erken öğrenilirse, maliyetli diş prosedürlerinden ve uzun vadeli sağlık sorunlarından kaçınmak o kadar kolay olacaktır. Hastalıkları önlemek ve bunlara karşı farkındalık yaratmak ise bireyin doğduğu yer,

sosyo-ekonomik statüsü, aldığı eğitim, kendine olan saygısı ve kültürel durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

2.2 Diş Çürükleri

Oldukça fazla sayıda mikroorganizmaya ev sahipliği yapan ağız boşluğu, yaklaşık 700 ile 1.000 mikrobiyal tür içermektedir. Diş çürüğü başta olmak üzere periodontal hastalık ve ağız kanseri gibi olguların oluşumu ve gelişiminin ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmalar ile yakından ilişkili olduğu rapor edilmektedir. Diş çürükleri ise insanlarda en yaygın gözlemlenen mikroorganizma ilişkili ağız ve diş hastalıklarının başında gelmektedir (Karoly vd. 2019, Chen vd. 2020).

Diş çürükleri (Şekil 2.2), konak tarafından yiyeceklerden alınan karbohidratları fermente ederek asit üreten karyojenik bakterilerin pürüzsüz veya çatlak olan diş yüzeylerine yapışmaları, biyofilm oluşturmaları, ilk olarak diş minesinde ve ardından da dentinde demineralizasyona neden olmaları ile meydana gelen bir hastalık olarak karakterize edilmektedir (Tinanoff 2017). Çürük başlangıcının en erken belirtisi diş yüzeyinde meydana gelen beyaz nokta şeklindeki lezyonlardır. Eğer nokta lezyon oluşumu devam ederse asitler yüzey kısmın altına daha rahat yayılarak küçük oluklar oluşturmaktadır.



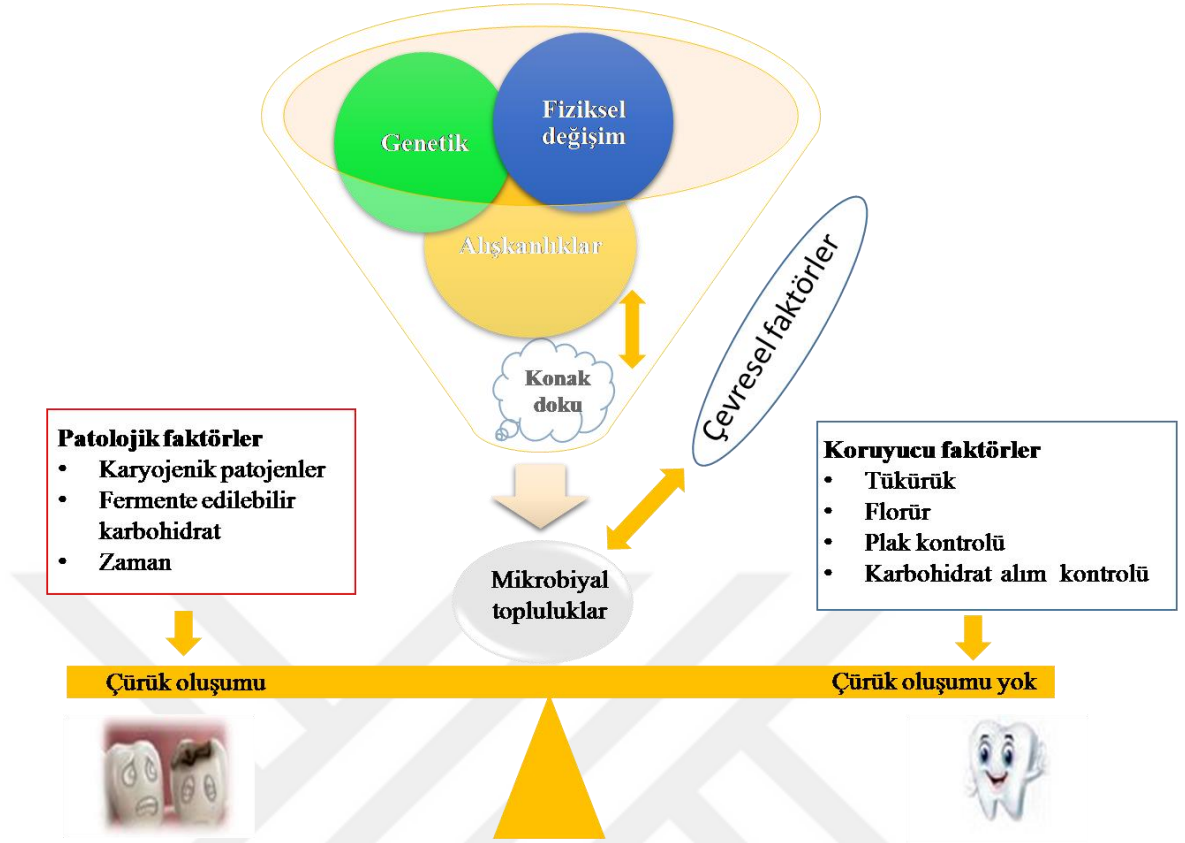
Şekil 2.2 Diş çürük lezyonları

(20 Nisan 2021 tarihinde <https://www.bakerstreetdental.com>'dan alınmıştır)

Deminerilizasyon kritik pH değeri olarak adlandırılan pH 5.5'in altında olduğunda gerçekleşmektedir (Marsh ve Martin 2009). Deminerilize edici koşullar devam ettiği takdirde remineralizasyon hızı deminerilizasyon hızına ayak uyduramamakta, mine zayıflamaya devam etmekte ve oluklar büyümektedir. Böylece altta kalan dentin tabakası ortaya çıkmakta ve bakteriler tarafından enfeksiyona açık hale gelmektedir. Deminerilizasyon ayrıca kalsiyum, fosfat ve florür gibi diş bileşenlerinin (hidroksiapatit) difüzyonuna da neden olmaktadır. Florür alımı, yıkımı tersine çevirerek kalsiyum ve florürün dişe geri difüzyonu için bir katalizör görevi görmekte ve sonuç olarak fluoroapatitten oluşan yapı bakteriyel saldırıya karşı orjinalinden daha dirençli bir hale gelmektedir (Sucharit 2020).

Diş çürüğü sonrası görülen komplikasyonlar sadece diş yüzeyine değil diş köküne de etki etmektedir. Elde edilen veriler, diş çürüklerinin % 79'unun diş kaybı ile sonuçlandığını göstermektedir (Righolt vd. 2018). Gelişmiş ülkelerde çürük prevalansının daha da arttığı gözlemlenirken, 2003 yılında yapılan bir araştırmada Birleşik Krallık'da yaşayan 5-15 yaş arası çocukların % 55-72'sinde çürüğe rastlandığı bildirilmektedir (Bagramian vd. 2009). Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında okul çağındaki çocuklarının % 60 ile % 90'ının ve yetişkinlerin yaklaşık % 100'ünün çürüklerden muzdarip olduğunu bildirmektedir (WHO 2020). Gelişme sürecinde birçok faktörün rol aldığı çürüğün, sadece ağızdaki rahatsızlıklarla sınırlı kalmadığını aynı zamanda endokardit gibi hastalıklara da neden olduğu da belirtilmektedir. Bu nedenle çürüklerin önlenmesi halk sağlığı yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Günümüzde diş çürüğünün asit üreten mikroorganizmalar ile fermente olabilen karbonhidratlar arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklandığı kabul edilmektedir (Pitts vd. 2017). Ağız mikrobiyotası diş çürüğü oluşumunu etkilemekle birlikte, dişler ve tükürük gibi birçok konakçı faktör de çürük gelişimini etkileyerek kronik ve yavaş ilerleyen bir sürece sebebiyet vermektedir (Şekil 2.3). Mine yüzeyine yapışan mikroorganizmaların oluşturduğu dental plak (biyofilm) ise, diş çürüklerinin etiolojisinde önemli bir bileşen olarak kabul edilmektedir (Chen vd. 2020).



Şekil 2.3 Diş çürüklerinin etiyolojisinde önemli kabul edilen faktörler (Chen vd. 2020)

2.3 Dental Plak (Biyofilm)

1890 yılında Miller “İnsan ağızında mikroplar” adlı kitabında, diş çürüğünün oluşumu için “kimyasal bakteri teorisi”ni ilk kez öne sürmüştü ve diş biyofilminin mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğunu savunmuştur. Günümüzde ise bakteriler, mayalar, virüsler, mikoplazmalar, protozoalar ve arkeler dahil olmak üzere oral mikroorganizmaların ağızda oral mikrobiyota olarak bilinen heterojen bir ekolojik sistem oluşturdukları bilinmektedir (Lu vd. 2019). Ağız boşluğu, ağız mikrobiyota üyeleri için uygun bir ortam sunmaktadır. Ağız mikrobiyotasında yer alan kommensal bakteriler ise istilacı patojenik mikroorganizmaların gelişimini önlemek amacıyla bakteri kolonizasyonunu kontrol etmektedir. Dolayısıyla ağız mikrobiyotası, ağız ve diş sağlığının korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Razi vd. 2020). Ancak istenmeyen koşullar altında istilacı mikroorganizmalar konağın ortak mikrobiyal topluluğunda bir dengesizliğe (disbiyozis) neden olmakta, bu durum ise ağız ve diş hastalıklarının başlangıcına neden olmaktadır.

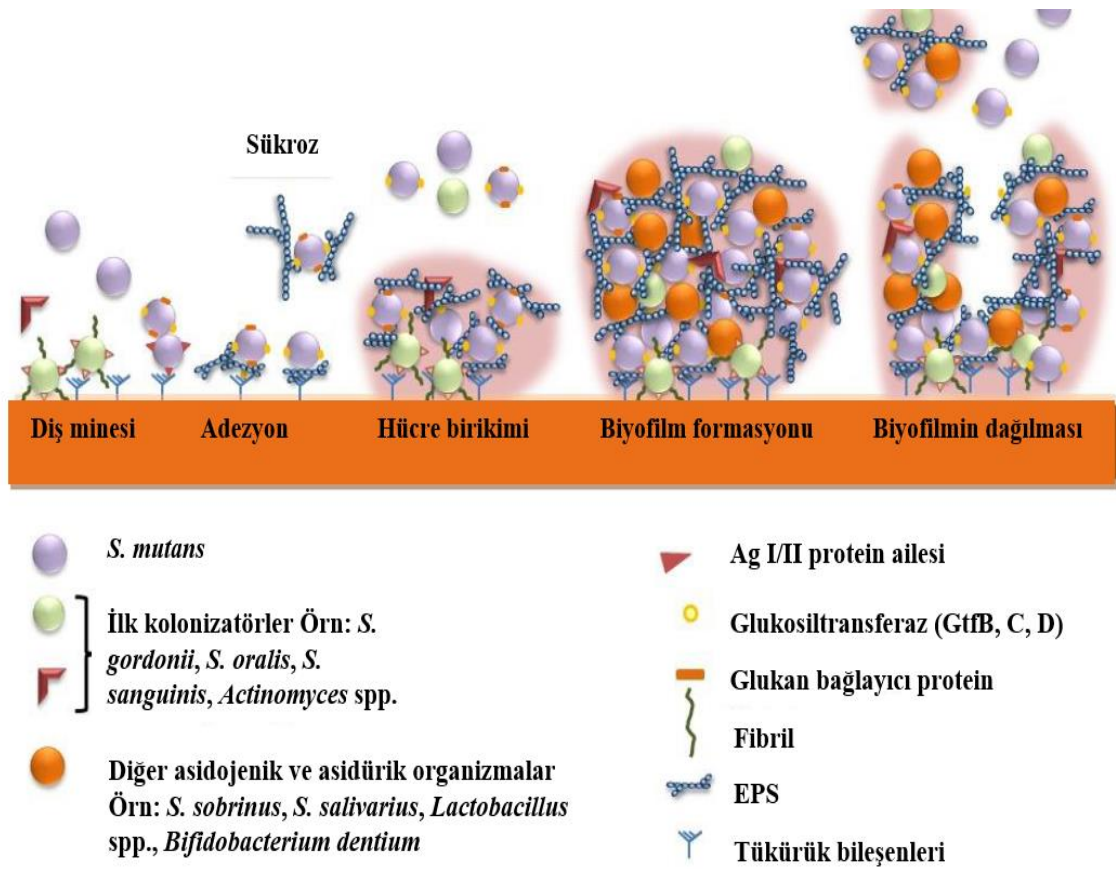
Dental anlamda “plak” kelimesi ilk olarak Black (1884) tarafından çürük lezyonlarını üzerindeki toplu mikroorganizmaları ifade etmek amacıyla kullanılmıştır. Diş yüzeyindeki oral mikrobiyota, dental plak olarak bilinen polimikrobiyal topluluklar (biyofilm) oluşturma eğilimindedir (Marsh vd. 2017). Ekstraselüler polimerik matriksin (EPS) karyojenik mikroorganizmalar için patolojik bir yaşam alanı sağladığı bilinmektedir. Çok sayıda kanıt, diş çürüğünün bulaşıcı bir hastalıktan ziyade esasen biyofilm kaynaklı bir hastalık olduğunu ve hastalık sürecinin diş yüzeyini kaplayan biyofilme başladığını göstermektedir (Sim vd. 2016). Çürük biyofilmi (çürüğe neden olabilecek biyofilm), EPS açısından zengin, son derece aktif ve karmaşık bir ekosistem olarak tanımlanmaktadır. Dental plağın ağırlıklı olarak Streptokoklar (% 67-78) ile Actinomyces’lerden (% 4-30) oluştuğu bildirilmektedir (Nyvad ve Fejerskov 1987). Dental plağın kuru ağırlığı % 10-20 glukan ve % 1-2 fruktan içermektedir. Plak aynı zamanda % 40 oranında tükürük ve mikroorganizmalardan üretilmiş proteinler başta olmak üzere farklı oranlarda lipit, Mg, Ca, P, F (Leme vd. 2006, Pessan vd. 2008) ve yaklaşık olarak % 80 oranında su ihtiva etmektedir (Wilson ve Ashley 1990).

Biyofilmler, diş çürükleri dışında klinik hastalıkların çoğunda da önemli bir rol oynamaktadır. Ulusal Sağlık Enstitüleri’nin bir araştırmasına göre mikrobiyal enfeksiyonların % 65’inin kronik hastalıkların ise % 80’inin ortaya çıkmasında önemli bir etken olan biyofilmler (Barzegari vd. 2020), rutin testler ile nerdeyse hiç tespit edilememektedir (Sharahi vd. 2019). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Gardnerella vaginalis* klinikte en sık rastlanılan ve biyofilm oluşturmada etken bakteriler arasında yer almaktadır (Mathur vd. 2018).

2.3.1 Dental plak (biyofilm) oluşum aşamaları

Mikroorganizmaların hedef bir yüzeye yapışmalarını takiben, bütünlük oluşturmak adına bir arada yaşadıkları ve yaşamlarının devamı için birbirlerine özel sinyaller gönderdikleri karmaşık yapı biyofilm olarak adlandırılmaktadır. Diş yüzeylerinde gerçekleşen dental plak (biyofilm) oluşum süreci ise bakterilerin uygun yüzeye

yapışması, çoğalması, yapıştığı yüzeyden kopması ve tekrar yapışması aşamalarından oluşan dinamik bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Marsh ve Bradshaw 1995) (Şekil 2.4). Ağız ortamı, hem tükürük içermesi hem de diş gibi yüzeyler barındırması nedeniyle plak oluşumu için neredeyse ideal bir ortam olmaktadır. Plak oluşumunun ilk aşamasında önemli bir rol oynayan tükürük, iyon içeriğinden dolayı tamponlama ve mine rejenerasyonu gibi etkiler gösterirken, organik içeriğinden dolayı da mikroorganizmaların diş yüzeylerine tutunmasına imkan veren biyofilm oluşmasına ve endojen besin maddesi teminine katkı sağlamaktadır (Guggenheim vd. 2001).



Şekil 2.4 Dental plak (biyofilm) oluşum aşamaları (Sucharit 2020)

Dental plak oluşum aşamalarının detayları ise aşağıda özetlenmektedir (Şekil 2.5).

a) Edinilmiş diş peliklnn oluşumu: Bu pelikül, tükürük ve çeşitli mikrobiyal moleküllerin dişe bağlanması ile meydana gelmektedir. Pelikl; msin ve statherin gibi bakteriyel adezinler için reseptör oluşurmaktadır.

b) Bakterilerin diş yüzeyine pasif olarak taşınması.

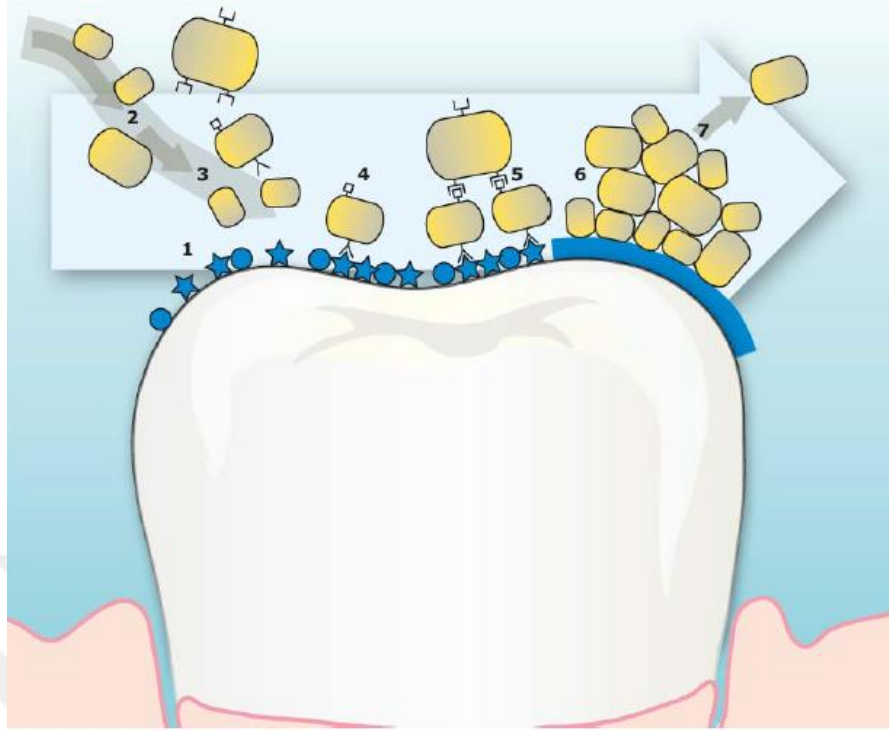
c) Bakterilerin geri döndürülemez bir Şekilde diş yüzeyine yapışması: Bu tür etkileşimler karbohidrat reseptörlerinin bakteriyel polipeptit adezinlerine bağlanması sonucu oluşmaktadır.

d) Kolonizasyon: İlk kolonizatrler (*Streptococcus* sp. ve *Actinomyces* sp.) ile ikincil kolonizatrlerin (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* spp., *Tannerella forsythia*, *Selenomonas flueggei*, ve *Treponema denticola*) arasında adezin-reseptör etkileşimi meydana gelmektedir. Böylece biyofilmdeki bakteri çeşitliliği artmaktadır.

e) Kolonize olmuş bakterilerin çoğalması: Bakteriler bölünmelerinin ardından bir arada yaşayabilmeleri için mikroortamlar yaratıp, EPS'yi de sentezleyerek hücre dışı matrisinin meydana gelmesine ve olgun dental plağın oluşmasına neden olmaktadır.

f) Aktif ayrılma: Biyofilm içindeki bakteriler, adezinleri parçalayan enzimleri sentezleyerek biyofilmden ayrılmakta ve ağız içerisindeki başka bir yerde kolonileşmektedir.

Dental plak (biyofilm), bakteriler için rezervuar görevi görmekte, zararlı maddelerin penetrasyonunu engellemekte ve çevreden besinlerin alınmasına yardımcı olmaktadır (Fanning vd. 2012). Olgun bir biyofilm, bakteriler için gerekli besinleri sağlayan su kanalları ile gözenekli bir yapıya sahiptir (Huang vd. 2011). Özellikle karyojenik biyofilmlerde patojenler tarafından üretilen EPS, diş plağının virülansının belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır.



Şekil 2.5 Pelikül oluşumu, yapışma ve kolonizasyona şematik bir genel bakış

1. Pelikül oluşumu, 2. Bakterilerin pasif olarak diş yüzeyine taşınması, 3. Bakterilerin zayıf elektrostatik çekim kuvvetleri tarafından tersine çevrilebilir şekilde tutunması, 4. Bağlanmanın peliküldeki bakteri ve reseptörler üzerindeki adezinlerin aracılık ettiği geri dönüşümsüz hale gelmesi, 5. İkincil kolonileştiricilerin birincil kolonileştiricilere bağlanması (birlikte yapışma), 6. Bakterilerin büyümesi ve biyofilm olgunlaşması, 7. Ayrılma (Marsh vd. 2009)

2.3.2 Dental plak (biyofilm) oluşum nedenleri

Çok kompleks bir yapı olan dental plağın oluşmasına neden olan bir çok temel faktör bulunmaktadır. Önemli faktörlerin başında ise insanların ağız bakımı ve alışkanlığı hakkında bilgilerinin ve bunun üzerine verilen eğitimin yetersiz oluşu gelmektedir. Bu sebebin ortadan kaldırılabilmesi için ebeveynler başta olmak üzere yetişkinler ve çocuklara; şeker tüketimini azaltmanın önemini, florürlü diş macunlarının günde iki kez kullanılması gerektiğini ve düzenli aralıklarla diş hekimine gitmenin gerekliliğini anlatan konuları baz alan eğitimler verilmelidir. Diş fırçalamanın plak oluşumu üzerinde büyük etkileri dikkate alındığında, çocuklara çok küçük yaştan itibaren günde en az iki kez dişlerini fırçalamaları gerektiği fikri aşılmalıdır. Gerçekleştirilen bir çalışmada; yeterince dişini fırçalamayan okul öncesi çocukların, dişlerini fırçalayan çocuklara

kıyasla ileriki yaşlarda daha fazla çürük lezyonuna sahip olabileceği gözlemlenmiştir (Thibodeau ve O'Sullivan 1996).

Maternal etkiler, diyet ve sosyo-ekonomik statü ise dental plağın oluşmasına neden olan diğer önemli faktörler arasında yer almaktadır. Kolay erişilebildiğinden dolayı günlük diyetimizde sü kroza bolca yer verilmektedir. Oysa sü kroz asiditeyi arttırıp dişte deminerilizasyona neden olmaktadır. Ayrıca gelirin temsil ettiği sosyo-ekonomik statünün de çürük prevalansı ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre geliri düşük ailelerin çocuklarının, geliri düşük olmayan ailelerinin çocuklarına göre dişlerinde plak ve çürük görülme olasılığının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Vargas vd. 1998).

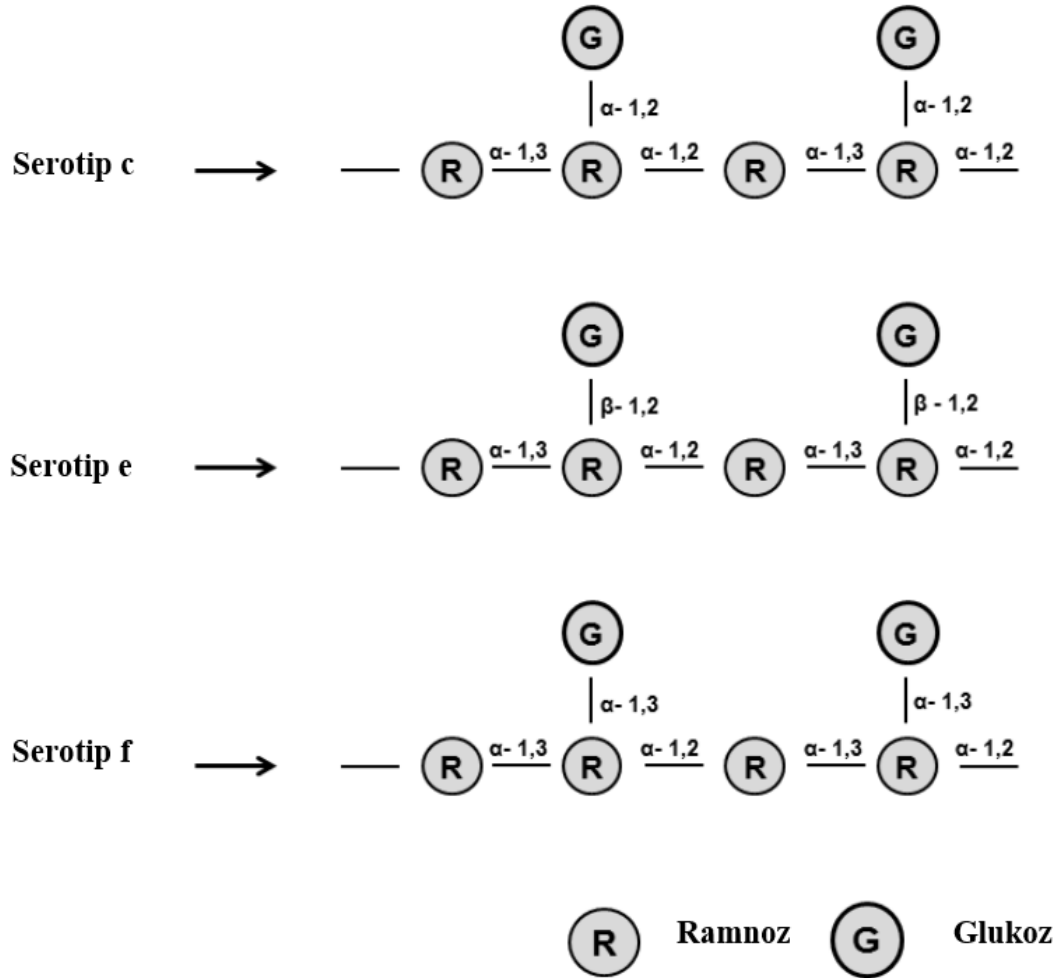
Streptococcus mutans bakterisi başta olmak üzere birçok karyojenik patojen ise; (i) asit üretimleri, (ii) çok çeşitli karbonhidratları organik asitlere metabolize etmelerinin yanı sıra düşük pH koşullarına olan asit dirençleri ve (iii) zorlu ortamlarda hayatta kalmaları için koruma sağlayan EPS'yi sentezleme yetenekleri ile dental plak (biyofilm) oluşumunda önemli birer etiyolojik ajan olarak kabul edilmektedirler (Abranches vd. 2018, Palmer vd. 2019, Alshahrani vd. 2020).

2.4 *Streptococcus mutans*

2.4.1 Genel özellikleri

İlk olarak Clarke (1924), çürük lezyonlarından izole ettiği organizmayı *S. mutans* olarak adlandırmıştır. Sonrasında bilim dünyasında büyük ilgi gören *S. mutans*'ın 1960'ların ortalarında diş çürüklerinde önemli bir etiyolojik ajan olduğu kanaatine varılmıştır (Loesche 1986). Gram pozitif, küresel veya oval şekilli, 0.5-2 µm çapında, fakültatif anaerob, α veya β hemolitik olan bakteri, hücre yüzeyindeki ramnoz-glukoz polisakkaritlerinin şekillerine göre c, e, f (Şekil 2.6) ve k olmak üzere dört farklı serolojik grupta incelenmiştir (Nakano ve Ooshima 2009). Dental plaklardan izole edilen suşların yaklaşık % 75'inin serotip c olduğu saptanırken % 20'sinin ise serotip e

olduğu saptanmıştır (Nakano ve Ooshima 2009). Dişlerin en çok oklüzal bölgelerinde bulunan *S. mutans* glukoz ve fruktozdan oluşan sükrozu çok hızlı katabolize ederek asit üretmekte ve daha karyojenik sonuçlara neden olmaktadır. Dolayısıyla, sükroz fermentasyonu sonucunda diş plağında hücre içi ve hücre dışı polisakkaritlerin sentezi için bir substrat görevi gördüğünden en karyojenik diyet karbohidratı olarak kabul edilmektedir (Bowen 2002). Hedef yüzeylere yapışması, asit üretimi (asidojenik) ve buna bağlı olarak düşen pH koşullarında yaşayabilmesi (asidürik) *S. mutans*'ın çürük lezyonları bulunmasını ve çürük insidansı ile ilişkisini kanıtlamaktadır (Russell 2009).



Şekil 2.6 *Streptococcus mutans*'ın serotiplerine göre polisakkarit yapısı (Nakano vd. 2008, Shibata vd. 2009)

2.4.2 Biyofilm formasyonu

İnsanlarda diş çürüğünün en büyük nedeni olan *S. mutans*, sükröz varlığında ürettiği üç çeşit glukosiltransferaz (*GtfB*, C ve D) ile diş yüzeyine yapışabilmesi için tutkal görevi gören glukani sentezleyerek karyojenik biyofilm oluşumuna katılmaktadır (Bowen ve Koo 2011). Bunlardan *GtfB*, α (1-3) bağları bakımından zengin olan ve suda çözünmeyen glukani sentezlerken, kümelenmeyi teşvik etmektedir. *GtfC* ise, α (1-6) bağları bakımından zengin olan ve hem suda çözünen hem de çözünmeyen glukani karışımını sentezleyerek pelikül içinden mineye absorbe edilmektedir. *GtfD* de çözünen glukani sentezlemekte ve *GtfB* için primer görevi görmektedir (Lemos vd. 2019). Özellikle *GtfB*'nin sentezlediği glukani biyofilm matriksinin önemli bileşeni olarak kabul edilmektedir. *Gtf*'ler glukani polimer oluşumunu katalize etmenin yanısıra var olan glukana da bağlanmaktadır. Bunu da yüzeye bağlı glukani bağlayıcı protein (*Gbp*) olarak bilinen *GbpA*, B, C ve D aracılığıyla gerçekleştirerek hücre kümelenmesine ve birikimine neden olmaktadır. *GbpD* ise biyofilm oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. *Gtf*'ler ve *Gbp*'ler birlikte görev alarak bakteriler için koruyucu bir matriks oluşturmakta ve *S. mutans*'ın sükrözü katabolize etmesine bağlı olarak karyojenitesini arttırmaktadırlar (Lemos vd. 2019). Sükröz yokluğunda ise P1, SpaP veya PAC olarak da bilinen Antijen I/II kolonizasyonuna imkan veren yüzey adezini olarak görev yapmaktadır. Bu adezin ailesi fibronektin ve kollajen gibi konak proteinleriyle etkileşime girmektedir (Brady vd. 2010). Sıçan dişleri ile yapılan bir araştırmada, P1 eksikliği olan mutant suşların yabancı suşlara göre diş yüzeylerine daha az yapışma ve daha düşük karyojenite sergiledikleri bildirilmektedir (Ahn vd. 2008).

2.4.3 Stres toleransı

Konakçı tarafından fermente edilebilir karbohidratların tüketilmesi asidik son ürünlerin üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. *S. mutans* oluşan bu düşük pH'da yaşamını sürdürebilmek için sitoplazmasının tamponlanmasına neden olan ve plazma zarı yağ asidi bileşenlerindeki değişikliklere katkıda bulunan yolların indüksiyonunu sağlayan bir adaptasyon mekanizması olan asit tolerans yanıtını (ATR) kullanmakta ve bu yanıtın

sonucunda asit hasarı ve stresi sırasında hayatta kalabilmektedir (Matsui ve Cvitkovitch 2010, Baker vd. 2017). Sitoplazmanın tamponlanması işlemi, hücre zarı boyunca proton translokasyonu yapan bir ATPaz (F₁-F₀ ATPaz) tarafından gerçekleştirilmektedir (Sucharit 2020). Protonların hücre dışına translokasyonu düşük bir hücre dışı pH'ya neden olurken neredeyse nötrlüğe yakın bir hücre içi pH ile sonuçlanmaktadır. ATR ise iç ortamı, dış ortamdaki yaklaşık olarak 0.5-1 pH birimi kadar daha alkali tutmada yardımcı olmaktadır (Bender vd. 1986). ATR, *S. mutans*'ın diğer oral bakteriler arasında baskın bir bakteri olmasına neden olmaktadır. Çözünmeyen glukanların da hücre dışındaki protonları yakalayıp konsantre ettiği, düşük bir yüzey pH'sına neden olduğu ve ATR'yi indüklediği tespit edilmiştir (Guo vd. 2015). Son olarak ATR asidik bir ortama uyum sağlamak için plazma zarı yağ asidi bileşenlerinde değişiklik yapmak adına, pH 7'de zarda yaklaşık % 60 oranında doymuş yağ asidi ve % 40 oranında doymamış yağ asidi bulunurken pH 5 değerine düştüğünde ise % 40 oranında doymuş % 60 oranında da doymamış yağ asidi bulunmasına neden olmaktadır (Fozo vd. 2004, Fozo ve Quivey 2004).

Oral Streptokokların tam bir elektron taşıma zincirine sahip olmadığı ve oksidatif fosforilasyon gerçekleştiremediği bilinse de NADH⁺ oksidaz enzimleri ile oksijeni metabolize edebildiği bilinmektedir (Marquis 1995). Gerçekleştirilen araştırmalar, oksijenin artmasıyla sonuçlanan oksidatif stresi tolere edebilmek adına *S. mutans*'da trikarboksilik asit döngüsünü (TCA) kodlayan genler ile su ve peroksit oluşturan NADH⁺ oksidazların ifadesinin yukarı regüle edildiği belirtilmektedir (Ahn vd. 2007). Oksidatif strese diğer bir yanıt ise plazma zarındaki doymamış yağ asitlerinin artması ve sonrasında da 18 ile 20 karbonlu zincirlere geçiş yapılmasıdır (Derr vd. 2012). Ayrıca Dpr olarak adlandırılan ve ferritin benzeri demir bağlayıcı proteinin de oksidatif tolerans sağladığı belirtilmektedir (Conrads vd. 2014)

2.4.4 Yetersayı algılama (QS; Quorum Sensing) mekanizması

Yetersayı algılama, bakterilerin otoindüktör olarak adlandırılan hormona benzer küçük molekülleri sentezleyerek, salgılayarak ve tespit ederek birbirleriyle iletişime geçtiği,

bunları da hücre yoğunluğuna göre gerçekleştirdiği bir iletişim sürecidir (Waters ve Bassler 2005). QS, karyojenik biyofilmlerde virülans için önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşumu ise sinyal aracılı QS sistemine dayanmaktadır (Chen vd. 2020).

Streptococcus mutans ve diğer oral bakteriler, türler arası iletişim için en çok kullanılan otoindükleyici-2 (AI-2) sentezine etki eden luxS genine sahiptir (Kolenbrander vd. 2002, Camilli ve Bassler 2006) Çeşitli virülans faktörlerinin yetersayı algılama mekanizması ise yeterlilik uyarıcı peptid (CSP) ve iki bileşenli bir sinyal iletim sistemi (TCSTS) tarafından düzenlenmektedir. TCSTS zara bağlı olan ve belirli bir dürtüyü algılayan bir histidin kinaz (HK) sensör proteininden ve gen ifadesinin düzenlenmesi yoluyla çeşitli stres ve değişikliklere yanıt verilmesini sağlayan sitoplazmik yanıt düzenleyici (RR) proteinden oluşmaktadır (Li vd. 2008). Buna bağlı olarak *ComAB* ve *ComCDE* genleri, fizyolojik aktiviteleri ve virülans ile ilişkili özellikleri düzenlemektedir. Bunlardan *ComC* geni CSP öncüsünü kodlarken, *ComD* HK sensör proteinini, *ComE* ise bir RR proteini kodlamaktadır (Li vd. 2001). *ComD* geninin aktivasyonu, otofosforilasyon ve ardından da bu fosforil grubunun *ComE* proteinine aktarılmasıyla biyofilm oluşumunu, asit ve oksidatif stres toleransını düzenleyecek hedef genleri aktive etmektedir (Li vd. 2002, Shanker ve Federle 2017).

2.5 Dental Plak (Biyofilm) Giderimi İçin Kullanılan Yaklaşımlar

Biyofilmler ile mücadele amacıyla; biyofilm oluşturan hücrelerin inhibe edilmesi, bakterilerin yüzeye yapışmalarının, biyofilmin farklılaşmasının ve gelişmesinin engellenmesi ve biyofilm disorpsiyonun uyarılması gibi stratejiler önerilmektedir (Yang vd. 2012, Scharnow vd. 2019). Diş yüzeylerinin patojenik mikroorganizmalardan arındırılması ve dental plak oluşumunun inhibisyonu neticesinde mevcut plağın giderilmesi ağız hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi için umut vaat etmektedir. Ağız hastalıklarını önlemek üzere günlük rutinize eklenmesi gereken ve kişisel hijyen için oldukça önemli olan diş fırçalama, ağız ipi ve gargarası gibi mekanik yöntemler sıklıkla

kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Bu ürünler içerisinde yer alan antimikrobiyal kimyasal ajanlar ise çeşitlilik sergilemektedir.

a) Florür: Doğada bulunan ve kimyasal olarak da sentezlenebilen bir ajandır. Ayrıca deniz sularında, içme sularında ve gıdalarda da düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Florürün antikaryojenik etkisi birçok çalışmada kanıtlanmış olduğundan, ağız gargaraları ve diş macunlarına eklenmektedir.

b) Kloroheksidin: Yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında bakterisidal, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında ise bakteriyostatik bir etkiye sahip olan kloroheksidin, ağız ürünlerinde antiseptik bir ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kloroheksidin; bakterinin lipopolisakkarit tabakasında ve sitoplazmik membranında hasara neden olmakta ve sonucunda hücre bileşenlerinin sızmasına sebebiyet vererek antibakteriyel etki sergilemektedir (Siqueira vd. 2007). Ayrıca diş yüzeyinde pelikül oluşumuna engel olarak bakterilerin tutunmasını ve dolayısıyla da plak oluşumunu azalttığı belirtilmektedir.

c) Triklosan: Geniş bir antimikrobiyal aktivite yelpazesine sahip olan bu kimyasal ajan birçok diş macununun içerisinde bulunmaktadır. Yüksek dozda bakterisidal etkiye sahip olan triklosan bakterilerin hücre duvar fonksiyonunu bozmaktadır (Tabak vd. 2007).

d) Kalsiyum Fosfat: Bakteriler tarafından asit üretimini ve bakterilerin metabolik aktivitesini inhibe ederek, hem planktonik hem de biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların canlılığını azaltmaktadır (Cheng vd. 2012).

e) Setilpridinyum Klorür: Biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olan Gtf enzimlerini inhibe ederek biyofilm oluşumunu engellemektedir. Diş macunları ve ağız gargaralarının içerisinde eklenmektedir (Krzyściak vd. 2014).

f) Gümüş Partikülleri: Geniş bir bakteri, virüs ve mantar çeşidine karşı öldürücü aktiviteye sahip olduğu bilinen gümüş, hücre zarını parçalamakta ve hücre içi

organelleri tahrip etmektedir. Düşük direnci ve antimikrobiyal aktivitesinden dolayı oral mikroorganizmalarla mücadelede önemli bir kimyasal ajandır (Cheng vd. 2013).

Yukarıda belirtilen ve kimyasal içeriğe sahip olan antimikrobiyal ajanların konsantrasyonu ve maruziyet süreleri oldukça önemlidir. Özellikle yüksek dozda alındıkları takdirde önemli yan etkiler oluşturabilmektedirler. Örneğin, oral mikrobiyotayı olumsuz yönde etkileyerek disbiyozise neden olabilmekte, kusma, ishal, mukozal deskuamasyon ve dişte lekelenme gibi olumsuz sonuçlara sebebiyet verebilmektedirler (Sakaue vd. 2018, Cao vd. 2019). Bununla birlikte, sinirsel toksisite başta olmak üzere sitotoksik etkilere neden olabilmekte ve *S. mutans* başta olmak üzere karyojenik bakteriler de dirence yol açabilmektedirler. Ayrıca biyofilme sınırlı penetrasyon yetenekleri de etkinliklerini kısıtlayabilmektedir (Liao vd. 2014, Hirzy vd. 2018). Bu nedenle, diş çürüklerini önleyici tedbirler olarak alternatif doğal antimikrobiyal içeriklerin kullanılması diş bakımı için umut vaat etmektedir.

2.6 Diş Çürüklerinin Önlenmesine Yönelik Kullanılan Doğal Antimikrobiyal Bileşiklerdeki Son Gelişmeler

Son yıllarda kimyasal antibakteriyel ajanlara alternatif olarak kullanılan doğal içerikler arasında doğal bitkisel ekstraktlar, esansiyel yağlar, hücre-hücre sinyal inhibitörleri, enzim bazlı teknolojiler ve oral probiyotik organizmalar yer almaktadır. Propolis, siyah çay, kakao çekirdeği kabuğu, yaban mersini, kurkumin ve kıızılcık diş plağını gidermek için kullanılan doğal ürünlerden bazılarıdır (Jeon vd. 2011). Klinik deneyler, aralarında katekol, emetin, kinin ve flavonun da rapor edildiği çeşitli doğal bileşiklerin diş çürükleri tedavisinde etkinliğini kanıtlamıştır (Chauhan vd. 2020). Karanfil tomurcuklarından elde edilen uçucu yağların bir bileşeni olan eugenol ise, Ag I/II ifadesinin azaltarak *S. mutans*'ın diş yüzeyine yapışmasını engellemiş ve biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Adil vd. 2014). *Camellia japonica* ve *Thuja orientalis* metanol ekstraktlarının ise oral patojenlere karşı potansiyel anti-QS yeteneklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Choi vd. 2017). Polifenol bakımından zengin kıızılcık özlerinin de biyofilmlerin asidojenitesini ve metabolik aktivitesini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Philip vd. 2019).

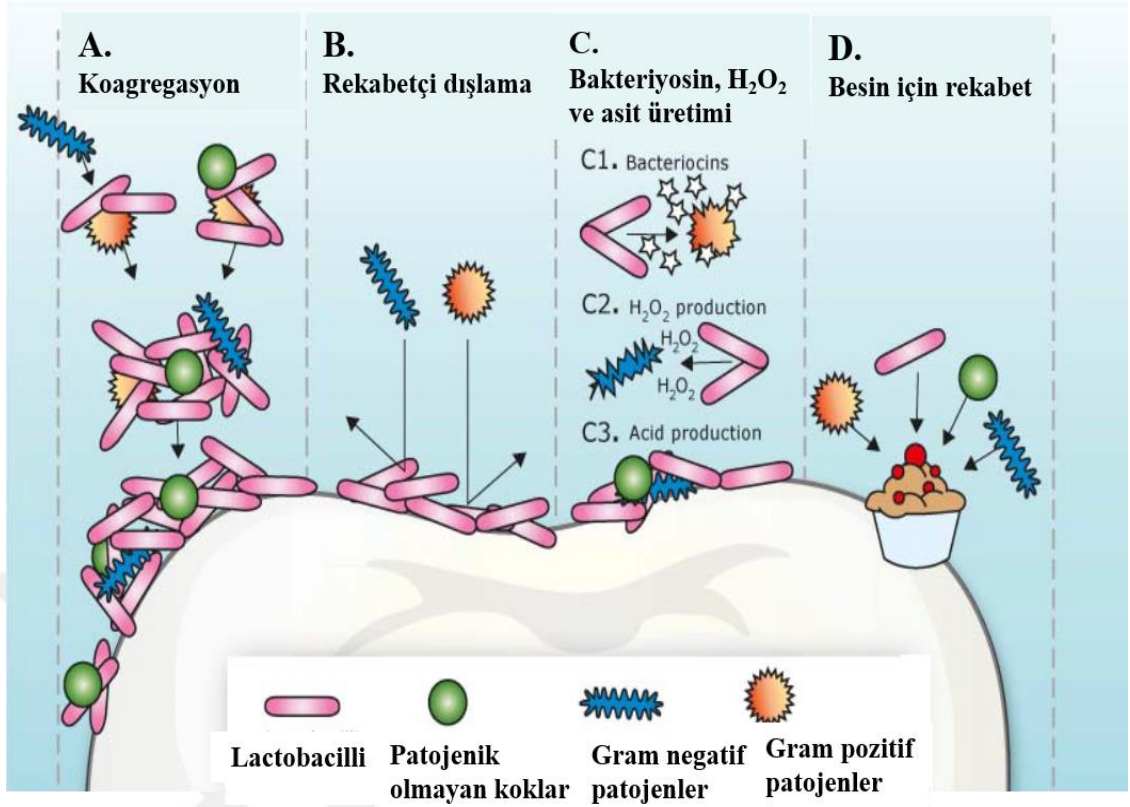
Etkili ve ekonomik tedavi amacıyla kullanılmak üzere bitkilerden izole edilen fitokimyasallara yönelik çalışmalar hız kazansa da, dönemsel ve bölgesel farklılık sergileyen karmaşık içeriklere sahip olmaları, birçok bitki ürününün insan hücreleri üzerinde toksisite sergilemeleri, güvenli kullanımları için sitotoksisite testlerinin ve doz kontrollerinin geliştirilmesi gerektiğine dikkat çekmektedir.

2.6.1 Mikrobiyal karyojenik biyofilm inhibitörleri: Probiyotikler

Nobel Ödülü sahibi Élie Metchnikoff (1845–1916) probiyotik kavramını bilim dünyasına ilk sunan kişi olmuş ve fermente süt ürünlerinin faydalı etkilerini bağırsaktaki mikrobiyal dengede meydana getirdikleri değişikliklere bağlamıştır. “Probiyotik” terimi ise ilk kez, Lilly ve Stillwell tarafından 1965’te antibiyotik yerine kullanılmıştır (Lilly ve Stillwell 1965). Günümüzde “Probiyotik”ler farklı yollarla vücuda alınan ve sağlık üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalara verilen genel bir isim olarak tanımlanmaktadır (Shah 2004). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğu bakteri türleri olmakla birlikte, çeşitli maya türleri de probiyotik olarak kullanılmaktadır. *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. ve *Saccharomyces* spp. en çok kullanılan probiyotikler arasında yer almaktadır. Probiyotik olarak kullanımı amaçlanan mikroorganizmalar; insan kaynaklı olma ve patojenik olmama, toksik özellikler sergilememe ve kolay kültüre edilebilme gibi temel gereksinimlerini karşılamalıdır. Probiyotiklerin konak üzerindeki etkileri ise hedefe yönelik olarak değişkenlik sergilemektedir. Örneğin, bağırsak sağlığını iyileştirmek amacıyla kullanımı hedeflenen probiyotik suşlar taranırken; asit direnci, konak epitel hücrelerine yapışma ve patojenik mikroorganizmaların *in vitro* antagonizmi arzu edilen temel özellikler arasında ilk sıralarda yer almalıdır (Dunne vd. 2001). Farklı probiyotik bakterilerin biyolojik aktiviteleri, aynı tür içindeki farklı suşlarda bile farklılık göstermektedir (Haukioja vd. 2006).

Probiyotiklerin sağlık üzerinde birçok yararlı etkileri bulunmaktadır (Zolkiewicz vd. 2020). Özellikle konağı patojenlerden korumada yerleşik mikrobiyotanın öneminin anlaşılması, probiyotik tedavisine olan ilginin artmasına neden olmuştur. Son 15 yılda;

ağız mikrobiyotası, biyofilm ilişkili hastalıkların başında gelen diş çürükleri (Meurman 2005), periodontal hastalıklar ve ağız kokusu (Gupta 2011, Keller vd. 2012) üzerinde probiyotiklerin etkinliğine olan ilgi hızla artmaktadır. Probiyotik ürünlerin çoğu ağızdan tüketildiği için, tüketilen probiyotik bakterilerin ağız yüzeylerine de yapışması mümkün olmaktadır (Haukioja vd. 2006). Bununla birlikte, ağız doğal mikrobiyotasında bulunan bakteriler de karyojenik türlerin büyümesini engelleyerek ve ağız ortamının pH'sını değiştirerek de probiyotik etkiler sergileyebilmektedir (Giacaman 2018). Probiyotik bakterilerin hem sistemik hem de lokal mekanizmalar yoluyla olumlu etkilere aracılık ettiği düşünülmektedir. Bu mekanizmalar, i) diğer bakterilerle etkileşim; patojenleri dışlama veya inhibe etme yeteneği, ii) hem lokal hem de sistemik etkilerle sonuçlanan konakçı bağışıklık tepkilerini modüle etme ve iii) epitel bariyerinin işlevini etkileme/geliştirme olarak özetlenmektedir (Servin 2004). Lokal etki, probiyotik suşların biyofilmdeki diğer bakterilerle etkileşime girdiklerinde ve hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve organik asitler üreterek patojenlerin büyümesini engellediklerinde sergiledikleri etki olarak tanımlanmaktadır. Organik asitler, aside toleranslı bakterilerin büyümesini destekleyen pH'yı düşürürken, bakteriyosinlerin üretimi diğer patojenik türlerin büyümesini engelleyebilmektedir. Probiyotik suşların, diş yüzeyi ve ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmalar üzerinde önerilen lokal etki mekanizmaları Şekil 2.7'de gösterilmektedir (Reid vd. 2011). Sistemik etkilerin ise immünolojik yollar aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Her probiyotik suş, belirli bakteri ile etkileşime giren lenfositler veya dendritik hücreler tarafından salgılanan benzersiz bir sitokin profili ile ilişkilidir (Minocha 2009). Mukozada artan IgA üretimi sonucunda uyarılmış makrofaj aktivitesi ve fagositoz gibi immünolojik etkiler gözlemlenmektedir. Bu durum mukozada bakteriyel translokasyonu önleyebilmek adına önemli bir direnç nedeni olmaktadır. Ancak farklı suşlar farklı etkiler gösterdiğinden, bir probiyotik bakterinin etkilerinin genelleştirilmemesi gerektiğine dikkat etmek gerekmektedir (Ezendam ve van Loveren 2006, Minocha 2009).



Şekil 2.7 Probiyotik Laktobasillerin mikroorganizmalar üzerinde önerilen lokal etki mekanizmaları (Reid vd. 2011)

Ağız ve diş sağlığı açısından en çok kullanılan probiyotikler arasında *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *Bifidobacterium lactis* gelmektedir. Bunların karyojenik patojen sayısını azaltma, biyofilm oluşumunu engelleme veya plak pH'sını kontrol etme kapasiteleri kanıtlanmıştır (Zaura ve Twetman 2019). Son yıllarda, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* ve *B. lactis* tablet, pastil ve sakız gibi diş bakım ürünlerine dahil edilmiş ve klinik deneylerde incelenmiştir (Chen vd. 2020). Çürük önleyici etki mekanizmalarının başında temel ihtiyaçlar arasında yer alan besin için rekabet gelmektedir (Piwat vd. 2019). Bununla birlikte bakteriyosin, organik asit ve hidrojen peroksit gibi antibakteriyel faktörlerin üretimi, karyojenik patojenlerin gelişimini engellemektedir (Ramanujam vd. 2019). Nisin, pediosin ve reuterin gibi bakteriyosinler, çeşitli probiyotik suşlar tarafından üretilen ve oral patojenlere karşı etkili olduğu bilinen biyoaktif bileşikler olarak rapor edilmektedir (Villalobos-Delgado vd. 2019). Diş çürüğünün önlenmesinde probiyotiklerin olumlu sonuçlara ulaşmasıyla ilgili son bulgular ise Çizelge 2.1'de listelenmektedir.

Çizelge 2.1 Biyofilm modeli kullanılarak incelenen probiyotikler ve karyojenik mikroorganizmalara karşı biyoaktiviteleri

Probiyotikler	Hedef Bakteriler	Biyofilm Modelinin Türü	Biyoaktif Bileşik/ Etki Mekanizması	Kaynak
<i>L. rhamnosus</i> SD11	<i>S. mutans</i> Lactobacilli	İnsan ağız boşluğu	Dental plaktaki bakteri topluluklarına entegrasyonu	Piwat vd. 2019
<i>L. salivarius</i>	<i>S. mutans</i> <i>Candida albicans</i>	İkili biyofilmler	Oral patojenlerin güçlü rakibi	Krzysciak vd. 2017
<i>Streptococcus salivarius</i> M18	<i>S. mutans</i>	Plak belirleyici solüsyonu	Bakterinler	Burton vd. 2013
<i>L. casei</i> ATCC 393 <i>L. reuteri</i> ATCC 23272 <i>L. plantarum</i> ATCC 14917 <i>L. salivarius</i> ATCC 11741	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	İkili biyofilmler, <i>S. mutans</i> - lactobacillus spp. biyofilmleri	Organik asit, hidrojen peroksit üretimi	Wasfi vd. 2018
<i>L. casei</i> Shirota, <i>L. casei</i> LC01, <i>L. plantarum</i> ST-111 <i>L. paracasei</i> LPC37	<i>S. mutans</i> , <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> , <i>S. sanguinis</i>	Çoklu biyofilmler	Oral mikrobiyotanın değişimi	Lin vd. 2017
<i>L. casei</i> 01	<i>S. mutans</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. salivarius</i>	Çoklu biyofilmler	Diş yüzeyine yapışma ve dental plaktaki bakteriyel topluluklara entegrasyon	Nadelman vd. 2019
<i>L. plantarum</i> FB-T9	<i>S. mutans</i>	Sıçan ağız boşluğu	FB-T9, <i>S. mutans</i> 'ın zamansal ve mekansal nişleri için güçlü bir rakiptir	Zhang vd. 2020

Probiyotiklerin hastalıkları tedavi etme veya önlemedeki etkinliği yıllardır devam eden bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Ancak Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi gibi başlıca tıbbi düzenleyici otoriteler, herhangi bir probiyotik formülasyonu terapötik bir modalite olarak henüz onaylamamıştır. Dolayısıyla, probiyotiklerin diyet takviyeleri olarak pazarlanması, sağlığı geliştirici etkilerinden çok genellikle güvenlik, hedef lokasyondaki canlılık ve herhangi bir gıdaya ya da ürüne eklenecekse organoleptik özellikleri üzerindeki etkilerine bağlı olmaktadır (Suez vd.

2019). Probiyotik mikroorganizmalar genellikle güvenli kabul edildiğinden probiyotik mikroorganizmaların insan takviyesi olarak kullanımı da düzenleyici makamlar tarafından güvenli kabul edilmektedir. Bu güvenlik profili ise esas olarak, probiyotiklerin gıdalarda doğal olarak bulunmasına ve yüzyıllardır geleneksel gıdalarla tüketilmesine dayanmaktadır. Günümüzde gerçekleştirilen klinik çalışmalar neticesinde elde edilen güvenilirlik sonuçları ise halen tartışmalıdır. Probiyotiklerin sağlıklı yetişkinlerde kullanımı güvenli olabilse de, küçük bebeklerde ve çok düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda, yoğun bakım ünitelerindeki kritik yetişkin ve bebek hastalarda, kısmen bakteriyemi ve fungemi nedeniyle ameliyat sonrası hastanede yatan veya bağışıklığı baskılanmış hastalarda kullanımları daha yüksek enfeksiyon ve/veya morbidite riski ile ilişkilendirilmektedir (Suez vd. 2019). Probiyotik kullanımı ile artan enfeksiyon riski arasındaki bu ilişki halen nedensel olarak doğrulanmayı beklemektedir. Bununla birlikte, probiyotikler konağın mikrobiyal topluluklarının bileşimini değiştirebilmekte ve değişen mikrobiyotanın homeostazı ve disbiyozu, sırasıyla sağlığa veya hastalığa yol açabilmektedir. Ancak yerleşik ağız mikrobiyotasına eksojen probiyotik bakterilerin kolonize olması da oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle, ağız boşluğunda probiyotik kolonizasyon sınırlamaları üstesinden gelinmesi gereken önemli bir diğer sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Chen vd. 2020). Ayrıca halihazırda mevcut probiyotikler için yeterli regülasyon mekanizmalarının henüz yeterli olmaması, yeni nesil probiyotikler için kullanılacak resmi bir düzenleyici onay sürecinin geliştirilmesi gerekliliğinin kritik önemini de vurgulamaktadır. Tüm bu çözülmeyi bekleyen ve halen tartışma yaratan güncel sorunların üstesinden gelebilmek adına, canlı probiyotiklerin olumlu etkilerinde kilit rol oynayan probiyotik kaynaklı post-biyotik mediatörlerin (PM) kullanımına yönelik alternatif bir saha oluşmaktadır.

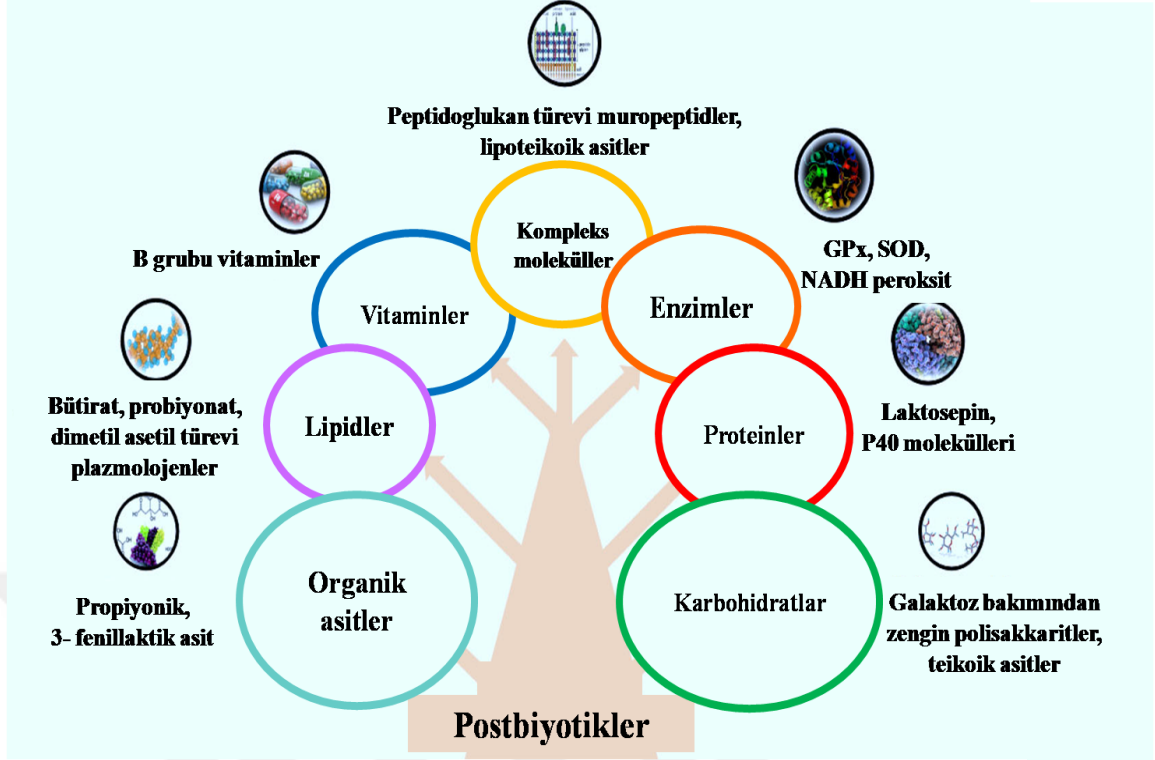
2.6.2 Mikrobiyal karyojenik biyofilm inhibitörleri: Post-Biyotik Mediatörler

Geleneksel probiyotik, prebiyotik ve paraprobiyotik tanımlarına uymayan ve güncel bir terim olarak karşımıza çıkan “Post-biyotik” kelimesi için araştırmacılar; canlı olmayan probiyotikler, inaktive edilmiş probiyotikler, biyotik olmayanlar, hayalet probiyotikler ve metabiyotikler gibi farklı terminolojiler önermektedir. Bununla birlikte, “paraprobiyotikler” (hayalet veya inaktif probiyotikler); Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya

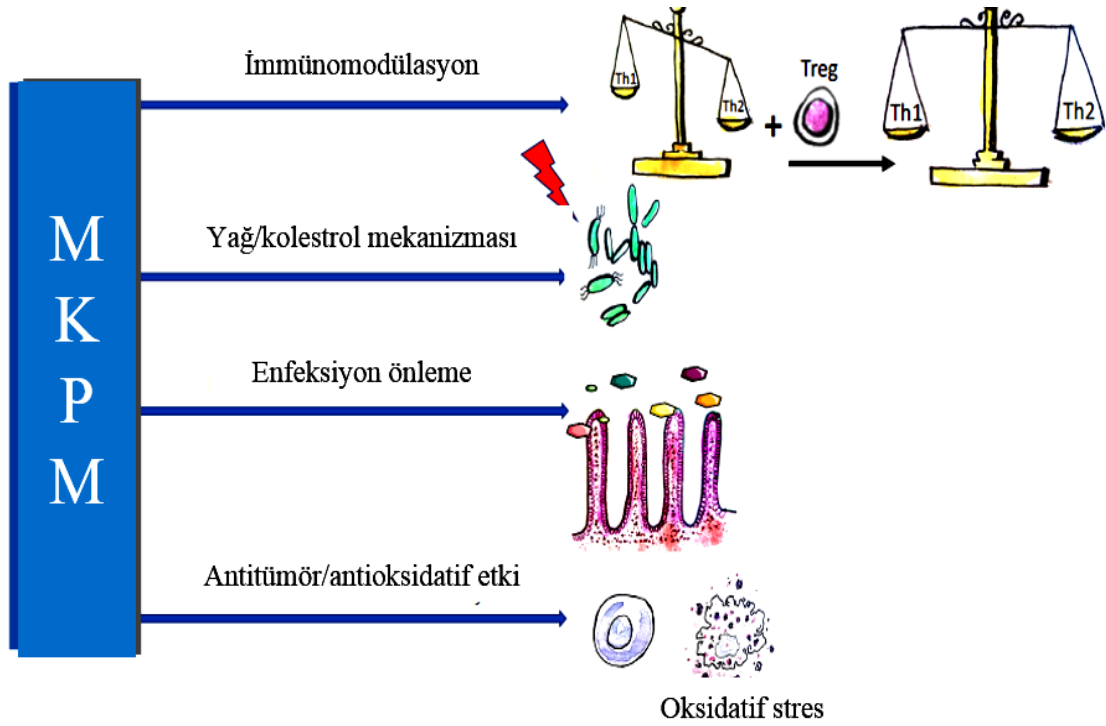
Sağlık Örgütü (FAO/WHO) tarafından küçük değişikliklerle probiyotik tanımına benzer şekilde “yeterli miktarlarda uygulandığında, tüketiciler üzerinde fayda sağlayan inaktive (canlı olmayan) mikrobiyal hücreler” olarak ifade edilmektedir. Son yıllarda oldukça yeni bir kavram olmasına rağmen post-biyotikler ise, “konakçıda biyolojik aktiviteye sahip mikroorganizmalar tarafından üretilen bakteriyel veya metabolik ürünler” olarak tanımlanmaktadır (Nataraj vd. 2020). Probiyotik olarak kabul edilen suşlar tarafından üretilen post-biyotiklerin tüketiciler üzerinde sıklıkla benzer veya tamamlayıcı etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (Aguilar-Toalá vd. 2018).

Post-biyotik mediatör (PM) kavramı, farklı biyolojik yolları etkileyerek mikrobiyota üyelerinin faydalı etkilerine aracılık eden çeşitli biyo-aktif metabolitler (mediatörlerin) için kullanılmaktadır. Aynı zamanda hücre bağımsız süpernatant, metabiyotik ve biyojenik olarak da tanımlanan post-biyotik mediatörler; Tsilingiri ve Rescigno’ya (2013) göre mikroorganizma tarafından salınan veya mikroorganizmanın metabolik aktivitesi yoluyla üretilen, konak üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak yararlı bir etki sergileyen herhangi bir maddeyi veya sinerjistik etki sağlayabilen birden çok maddeyi içerebilmektedir. Bu maddelerin konakçıya faydalı etki sağlayan ve probiyotik tanımını karşılamayan tüm biyo-aktif bileşenleri içerebileceği varsayılmaktadır (Şekil 2.8). Post-biyotik mediatörler kısa zincirli yağ asitlerini, enzimleri, peptidleri, teikoik asitleri, peptidoglikan türevi muropeptidleri, endo ve eksopolisakkaritleri, hücre yüzey proteinlerini, vitaminleri, plazmolojone ve organik asitleri ihtiva edebilmektedir (Konstantinov vd. 2013). Mikrobiyal bileşenler arasında, peptidoglikanlar, polisakkaritler, teikoik asitler ve hücre yüzey proteinleri bulunmaktayken, ana metabolitleri arasında laktik asitler, proteinler, bakteriyosinler, enzimler ve organik asitler yer almaktadır.

Post-biyotik mediatörlerin konakçı üzerinde antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antihipertansif, hipokolestolemik, antioksidan ve immünomodülatör etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (Şekil 2.9). Bu özellikler, mikrobiyota homeostazını ve konakçı metabolik ve sinyal yollarını olumlu bir şekilde etkilemektedir (Marzec ve Feleszko 2020).



Şekil 2.8 Post-biyotik mediatörlerin ana gruplarının gösterimi (Homayouni vd. 2020)

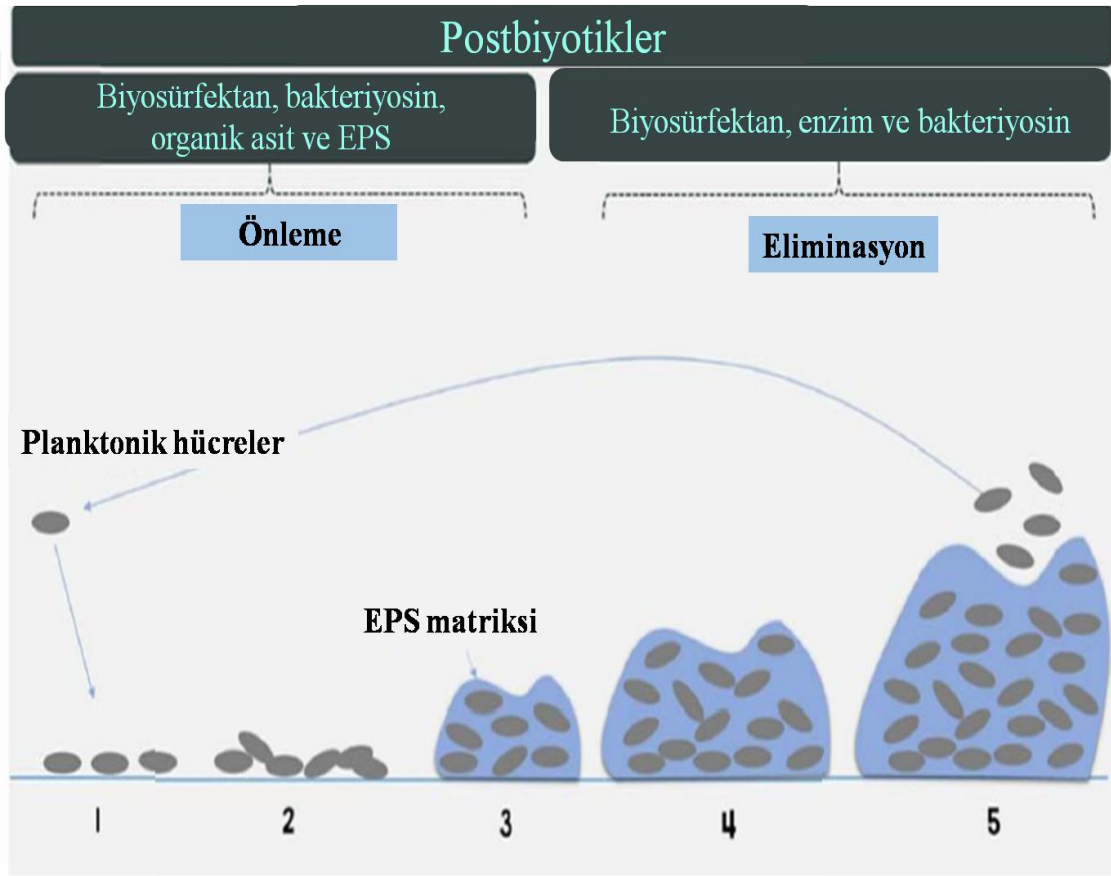


Şekil 2.9 Post-biyotik mediatörlerin konakçı üzerindeki etki mekanizmaları (MKPM; Mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatör) (Marzec ve Feleszko 2020)

Kısa zincirli bir yağ asidi olan bütiratın T hücre farklılaşmasını indüklediği (Furusawa vd. 2013), *Bacillus coagulans* bakterisinden elde edilen hücre bağımsız süpernatantın antiinflamatuar özellikler sergilediği (Jensen vd. 2010), *B. breve* bakterisinden elde edilen süpernatantın ise enterik hücrelerin olgunlaşmasını ve hayatta kalmasını indüklediği ve sonuç olarak IL-10 salgılanmasını arttırdığı, TNF- α sekresyonunu ise inhibe ettiği belirtilmiştir (Hoarau vd. 2008). İnflamasyon, karsinogenez ile ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğundan, inflamasyonu inhibe eden herhangi bir maddenin anti-kanser potansiyeli de olabilmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinden propiyonatın (*Propionibacterium freudenreichii* tarafından üretilen) mide kanseri hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklediği ve epigenetik modifikasyonlar yoluyla onkogenlerin ve baskılayıcı genlerin düzenlenmesini etkilediği bildirilmiştir (Cousin vd. 2012). Post-biyotik mediatörler ayrıca lipid metabolizmasında rol oynayabilmekte ve kardiyovasküler hastalık riskini de azaltabilmektedir. Propiyonatın kolesterol öncüllerinin yoğunlaşmasını engelleyebildiği ve statin benzeri etkilere yol açtığı rapor edilmiştir (Bush ve Milligan 1971). Kefiranın inflamasyonun azaltması, makrofajlarda kolesterol birikiminin önlenmesi ve lipid konsantrasyonunun azalmasından kaynaklanabilecek antiaterojenik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Uchida vd. 2010). *L. fermentum* bakterisinden elde edilen PM'ler ise, hepG2 hepatik hücrelerinde otofajiyi tetiklemiş ve *L. fermentum* otofaji indüktif potansiyeli ile farmakolojik olarak indüklenen karaciğer toksisitesinde koruyucu etkiler sergilemiştir (Dinic vd. 2017). Post-biyotik mediatörler; bağırsak bariyerini kapatarak, bazı patojenik bakterilerin ihtiyaç duyduğu reseptörlere rekabetçi bir şekilde bağlanarak, konakçı genlerin ekspresyonunu değiştirerek veya yerel ortamı modüle ederek doğrudan antimikrobiyal etkilere de sahip olabilmektedir (Khodaii vd. 2017). *Lactobacillus* spp.'den elde edilen PM'lerin *S. mutans* kolonizasyonunu engelleyen metabolitler içerdiği belirtilmiştir (Wasfi vd. 2018). Antimikrobiyal etkilerine ilaveten *L. plantarum* bakterisinden elde edilen PM'nin içerdiği lipoteikoik asit ile *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Ahn vd. 2018).

Bakteriyosinler, organik asitler, biosürfaktanlar gibi biyo-aktif bileşenleri içeren PM'ler, biyofilmler üzerinde de potansiyel etkiler sergilemektedir (Moradi vd. 2019). Bu bileşenlerin her biri, özel işlevleri nedeniyle biyofilm oluşumunda belirli bir aşamayı

etkileyebilmektedir (Şekil 2.10). Beş farklı aşamadan meydana gelen biyofilm oluşum sürecinde herbir aşamada meydana gelen etki diğer aşamaları direk olarak etkilemektedir. Biyofilmlerle başa çıkmak için biyofilm oluşumunun önlenmesi ve gelişen biyofilmin ortadan kaldırılması (eliminasyon) başta olmak üzere iki temel strateji bulunmaktadır. Post-biyotik mediatör olarak tanımlanan bakteriyosinler, organik asitler, biosüurfaktanlar gibi bileşenler ise kendilerine has özellikleri ile belirli aşamaları etkilemekte ve hem biyofilm oluşumunun önlenmesi hem de gelişen biyofilmin ortadan kaldırılmasına yönelik potansiyel etkiler sergilemektedirler (Moradi vd. 2020).



Şekil 2.10 Biyofilm oluşumunun beş aşaması

(1: birincil yapışma, 2: sıkı yapışma, 3: ilk gelişme, 4: olgunlaşma ve 5: dağılma) ve bireysel postbiyotik mediatörün biyofilm oluşumu üzerindeki önleme ve eliminasyon potansiyeli (Moradi vd. 2020)

Post-biyotik mediatörlerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri belirli bir bileşenle (bakteriyosin veya organik asitler gibi) sınırlı değildir. Birçok post-biyotik mediatör, antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteden sorumlu olabilmekte, hatta sinerjistik olarak

hareket edebilmektedir. Dolayısıyla PM olarak tanımlanan biyo-aktif bileşenlerin sinerjistik etkileri nedeniyle kokteyl olarak kullanılmaları tavsiye edilmektedir (Zólkiewicz vd. 2020). Bazı mekanizmaların ve klinik faydaların doğrudan canlı mikroorganizmalar ile ilişkili olmadığı dikkate alındığında; doğru dozlarda uygulandığında konak üzerindeki olumlu etkileri, güvenlik açısından probiyotiklere olan üstünlükleri (antibiyotik direnci, toksin üretimi, sepsis, canlılık gibi sorunları içermemeleri), farklı biyo-aktif bileşen içerikleriyle sinerjistik ve multi-fonksiyonel özellikleri, kolay ve ekonomik olarak elde edilebilmeleri PM'leri patojenlerle ve biyofilmle mücadele başta olmak üzere çeşitli terapötik stratejiler için potansiyel bir aday yapmaktadır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişim koşulları

Tez çalışması kapsamında, diş çürüğü oluşumu için öncül olarak kabul edilen ve karyojenik bir patojen olarak tanımlanan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşu kullanılmış ve BHI (Merck, Almanya) besiyerinde anaerobik koşullarda 37 °C’de geliştirilmiştir. Post-biyotik mediatör üreticileri ise, Farmabiyotik Teknolojileri Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Ekibimizin daha önceki çalışmaları kapsamında izole edilen bu izolatlar (Çizelge 3.1), canlı hücrelerinin *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı yüksek aktivite sergilemelerinden dolayı tez çalışması kapsamına dahil edilmişlerdir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan izolatların kodları, gelişim koşulları ve izolasyon kaynakları

No	Kodu	Gelişim koşulları	İzolasyon Kaynağı
1.	EIR/IF-1	37 °C MRS besiyeri	Yeni doğan bebek fekal mikrobiyotası
2.	EIR/DG-1	37 °C MRS besiyeri	Yunus bağırsak mikrobiyotası
3.	EIR/BG-2	37 °C MRS besiyeri	Bal arısı; <i>Apis mellifera</i> bağırsak mikrobiyotası

3.1.2 Besiyerleri, tampon ve çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltilerin içerikleri Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Katı besiyeri hazırlamak için sıvı ortama % 1.5 agar (Merck, Almanya), yarı katı besiyeri hazırlamak içinse % 0.75 agar ilave edilmiştir. Besiyerleri, tampon, çözeltiler ve kullanacak tüm cam malzemeler 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril

edilmiştir. Sıcaklığa duyarlı tüm malzemelerin sterilizasyonu ise 0.22 µm çapa sahip steril şırınga ucu membran filtreler (Sarstedt, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözeltilerin içerikleri

Besiyeri/Çözelti/Tampon	İçerik/L
MRS; De Man, Rogosa and Sharpe (Merck, Almanya)	10 g Pepton 8 g Et ekstraktı 4 g Maya ekstraktı 20 g Dekstroz 2 g Dipotasyum Sülfat 1 g Tween 80 2 g Diamonyum sitrat 5 g Sodyum asetat 0.2 Magnezyum sülfat 0.04 Mangan Sülfat pH 5.7 ± 0.2
BHI; Brain Heart Infusion (Merck, Almanya)	27.5 g Beyin, kalp ekstraktı ve pepton Dekstroz 5 g Sodyum klorür 2.5 Disodyum fosfat pH 7.4 ± 0.2
TSB; Triptik Soy Broth (Merck, Almanya)	17 g Tripton 3 g Soya peptonu 2.5 g Dekstroz 5 g Sodyum klorür 2.5 g Dipotasyum hidrojen fosfat pH 7.3 ± 0.2
PBS Tamponu; Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Merck, Almanya)	8 g Sodyum klorür 0.2 g Potasyum klorür 1.44 g Disodyum fosfat 0.24g Potasyum fosfat pH 7.4

3.1.3 Bakteri kültürlerinin saklanması

Sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilen izolatlar, 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde (Nüve, Türkiye) 24 saat kültüre edilmiş ve ardından 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi takiben üst faz uzaklaştırılmış ve hücreleri içeren pellet 1 mL steril serum fizyolojik su (SF; % 0.85 NaCl, Merck, Almanya) ile yıkanmıştır. İkinci bir santrifüj işlemi ardından hücreler % 50 gliserol (Merck, Almanya) çözeltisinde süspanse edilmiş ve kriyoviallere aktararak -80 °C'de saklanmıştır (Todorov vd. 1999).

3.2 Yöntem

3.2.1 İzolatların tanımlanması

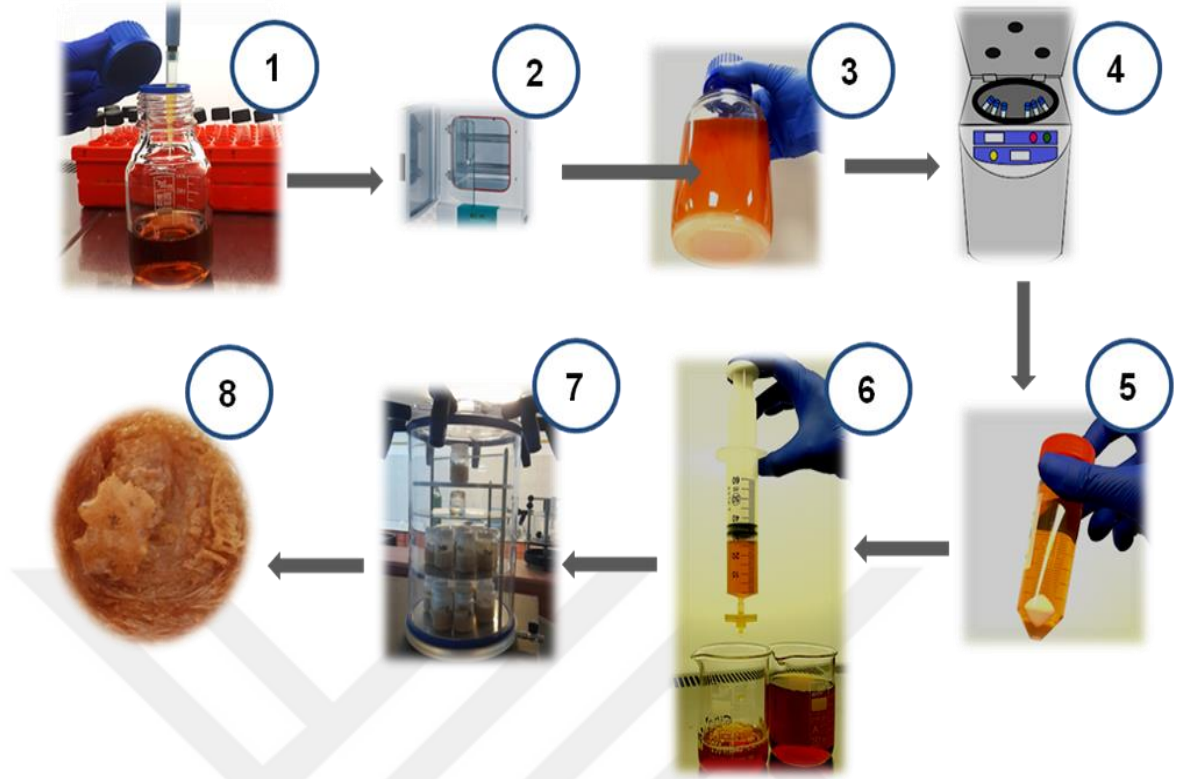
Tez çalışması kapsamında kullanılan izolatların ön tanımlaması, hücre yüzey protein profillerinin esas alındığı MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak izolatların aktif kültürleri MRS katı besiyeri yüzeyine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben oluşan koloniler MALDI plakası üzerine alınarak matriks solüsyonu ile süspanse edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. MS analizi, Autoflex MALDI-TOF kütle spektrometresi (Bruker Daltonics, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. MS spektrumları otomatik olarak saptanmış ve mikrobiyal tanımlama için standart veri tabanı içeren Flex Control 3.4 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 2.000’den büyük elde edilen skorlar tür düzeyinde tanımlamayı, 1.700-1.999 arasında elde edilen skorlar cins düzeyinde tanımlamayı, 1.700’den küçük elde edilen skorlar ise güvenilir bir tanımlama olmadığını göstermiştir (Lee vd. 2015).

Ön tanımlamaları MALDI-TOF ile gerçekleştirilen izolatların kesin tanımlamaları ise 16S rRNA dizi analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak aktif kültürlerin genomik DNA’ları ticari genomik DNA izolasyon kiti (Promega, A.B.D., EK-1a) kullanılarak ve üreticinin önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA’nın saflık ve miktar (ng/μL) tayini 260_{nm}, 280_{nm}, 260_{nm}/280_{nm}’de gerçekleştirilen spektrofotometrik okumalar (NANODROP, Thermo Fisher Scientific) neticesinde belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001). DNA izolasyonunu takiben 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) işlemi gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak amacıyla Gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan evrensel primerler (27F: 5’ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3’ ve 1492R: 5’ TAC CTT GTT ACG ACT T 3’) kullanılmıştır. 25 μL’lik toplam reaksiyon hacmi için sırasıyla; 2.5 μL 10×tampon, 1.5 μL MgCl₂ (25 mM), 0.5 μL 10 mM deoksinükleotidtrifosfat karışımı, 0.125 μL 50 ünite Taq DNA polimeraz

enzimi ve 100 ng kalıp DNA eklenmiştir. PZR işlemi, “Applied Biosystems/Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers” cihazında başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 30 saniye, 95 °C’de 20 saniye denatürasyon, 56 °C’de 20 saniye primer bağlanması ve 68 °C’de 1 dakika 15 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 30 döngüde gerçekleştirilmiştir (Edwards vd. 1989, Osborne vd. 2005). Elde edilen PZR ürünü Tris-Asetat-EDTA tamponu ile hazırlanan % 1.5 agaroz (Sigma, Almanya) içeren jelde analiz edilmiş ve sonuçlar jel görüntüleme cihazı (BioRad, A.B.D.) kullanılarak görüntülenmiştir. Kit kullanımı (Roche, A.B.D., EK-1b) neticesinde jelden saflaştırılan 1462 bç’lik 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi ise BM LAB (Türkiye) tarafından hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. ABI formatında elde edilen dizi bilgileri FinchTV yazılımı ile analiz edilmiş ve hangi mikroorganizma dizisi ile benzerlik gösterdiği BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak NCBI’da (National Center for Biotechnology Information) bilinen diğer dizilerin bulunduğu veritabanlarıyla (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) karşılaştırılması sonucunda belirlenmiştir.

3.2.2 Mikrobiyota kaynaklı post-biyotik mediatörlerin eldesi

Canlı hücrelerinin hedef patojen üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği bilinen mikrobiyota kaynaklı üç izolata ait PM’lerin ekstraksiyonu amacıyla, tüm izolatlar % 1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında 8.500 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında PM’leri içeren üst faz (süpernatant) alınmış ve hücrelerinden arındırılmak üzere 0.22 µm çaplı steril membran filtreden (Sarstedt, Almanya) geçirilmiştir (Mohammedsaeed vd. 2014). Bir gece -20 °C’de, ardından -86 °C’de dondurulan PM’leri içeren üst faz 24 saat boyunca liyofilizasyon işlemine (donma koşulları -20 °C, vakum basıncı: 0.120 mB-kondansör sıcaklığı -58 °C; Christ freeze dryer, Almanya) tabi tutularak toz formda elde edilmiştir. Ana stok konsantrasyonu 500 mg/mL olacak şekilde steril distile su ile sulandırılan PM’ler, 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır. Tüm bu aşamalar Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1 Toz formda PM eldesinin aşamaları

1. Saf kültürlerin 100 mL sıvı MRS besiyerine % 1 oranında inokülasyonu, 2. 37°C'de 24 saat inkübasyon, 3. Aktif kültürün eldesi, 4. 8.500 rpm'de 20 dakika santrifüj, 5. Pelletin ve PM içerikli üst fazın eldesi, 6. PM içerikli üst fazın hücrelerinden arındırılmak üzere 0.22 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilmesi, 7. Liyofilizasyon işlemi [vakum basıncı: 0.120 mB-kondansör sıcaklığı - 58°C (Christ freeze dryer, Almanya)], 8. PM içerikli toz preparatın eldesi.

3.2.3 Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

3.2.3.1 Kuyu-difüzyon yöntemi ile inhibisyonun tespiti

Dental plak (biyofilm) oluşumunda önemli bir role sahip olan *S. mutans* ATCC 25175 patojenine karşı canlı hücrelerinin antibakteriyel aktivite sergilediği daha önceki çalışmalarda belirlenen üç izolatın, üretmiş oldukları PM'lerinin de aktivite sergileyip sergilemediklerini belirlemek amacıyla kuyu-difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Anaerobik koşullarda, BHI sıvı besiyerinde 37 °C 24 saat geliştirilen *S. mutans* ATCC 25175 suşu 10 mL yarı katı BHI besiyerine inoküle edilmiş (0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde; 10^8 kob/mL) ve ardından katı BHI besiyeri üzerine dökülmüştür. Agar içeriğinden dolayı katı besiyeri yüzeyinde donan besiyeri üzerinde

kuyular açılmış ve açılan kuyulara 100 µL PM eklenmiştir (100 mg/mL). Bu aşamada antibakteriyel etkinin doğası hakkında ön bilgi elde edinebilmek amacıyla; 1 mg/mL olacak şekilde 4 mM fosfat tamponunda proteinaz K enzimi (Sigma, Almanya) ile 37 °C’de 3 saat muamele edilen PM’ler ile 6 M NaOH (Merck, Almanya) ile pH 6.5-7.0’a getirilen nötralize PM’ler de çalışmaya dahil edilmiştir (Todorov ve Dicks 2005). Ekimleri gerçekleştirilen petriyer anaerobik koşullarda 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında meydana gelen inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür (Savadojo vd. 2004).

3.2.3.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

İzolalar tarafından üretilen PM’lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı MİK değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü kılavuzu (CLSI 2008) esas alınarak 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarda (LP, Italiana) gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak, farklı son konsantrasyonlarda hazırlanan PM’ler (0-50 mg/mL) mikropilaya kuyularına aktarılmıştır. Ardından, kültür yoğunluğu 0.5 McFarland’a göre ayarlanmış *S. mutans* ATCC 25175 suşu 50 µL/kuyu olacak şekilde mikropilaya kuyularına eklenmiştir. Son hacim BHI besiyeri ile 200 µL’ye tamamlanmıştır. Sadece bakteri içeren ancak PM içermeyen kuyular pozitif kontrol, sadece BHI besiyerini içeren kuyular ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Anaerobik koşullarda 37 °C’de 24 saat inkübasyonu takiben mikrotitre plaka kuyularındaki bakteri gelişimi, mikropilaya okuyucuda (Multiscan Ascent, Labsystems) 600_{nm} dalga boyunda gerçekleştirilen optik okumalar referans alınarak değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı en düşük doz, MİK (MİK-100) dozu olarak belirlenmiştir. Deneilerde kullanılacak diğer MİK oranları ise bu değere göre hesaplanmıştır (Hassan vd. 2011).

3.2.3.3 Minimum bakteriyosidal konsantrasyonun (MBK) belirlenmesi

Bölüm 3.2.3.2’de gerçekleştirilen çalışmayı takiben her kuyudan 100 µL alınmış ve 900 µL steril SF içerisine aktararak 10⁻⁸e kadar dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Dilüsyon işlemi takiben her bir dilüsyon tüpünden BHI agar yüzeyine 10 µL

damlatılarak (damla plak ekim yöntemi) mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir. Ardından petriyeler 37 °C’de 48 saat anaerobik koşulların sağlandığı jar içerisinde inkübe edilmiş ve gelişen koloniler sayılarak log kob/mL olarak hesaplanmıştır. Sayımlar sonucu kontrole kıyasla 3 log düşüş (% 99.9 log azalma) sağlayan dozlar ise MBK olarak belirlenmiştir (Schwalbe vd. 2007).

3.2.4 Antibiyofilm aktivitenin belirlenmesi

3.2.4.1 *Streptococcus mutans*’ın biyofilm üretim koşullarının optimizasyonu

Bu aşamada öncelikli olarak; tez çalışması kapsamında hedef patojen olarak seçilen *S. mutans* ATCC 25175 suşu için ideal biyofilm üretim koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, hedef patojen polistiren ve U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarda farklı koşullarda [BHI/TSB besiyeri, aerobik/anaerobik ortam, 30/37 °C inkübasyon sıcaklığı, 24/48 saat inkübasyon süresi] ayrı ayrı geliştirilmiştir. Belirtilen koşulları takiben biyofilm üretimleri kristal viyole boyama esasına göre kolorimetrik olarak belirlenmiştir (Stepanovic vd. 2000, Vestby vd. 2009). Bu yöntemle göre; inkübasyon sürelerinin bitiminde kuyular aspire edilmiş ve planktonik formdaki hücrelerin uzaklaştırılması için üç kez steril SF ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra mikrotitre plakalar oda koşullarında kurumaya bırakılmış ve sonrasında kuyulara 150’şer µL % 95’lik metanol (Merck, Almanya) transfer edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben boşaltılan kuyulara 200’er µL % 0.1’lik kristal viyole çözeltisi (Merck, Almanya) transfer edilmiş ve oda koşullarında 30 dakikalık inkübasyon süresini takiben kuyular steril distile su ile yıkanarak tutunmayan boya uzaklaştırılmıştır. Plakalar kurutulduktan sonra, son aşamada kuyulara % 33’lük glasiyel asetik (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiş ve kuyu çeperlerindeki biyofilm yapılarına tutunmuş boya çözündürülmüştür. Çözünen boya kristal viyole renginin optik yoğunluğu 595_{nm} dalga boyunda gerçekleştirilen okumalar neticesinde belirlenmiştir (Multiscan Ascent, LabSystems).

Elde edilen veriler neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun güçlü biyofilm üretimi sergilediği ideal inkübasyon koşulları (ortam, besiyeri, inkübasyon süresi ve sıcaklığı) netleştirilmiş ve tez çalışmasının ilerleyen aşamalarına dahil edilmiştir.

3.2.4.2 PM'lerin antibiyofilm etkisinin mikrotitre plakalar üzerinde belirlenmesi

İzolalar tarafından üretilen PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine etkinlikleri, polistiren ve U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitre plakaları kullanılarak üç farklı yaklaşımla değerlendirilmiştir: i) Birlikte inkübasyon ii) eradikasyon ve iii) ön muamele testi (Onbas vd. 2019). Tüm deneyler, önceki bölümde *S. mutans* ATCC 25175 suşu için belirlenen en uygun ortam ve optimize edilmiş kültür koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir

Birlikte inkübasyon: Daha önce belirlenen MİK dozları esas alınarak çeşitli konsantrasyonda hazırlanan PM'ler (MİK 100, 75, 50, 25, 10, 1) polistiren ve U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitre plakalara eklenmiştir. Ardından herbir kuyuya 0.5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde *S. mutans* ATCC 25175 suşu inoküle edilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren kuyular, pozitif kontrol olarak ise *S. mutans* ATCC 25175 suşunu içeren kuyular kullanılmıştır. Mikrotitre plakalar, *S. mutans* ATCC 25175 suşu için belirlenen güçlü biyofilm koşullarında inkübe edilmiş ve biyofilm üretimi bölüm 3.2.4.1'de bahsedilen kristal viyole boyama esasına göre belirlenmiştir. Kontrol gruplarından elde edilen OD değerlerine göre biyofilm üretim miktarlarındaki azalmalar $[(C-B)-(T-B)]/[(C-B)] \times 100$ formülü kullanılarak değerlendirilmiştir (C: sadece *S. mutans* ATCC 25175 suşunu içeren kuyular; B: sadece besiyeri içeren kuyular; T: *S. mutans* ATCC 25175 suşunu ve belirli konsantrasyonda PM'leri içeren kuyular). Bu formül kullanılarak farklı MİK konsantrasyonlarındaki PM'lerin antibiyofilm etkileri, pozitif kontrol (sadece patojen içeren kuyulardan gelen absorbans değerleri) grupları ile kıyaslanarak yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

Eradikasyon (oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması): Eradikasyon aşamasında öncelikli olarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış *S. mutans* ATCC 25175 suşu

polistren ve U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarına inoküle edilmiş ve biyofilm oluşturması sağlanmıştır. İdeal koşullarda inkübasyon sonrasında kuyular aspire edilmiş ve planktonik fazdaki hücrelerin uzaklaştırılması için iki kez SF ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından son hacmi MİK 100, 75, 50, 25, 10, 1 konsantrasyonlarında olacak şekilde kuyulara PM'ler eklenmiş ve 24 saat oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren kuyular, pozitif kontrol olarak ise sadece *S. mutans* ATCC 25175 suşunu içeren kuyular kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasına eradikasyon yüzdesi ve giderimi bölüm 3.2.4.1'de bahsedilen kristal viyole boyama esasına ve matematiksel hesaplamalara göre belirlenmiştir.

Ön muamele: Bu aşamada öncelikli olarak, MİK 100, 75, 50, 25, 10, 1 konsantrasyonlarındaki PM'ler polistren ve U tabanlı 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarına eklenmiştir. Plakalar oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildikten sonra kuyular aspire edilmiş ve 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış *S. mutans* ATCC 25175 suşu eklenmiştir. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren kuyular, pozitif kontrol olarak ise *S. mutans* ATCC 25175 suşunu içeren kuyular kullanılmıştır. Mikrotitre plakalar *S. mutans* ATCC 25175 suşu için belirlenen güçlü biyofilm koşullarında inkübe edilmiş ve biyofilm üretimi bölüm 3.2.4.1'de bahsedilen kristal viyole boyama esasına ve giderimi ise yukarıda belirtilen matematiksel hesaplamalara göre belirlenmiştir.

3.2.4.3 PM'lerin antibiyofilm etkisinin dış yüzeylerinde belirlenmesi

Dış kliniklerine başvuran 18-25 yaş aralığındaki sağlıklı bireylerden çekilen dişler (molar/pre-molar) onam formu imzalatılarak temin edilmiş ve çalışmanın bu aşamasından *ex-vivo* model oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Etik kurul izni ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (No:2019-14; 24.07.2019). Aseptik koşullarda laboratuvara getirilen dişler SF kullanılarak yıkanmış, fırçalanmış ve otoklavda steril edilmiştir.

Bölüm 3.2.4.2 kapsamında kullanılan yaklaşımlar arasında en iyi giderim sağlayan yöntem ve en iyi antibiyofilm etki sergileyen MİK dozları *S. mutans* ATCC 25175 suşunun dış yüzeyinde biyofilm oluşturma yeteneğine karşı kullanılmıştır. Biyofilm giderimi ise benzer şekilde kristal viyole boyama işlemi neticesinde gözlemsel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.4 SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) analizleri

Bölüm 3.2.4.2 kapsamında kullanılan yaklaşımlar arasında en iyi giderim sağlayan yöntem ve en iyi antibiyofilm etki sergileyen MİK dozlarının etkinlikleri SEM analizi ile de görselleştirilmiştir. Bu kapsamda tüm analizler 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilen ve 121 °C'de 15 dakika olacak şekilde otoklavda steril edilen cam yüzeyler (coverslip) üzerinde gerçekleştirilmiştir. İdeal olarak seçilen yaklaşımın uygulanmasını takiben, kuyular aspire edilmiş ve her bir coverslip 1 mL steril PBS (1X) ile nazikçe yıkandıktan sonra temiz kuyulara aktarılmıştır. % 2.5 glutaraldehit (Merck, Almanya) çözeltisinde 1 saat bekletilerek fikse edilen yüzeyler, PBS ile 3 kez yıkama işlemi takiben seri etanol konsantrasyonlarıyla (% 30, 50,70, 80, 90, 100) dehidrasyon işlemine tabi tutulmuştur (Onbas vd. 2019). Havada kurutulan cam yüzeyler altınla kaplanmış (Gatan 682PECS) ve biyofilm yapısı Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü bünyesinde bulunan Taramalı Elektron Mikroskopu (ZEISS, EVO 40) kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.2).

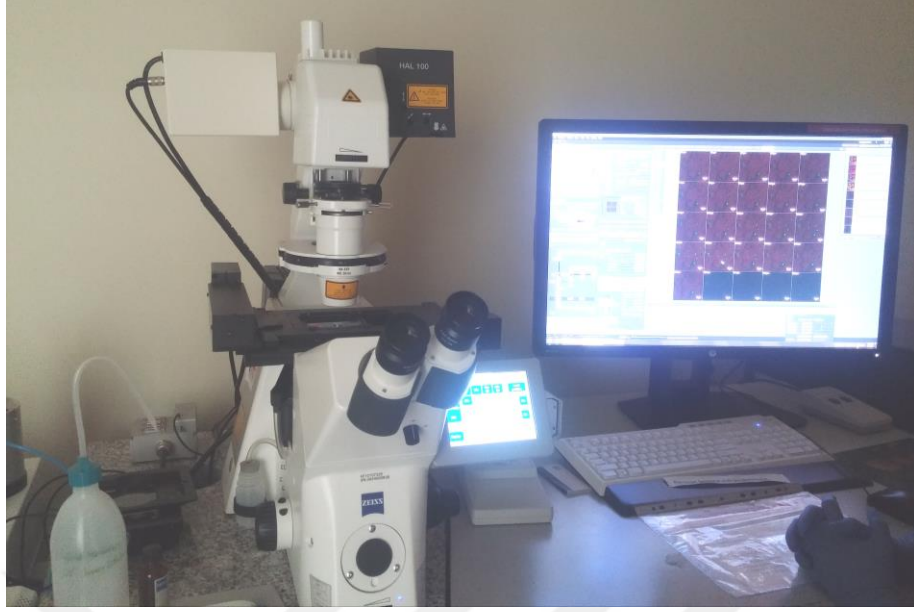
3.2.4.5 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop analizleri

Bölüm 3.2.4.2 kapsamında kullanılan yaklaşımlar arasında en iyi giderim sağlayan yöntem ve en iyi antibiyofilm etki sergileyen MİK dozlarının etkinlikleri Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopunda da analiz edilmiştir. İdeal olarak seçilen yaklaşımın cam yüzeyler (coverslip) üzerinde uygulamasını takiben, kuyular aspire edilmiş ve her bir coverslip 1 mL steril PBS (1X) ile nazikçe yıkandıktan sonra temiz kuyulara aktarılmıştır. Yüzeyler görüntümeden hemen önce canlı/ölü bakteri boyama kiti (Live/dead staining kit, BacLight, Invitrogen) kullanılarak boyanmıştır. Boyanın ikili

bileşenlerinden 5 μM SYTO 9 ve 15 μM propidyum iodid (PI) boyaarı 1:1 olacak şekilde hazırlanmış ve PBS kullanılarak 1:1000 oranında seyreltilmiştir. Hazırlanan boyalar ile karanlık bir ortamda 37 °C’de 10 dakika muamele edilen yüzeyler iki kez distile su ile yıkanmış ve Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü bünyesinde bulunan Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta (Plan-Neofluar 40X/1.3 DIC objective; Carl Zeiss, Şekil 3.3) analiz edilmiştir. Bu aşamada; PM’lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun insan dişi yüzeyinde oluşturduğu biyofilme karşı olan etkileri de benzer boyama yöntemi kullanılarak Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobunda görüntülenmiştir.



Şekil 3.2 Kaplama işlemi (a) ve Taramalı Elektron Mikroskobu, SEM (b) genel görüntüleri



Şekil 3.3 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop genel görüntüsü

Hem cam yüzeylerde hem de dış yüzeyinde oluşan biyofilm yapısının 3 boyutlu projeksiyonlarını oluşturmak için Carl Zeiss Zen 3.3 (Blue version) yazılımı kullanılmıştır. Yayılan floresan, iki florokromu ayırt etmek amacıyla BP 488/543 nm ve LP 585 nm’de kaydedilmiştir. Her biyofilm numunesi için alanların yatay düzlem görüntülerinin iki (yalnızca x ve y: 230.34 m) ve üç (x: 230.34 m, y: 230.34 m ve z: 1 m) boyutlu yığınları elde edilmiştir. Dış yüzeylerinin topografik yapısı nedeniyle mikroskopik inceleme ancak 10X büyütmede yapılabilmektedir.

3.2.5 Quorum sensing (yetersayı algılama)-ilişkili gen ifadelerinin kantitatif Real Time-PZR ile belirlenmesi

Bölüm 3.2.4.2 kapsamında kullanılan yaklaşımlar arasında en iyi giderim sağlayan yöntem ve en iyi antibiyofilm etki sergileyen MİK dozlarının QS-ilişkili gen ifadeleri üzerindeki etkisi kantitatif Real Time-PZR kullanılarak belirlenmiştir. İdeal yaklaşım 15 mL’lik falkon tüplerinde toplam hacim 5 mL olacak şekilde hazırlanmış ve inkübasyonun ardından 4 °C’de 6.000 rpm’de 15 dakika santrifüj işlemi takiben elde edilen hücreler RNA izolasyonuna tabi tutulmuştur. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren örnekler kullanılırken pozitif kontrol olarak besiyeri ve *S. mutans* ATCC 25175 suşunu içeren örnekler kullanılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen

hücreler üzerine 1 mL pureZOL™ RNA izolasyon solüsyonu (fenol ve guanidinyum tiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi; Bio-Rad, A.B.D.) eklenmiş ve homojenizasyonun ardından 0.2 mL kloroform ilave edilmiştir. Hafifçe sallayarak homojenize edilen örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 4 °C’de 12.000 xg’de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi neticesinde en dipte koyu renkli faz (organik çökelti), ortada beyaz renkli faz (DNA fazı) ve en üstte berrak sıvı faz (RNA fazı) olmak üzere üç farklı faz gözlemlenmiştir. En üstteki şeffaf faz diğer fazlarla karıştırılmadan RNAaz içermeyen steril yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 0.5 mL izopropil alkol eklenmiş ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 4 °C’de 12.000 xg’de 15 dakika olarak gerçekleştirilen santrifüj işlemi neticesinde elde edilen RNA pelleti, % 75’lik etanolde hafif pipetleme yapılarak yıkanmıştır. Ardından 4 °C’de 7.000 xg’de 5 dakika süresince santrifüj edilmiş ve elde edilen son RNA pelleti ddH₂O’da çözülmüştür. Saflık ve miktar (ng/μL) tayini spektrofotometrik okumalar (NANODROP, Thermo Fisher Scientific) neticesinde belirlenen RNA’lar kalıp olarak kullanılmış ve komplementer DNA (cDNA) sentezi ticari olarak temin edilen kit (iScript™ cDNA Sentez Kiti, Bio-Rad, A.B.D., EK-1c) kullanımı neticesinde Çizelge 3.3’de belirtilen bileşenler ve 25 °C’de 5 dakika, 46 °C’de 20 dakika ve 95 °C’de 1 dakika olmak üzere üç aşamalı koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Applied Biosystem, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Reksiyon başına kullanılan toplam hacim (μL)
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Ters Traskriptaz	1
Nükleaz içermeyen saf su	Değişken
RNA	Değişken
Toplam hacim	20

Reaksiyon sonucu elde edilen cDNA; SYBR Green (iTaq™ Universal SYBR® Green supermix kit Bio-Rad, A.B.D.) ve Çizelge 3.4’de belirtilen primerler (*comA*, *comX* ve

gtfC genlerini hedef alan) kullanılarak kantitatif Real Time-PZR işlemine tabi tutulmuştur (Bio-Rad CFX96, A.B.D.). Reaksiyona her 1 µL cDNA için, 3 µL SYBR Green reaktifi, 5 µL nükleaz içermeyen saf su ve 0.5 µL ileri ve geri primerler eklenmiştir. Hedef genlerin ifade miktarları kontrol gen grubu olarak (housekeeping geni) seçilen 16S rRNA gen ifade seviyesine göre normalize edilmiş ve eşik sayısı (Ct) olarak ifade edilmiştir. Her gen ifadesinin kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre belirlenmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan genler ve primerlerin dizileri (NCBI Primer Blast veritabanı kullanılarak tasarlanmışlardır)

Gen isimleri	Primer Dizileri (5'-3')		
	Kategori	İleri	Geri
<i>gtfC</i>	Karbohidrat mekanizması-glukoziltransferaz-C	GCCAAGTATGGGGGAGCTTT	CATCGGAACCCCTGTGGAAA
<i>comA</i>	QS-ABC taşıyıcısı	ACGAGCCTAACAAGGGGATT	CCCTGAGGCATTTGTTCAAT
<i>comX</i>	QS-RNA polimerazın alternatif sigma alt birimi	CTGTTTGTC AAGTGGCGGTA	GCATACTTTGCCTTCCCAA
16S rRNA	Housekeeping	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG	CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA

3.2.6 PM'lerin metabolit içeriğinin belirlenmesi

3.2.6.1 Organik asit içerik analizi

Organik asit analizi, UV Dedektörlü Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi cihazında (HPLC, High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu Prominence Series HPLC-20A, Japonya) 210_{nm}'de yapılan ölçümler neticesinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Mobil faz olarak 0.08 N H₂SO₄, sabit faz (kolon) olarak ise Transgenomic (Merck-Concise) marka 87H-3 iyon değiştirme reçinesi özelliğinde 250 mm x 4.6 mm x 5 µm kolon kullanılmıştır. Analiz kapsamında kullanılan diğer tüm koşullar Şekil 3.5'de sunulmuştur. Numuneler 0.22 µm çapına sahip filtrelerden geçirilmiş, 20 µL enjeksiyon hacminde cihaza yüklenmiş ve standart karışımı (okzalik, sitrik, tartarik, maleik, malik, süksinik, laktik, formik, asetik, bütirik asit) ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.4 Organik asit analizinde kullanılan UV Dedektörlü HPLC cihazı

Mode:

Flow Pressure

Pump A Flow: mL/min

Configured Pumps

Pump A: LC-20AD

Pump B:

Pump C:

Pump D:

Pressure Limits (Pump A)

Maximum: bar

Minimum: bar

Model: CTO-20A

Column Oven

Oven Temperature: C

Temperature Limit(Maximum): C

Ready Check:

Şekil 3.5 Organik asit analizi amacıyla UV Dedektörlü HPLC’de kullanılan koşullar

3.2.6.2 Yağ asiti içerik analizi

Yağ asiti analizi, Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Shimadzu GC-MS QP2020, Japonya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Taşıyıcı gaz olarak Helyum (% 99.999 saflıkta), kolon olarak Restek marka 2560 (orta polarite özellikte ve 100 mm X 0.25 mm X 0.25 µm boyutlarında), standart olarak da Restek marka 37 adet FAME (Fatty Acids Methyl Esters, yağ asiti metil esterleri) karışımı kullanılmıştır. Analiz kapsamında kullanılan diğer tüm koşullar Şekil 3.7’de sunulmuştur. Numuneler cihaza sıvı enjeksiyon yoluyla verilmeden önce, GC-MS için uçucu özellik kazanabilmesi amacıyla metil esterleri haline getirilmiştir. Bu amaçla 0.1 g numune 15 mL’lik santrifüj tüpüne alınmış, üzerine 10 mL hekzan eklenmiş, iyice çalkalandıktan sonra metanolde çözülmüş ve 2 M KOH eklenip tekrar çalkalanmıştır. 1-2 saat karanlık ortamda inkübasyonu takiben üst fazdan 1 µL alınarak cihaza enjeksiyon yapılmış, sonuçlar standarda karşı yapılan ölçüm kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.6 Yağ asiti analizinde kullanılan GC-MS cihazı ve standardı

Sampler GC MS

Inj. Port : SPL1 Inj. Heat Port : INJ1

Column Oven Temp. : 100.0 °C °C

Injection Temp. : 225.0 °C

Injection Mode : Split

Sampling Time : 1.00 min

Carrier Gas : He Prim. Press. : 500-900

Flow Control Mode : Pressure

Pressure : 216.7 kPa

Total Flow : 24.0 mL/min

Column Flow : 1.00 mL/min

Linear Velocity : 20.4 cm/sec

Purge Flow : 3.0 mL/min

Split Ratio : 20.0

Program : Column Oven Temperature

	Rate	Final Temperature	Hold Time
0	-	100.0	4.00
1	3.00	240.0	20.00
2	0.00	0.0	0.00
3	0.00	0.0	0.00

Total Program Time : 70.67 min

Column

Name RT-2560 Thickness : 0.20 um

Length : 100.0 m Diameter : 0.25 mm Set...

Sampler GC MS Description

GCMS-QP Series

Ion Source Temp. : 200 °C

Interface Temp. : 250 °C

Solvent Cut Time : 10.5 min

Micro Scan Width : 0 u

Detector Voltage : Relative to the Tuning Result

Use MS Program : Set... Threshold : 0 kV

Group#1 - Event#1 GC Program Time : 70.67 min

	Start Time (min)	End Time (min)	Acq. Mode	Event Time(sec)	Scan Speed	Start m/z	End m/z
1	11.50	65.00	Scan	0.30	1666	35.00	500.00
2	0.00	0.00	Scan	0.00	0	0.00	0.00

Şekil 3.7 Yağ asiti analizi amacıyla GC-MS’de kullanılan koşullar

3.2.6.3 Vitamin içerik analizi

Yağda ve suda çözünen vitaminlerin analizi Sıvı Kromatografi Üçlü Kütle Spektroskopisi/Likit Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi (LC-MS MS, Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Shimadzu LC-MS 8045, Japonya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). Mobil faz olarak gradient karışımla %

0.1'lik formik asitli su ve % 0.1'lik formik asitli metanol, kolon olarak da Inertsil Sustain marka C18 (Apoler; 50 mm x 2.1 mm x 1.8 µm boyutlarında) kullanılmıştır. Numuneler 0.22 µm nylon filtrelerden geçirilmiş, 10 µL enjeksiyon hacminde cihaza yüklenmiş ve standart karışımı ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Analiz kapsamında kullanılan diğer tüm koşullar Şekil 3.9'da sunulmuştur.



Şekil 3.8 Vitamin analizinde kullanılan LC-MS MS cihazı ve standardı

3.2.7 İstatistiksel analizler

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm aşamalar; iki bağımsız deney (biyolojik tekrar) ve 3 tekrarlı olacak şekilde (teknik tekrar) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (ONE WAY) (ANOVA), Dunnett's ve Tukey analizleri, SPSS sürüm 22.0 (IBM, New York, NY, ABD) ve GraphPad Prism v.3.0 (GraphPad Prism v.3.0, GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. *S. mutans* ATCC 25175 biyofilm oluşumunun optimizasyonu üzerindeki çevresel koşulların kümülatif etkilerinin tespiti için tek değişkenli (Univariate) analiz gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak sunulmuş ve anlamlı bir farkı belirtmek için $p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ olarak kullanılmıştır.

AutoPurge Baseline Check Parameters Comment

MS Interface Data Acquisition LC Time Prog. Pump Column Oven Controller Autosampler

Positive Negative End Time: 12.250 min MS Program Edit Valve and MS Program...

MRM(+) Product Ion Scan(+) Precursor Ion Scan(+) Neutral Loss Scan(+) SIM(+) Scan(+)

CID Gas CID Gas... Attenuation... Loop Time...

Type	Event#	+/-	Compound Name m/z	Time (0.000 min - 12.250 min)
MRM	1	+	B1 265.3000>122.1000	
MRM	2	+	B6 170.1000>134.0500	
MRM	3	+	B3 123.3000>80.1000, 124.10	
MRM	4	+	B5 220.3000>90.1500	
MRM	5	+	B12 678.5000>147.1000	
MRM	6	+	B2 377.2000>243.2000	
MRM	7	+	K3 173.1000>105.1000, 173.1	
MRM	8	+	K2 445.3000>187.1000, 445.3	
MRM	9	+	E Succinate 531.4000>165.30	
MRM	10	+	A 269.2000>92.9000	

MRM Acq. Time: 0 - 1.366 min Compound Name: B1

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msec)	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Ch1	265.3000	122.1000	330.0	-14.0	-15.0	-24.0
Ch2						
Ch3						
Ch4						

Event Time: 0.333 sec Q1 Resolution: Unit Advanced Settings...
Q3 Resolution: Unit

AutoPurge Baseline Check Parameters Comment

MS Interface Data Acquisition LC Time Prog. Pump Column Oven Controller Autosampler

Positive Negative End Time: 12.250 min MS Program Edit Valve and MS Program...

MRM(+) Product Ion Scan(+) Precursor Ion Scan(+) Neutral Loss Scan(+) SIM(+) Scan(+)

CID Gas CID Gas... Attenuation... Loop Time...

Type	Event#	+/-	Compound Name m/z	Time (0.000 min - 12.250 min)
MRM	6	+	B2 377.2000>243.2000	
MRM	7	+	K3 173.1000>105.1000, 173.1	
MRM	8	+	K2 445.3000>187.1000, 445.3	
MRM	9	+	E Succinate 531.4000>165.30	
MRM	10	+	A 269.2000>92.9000	
MRM	11	+	D2 397.5000>107.1000	
MRM	12	+	E1 431.4000>165.2000, 431.4	
MRM	13	+	D3 385.4000>367.2000, 385.4	
MRM	14	+	K1 451.5000>187.0000, 451.5	

MRM Acq. Time: 0 - 1.366 min Compound Name: B1

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msec)	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Ch1	265.3000	122.1000	330.0	-14.0	-15.0	-24.0
Ch2						
Ch3						
Ch4						


Şekil 3.9 Vitamin analizi amacıyla LC-MS MS’de kullanılan koşullar

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 İzolatların Tanımlanması

İzolatlara ait hücre yüzey proteinlerinin profillenmesi esasına dayanan MALDI-TOF analizi neticesinde elde edilen tanımlama sonuçları Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Mikrobiyal tanımlama için standart veri tabanı içeren Flex Control 3.4 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda 2.000’den büyük elde edilen skorlar tüm izolatlar için tür düzeyinde başarılı bir tanımlama yapıldığına işaret etmektedir.

Çizelge 4.1 MALDI-TOF analizi neticesinde izolatların tanımlama sonuçları

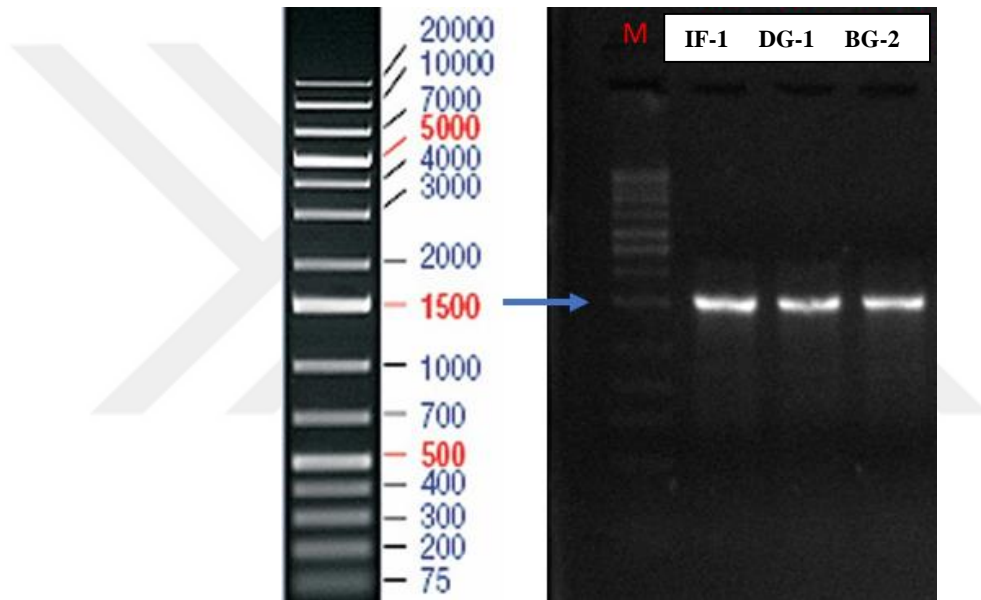
				
Suş Kodu	Kalite	Eşleşen patern	Skor sayısı	NCBI tanımlayıcı
EIR/IF-1	(+++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 2601	2.342	<u>1590</u>
EIR/DG-1	(+++)	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20499	2.319	<u>28038</u>
EIR/BG-2	(+++)	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20499	2.427	<u>28038</u>

MALDI-TOF analizi neticesine başarılı bir şekilde tanımlamaları gerçekleştirilen izolatların Uluslararası Gen Bankalarına kayıt edilebilmeleri için 16S rRNA gen bölgelerinin dizileri de belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle izolatların DNA’ları izole edilmiş olup, saflık ve miktar tayinleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur. 260_{nm}/280_{nm} oranının 1.8-2.0 arasında olması PZR için yeterli saflık olarak kabul edildiğinden ikinci aşama olarak PZR işlemine geçilmiştir. DNA izolasyonunu takiben evrensel 16S rRNA

primerlerinin kullanımı neticesinde 1492 bç büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.2 İzole edilen DNA'ların saflık ve miktar (ng/μL) tayinleri

Suş Kodu	ng/μL	260/280	260/230
EIR/IF-1	850.20	2.01	1.86
EIR/DG-1	780.25	1.95	1.91
EIR/BG-2	791.87	1.89	1.88



Şekil 4.1 İzolatlara ait 16S rRNA PZR ürününün (1492 bç) agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: marker)

Jelden saflaştırılarak dizi analizine tabi tutulan 16S rRNA bölgelerinin baz dizisi; ABI formatında elde edilmiş ve uygun bir yazılım aracılığıyla (FinchTV, Versiyon 1.5.0, Birleşik Devletler) kalitesi kontrol edildikten sonra yine aynı yazılım aracılığıyla BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritması kullanılarak nükleotid veri tabanındaki dizilerle kıyaslanmıştır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Saptanan “query” skorlarına göre 16S rRNA bölgeleri çoğaltılıp dizilenen izotların tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır. BLAST taraması her bir izolatta hem “forward” hem de “reverse” dizilerine göre yapılmıştır. “Forward” dizileri ve “reverse complement”i alınmış “reverse” dizisi Bioedit (Versiyon 7.2, Birleşik Devletler)

yazılımında birleştirilmiş ve bu birleştirmeden sonra elde edilen konsensüs dizileri NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde bilinen dizilerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen diziler ve benzerlik yüzdeleri içeren kesin tanı sonuçları Şekil 4.2-4.4’de sunulmuş olup MALDI-TOF sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Sequences producing significant alignments									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactiplantibacillus plantarum strain F.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2102	2102	100%	0.0	100.00%	1138	MW057714.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 2329 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1470	MT604787.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 4521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1461	MT545039.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 4288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1470	MT544832.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 3661 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1467	MT538526.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 7-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1474	MG890195.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 5-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1475	MG890193.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1471	MG890191.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain Sourdough_L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1467	MG754553.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain KLAB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1492	KM497502.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain K43121a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1488	KM497499.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain KLDS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1453	KR336551.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain Q1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1442	KP792280.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain DJ-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillus plantarum	2097	2097	100%	0.0	99.91%	1470	KF929420.1	

Şekil 4.2 Bebek fekal mikrobiyotasından izole edilen EIR/IF-1suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri

Sequences producing significant alignments									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Latilactobacillus curvatus strain EIR/DG-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2399	2399	100%	0.0	100.00%	1299	MW829515.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: qz1245	Latilactobacillus curvatus	2311	2311	99%	0.0	98.84%	1454	LC130555.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain 1123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2309	2309	99%	0.0	98.70%	1475	MT573613.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain TSGB1195 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2307	2307	99%	0.0	98.70%	1469	MN250808.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain GAN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2307	2307	99%	0.0	98.70%	1470	MH194558.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain L II 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2305	2305	99%	0.0	98.84%	1537	MH107109.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sakei strain GI59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus sakei	2305	2305	99%	0.0	98.77%	1392	MG430201.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain GI48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2305	2305	99%	0.0	98.77%	1447	MG430193.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sakei strain GI46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus sakei	2305	2305	99%	0.0	98.77%	1463	MG430191.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain KCCM200173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2305	2305	99%	0.0	98.77%	1477	MF992225.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: KH9	Latilactobacillus curvatus	2305	2305	99%	0.0	98.84%	1446	AB494734.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain 4376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2303	2303	99%	0.0	98.62%	1472	MT544912.1	

Şekil 4.3 Yunus bağırsak mikrobiyotasından izole edilen EIR/DG-1suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ▼ ?								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Latilactobacillus curvatus strain EIR/BG-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2307	2307	100%	0.0	100.00%	1249	MW829532.1
<input checked="" type="checkbox"/> Latilactobacillus curvatus strain EIR/DG-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2278	2278	99%	0.0	99.60%	1299	MW829515.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: qz1245	Latilactobacillus curvatus	2270	2270	99%	0.0	99.60%	1454	LC130555.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain 1123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2266	2266	99%	0.0	99.44%	1475	MT573613.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sakei strain GI59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus sakei	2266	2266	99%	0.0	99.52%	1392	MG430201.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain GI48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2266	2266	99%	0.0	99.52%	1447	MG430193.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus sakei strain GI46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus sakei	2266	2266	99%	0.0	99.52%	1463	MG430191.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain KCCM200173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2266	2266	99%	0.0	99.52%	1477	MF992225.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain 4376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2265	2265	99%	0.0	99.52%	1472	MT544912.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain 6697 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2265	2265	99%	0.0	99.52%	1474	MT463881.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain TSGB1195 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2265	2265	99%	0.0	99.44%	1469	MN250808.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus curvatus strain GAN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Latilactobacillus curvatus	2265	2265	99%	0.0	99.44%	1470	MH194558.1

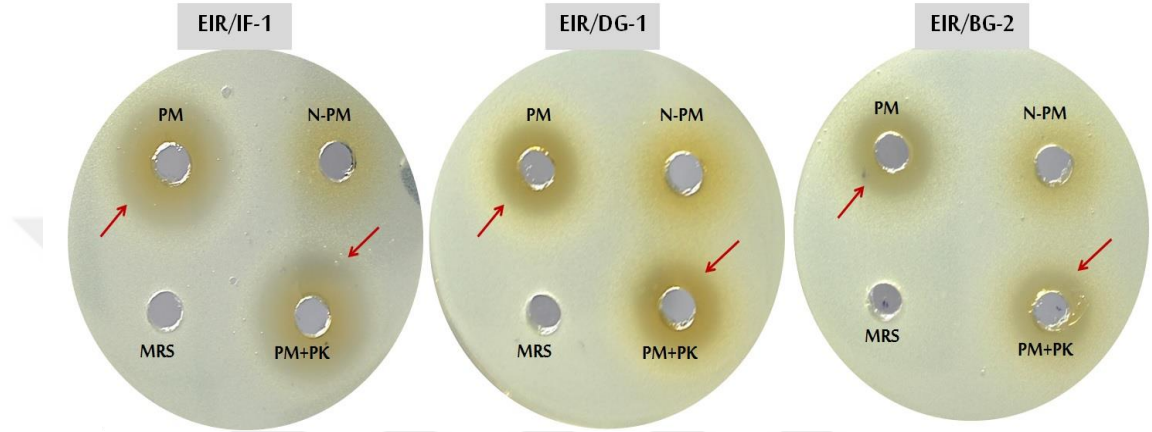
Şekil 4.4 Bal arısı bağırsak mikrobiyotasından izole edilen EIR/BG-2 suşuna ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI veri tabanında BLAST kullanımı neticesinde elde edilen benzerlik yüzdeleri

Sonuç olarak yeni doğan bebek fekal mikrobiyotasından izole edilen bakterinin *Lactobacillus plantarum* EIR/IF-1 (NCBI GenBank Aksesyon Numarası: MW892532), yunus bağırsak mikrobiyotasından izole edilen bakterinin *Lactobacillus curvatus* EIR/DG-1 (NCBI GenBank Aksesyon Numarası: MW829515) ve bal arısı bağırsak mikrobiyotasından izole edilen bakterinin de *Lactobacillus curvatus* EIR/BG-2 (NCBI GenBank Aksesyon Numarası: MW057714) olduğu belirlenmiş ve belirtilen aksesyon numaraları ile Uluslararası Gen Bankalarına kayıt işlemleri gerçekleştirilmiştir.

4.2 Post-Biyotik Mediatörlerin Antibakteriyel Aktiviteleri

Tez çalışması kapsamında seçilen üç adet laktik asit bakterisinin canlı hücrelerinde *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı gözlemlenen antibakteriyel aktivite, aynı bakterilerden elde edilen PM'lerin kullanımı neticesinde de tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon zonu 28 ± 1.7 mm ile *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM kullanıldığı zaman gözlemlenmiştir. *L. curvatus* EIR/DG-1 ve *L. curvatus* EIR/BG-2 suşlarının sergiledikleri inhibisyon zonları ise sırasıyla 21 ± 2.1 mm ve 18 ± 0.7 mm olarak belirlenmiştir. PM'lerin proteinaz K ile muameleleri neticesinde aktivitede

istatistiksel olarak anlamlı bir kayıp gözlenmez iken nötralizasyonu takiben tüm aktivitede kayıp tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı gözlemlenen antibakteriyel aktiviteden asit temelli yapıların sorumlu olabileceğine işaret etmektedir. Negatif kontrol olarak kullanılan MRS besiyerinde ise herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5).

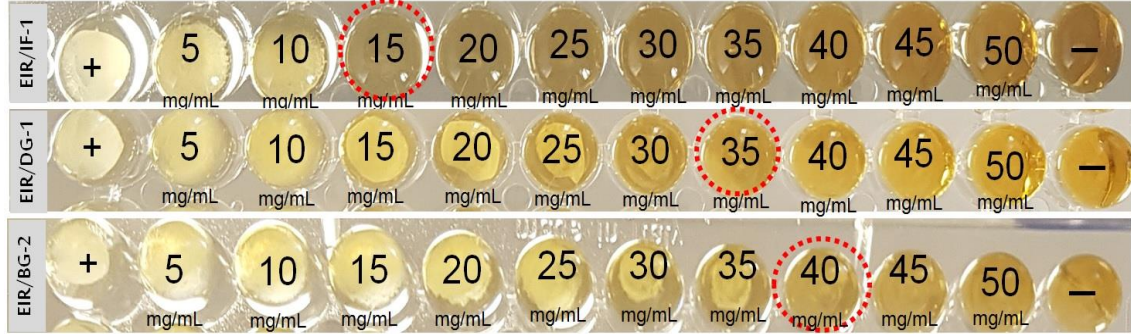


Şekil 4.5 *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı sergilenen antibakteriyel aktivitenin petri görüntüleri

(kuyu difüzyon yöntemi neticesinde elde edilen inhibisyon zonları; PM: post-biyotik mediatörler, N-PM: nötraliz PM, PM+PK: proteinaz K ile muamele edilen PM, MRS: besiyeri; oklar inhibisyon zonlarına işaret etmektedir)

Toz formda elde edilen PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı MİK dozları, 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarda 24 saat birlikte inkübasyon neticesinde belirlenmiştir. İnkübasyonu takiben 600_{nm} dalgaboyunda yapılan optik okumalar neticesinde en düşük MİK dozu *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait olan PM'de 15 mg/mL olarak belirlenmiştir. *L. curvatus* EIR/DG-1 ve *L. curvatus* EIR/BG-2 suşlarına ait PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı MİK değerleri ise sırasıyla 35 mg/mL ve 40 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bu aşamada ayrıca, farklı konsantrasyonlardaki PM'ler ile muameleyi takiben gerçekleştirilen mikrobiyolojik ekimler neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun canlılığındaki azalma (kob/mL) kontrole (10.61±0.19) kıyasla % olarak belirlenmiştir. Kontrole kıyasla 3 log düşüş sağlayan en düşük dozlar ise MBK olarak değerlendirilmiştir. En düşük MBK değeri *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait olan PM için 20 mg/mL (% 99.99 azalma ile 6.83 ± 0.02 kob/mL) olarak belirlenmiştir. *L. curvatus* EIR/DG-1 ve *L. curvatus* EIR/BG-2

suşlarının ait PM'lerin MBK değerleri ise sırasıyla 40 mg/mL (% 99.95 azalma ile 7.68 ± 0.03) ve 45 mg/mL (% 99.92 azalma ile 7.89 ± 0.09) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı sergilenen antibakteriyel aktivitenin 96 kuyucuklu mikrotitre plakadaki görüntüleri

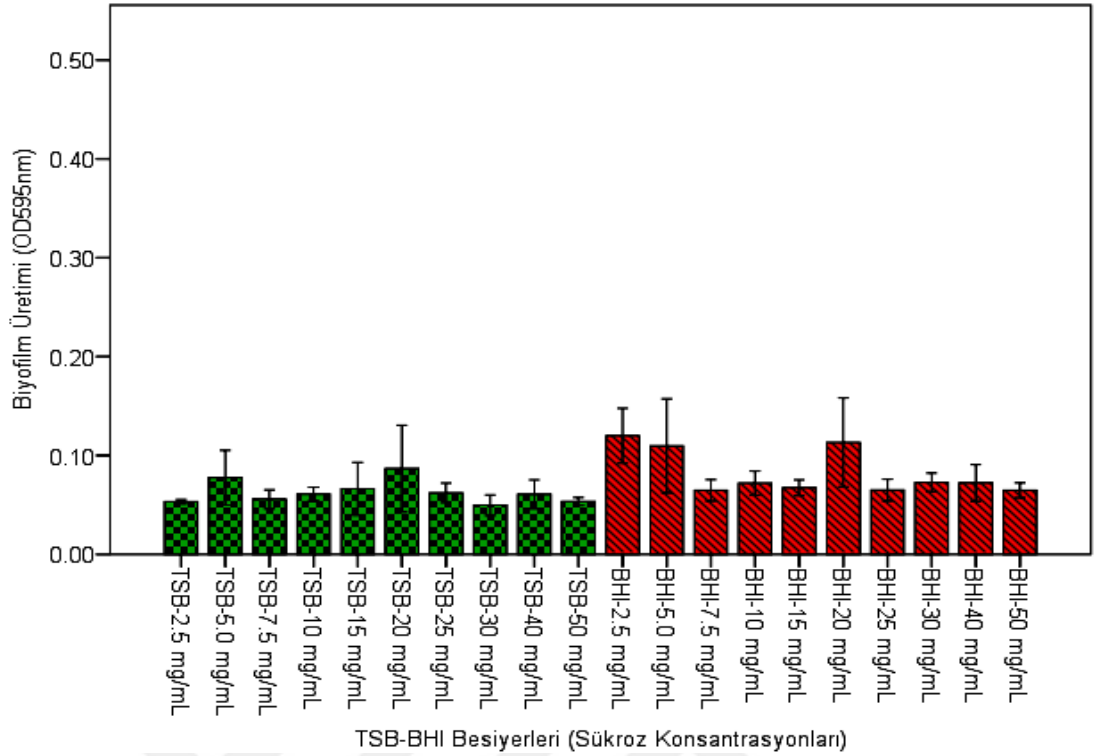
(kırmızı halkalar üremenin tespit edilmediği ilk kuyuyu; MIK-100 değerini işaret etmektedir)

4.3 Post-Biyotik Mediatörlerin Antibiyofilm Aktiviteleri

4.3.1 *S. mutans* ATCC 25175 suşunun ideal biyofilm üretim parametreleri

Biyofilm çalışmaları kapsamında öncelikle karyojenik patojen olarak seçilen *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üreticisi olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla *S. mutans* ATCC 25175 suşu, farklı konsantrasyonlarda sükröz (0.0-50 mg/mL) içeren BHI/TSB besiyerinde, aerobik/anaerobik ortamda, 30/37 °C inkübasyon sıcaklığında ve 24/48 saat inkübasyon süresinde kültüre edilmiş ve ideal biyofilm üretim koşulları belirlenmiştir.

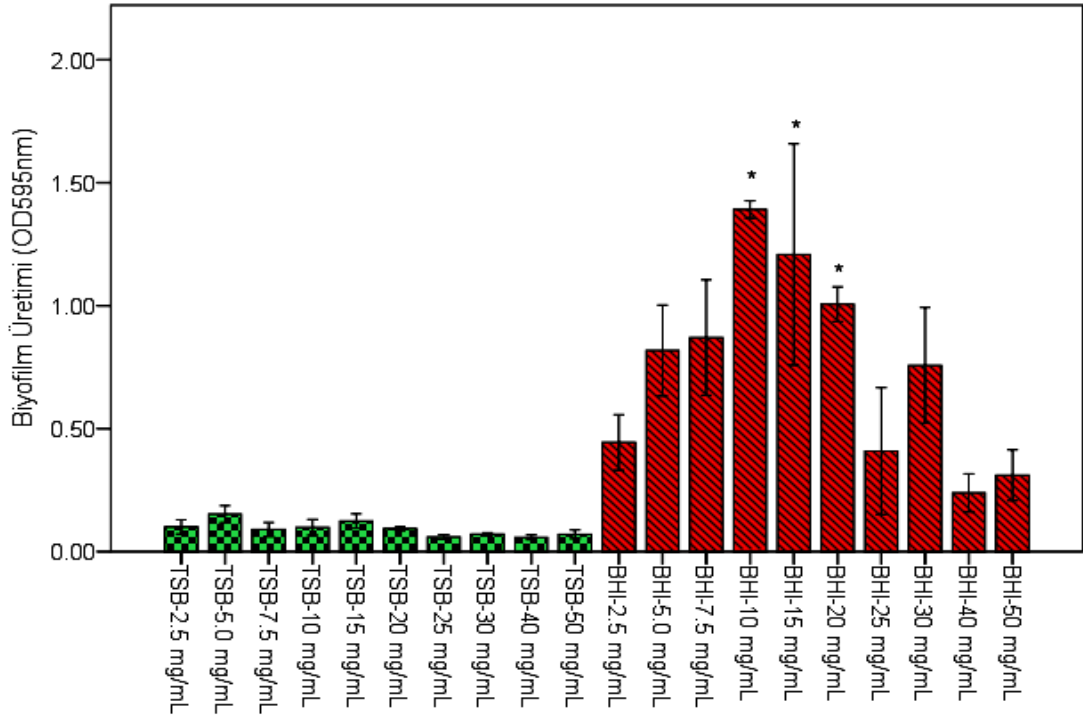
Aerobik gelişim koşulları altında farklı konsantrasyonlarda sükröz şekeri içeren TSB ve BHI besiyerinde 24 saat inkübasyon neticesinde bu gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamış olup (One WAY ANOVA, Tukey's Test) oldukça zayıf biyofilm üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Aerobik koşullar altında iki farklı besiyerinde (TSB-BHI) ve farklı sükröz konsantrasyonlarında *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi

Anaerobik gelişim koşulları altında farklı konsantrasyonlarda sükröz şekeri içeren TSB ve BHI besiyerinde 24 saat inkübasyon neticesinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmış olup (One WAY ANOVA, Tukey's Test, $p < 0.05$) güçlü biyofilm üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Elde edilen sonuçlara göre anaerobik gelişim koşullarında en güçlü biyofilm üretimi BHI besiyerinde 10, 15 ve 20 mg/mL sükröz katkıları neticesinde elde edilmiştir. Bu üç katkı arasında ise istatistiksel olarak anlamda bir fark tespit edilememiştir. Bu aşamayı takiben, BHI besiyeri ve anaerobik koşulların kullanılmasına karar verilmiştir.

İdeal gelişim koşulu olarak seçilen anaerobik koşullar altında, inkübasyon süresinin (24-48 saat), sıcaklığının (30-37 °C) ve farklı sükröz konsantrasyonlarının (0.0-50 mg/mL) *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimine olan etkileri "Univariate" analizi ile değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3). Kümülatif bir değerlendirme yapıldığında inkübasyon süresinin tek başına anlamlı bir katkısının olmadığı, ancak inkübasyon sıcaklığı ve sükröz katkısının biyofilm üretimini tek başına anlamlı düzeyde etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.9).

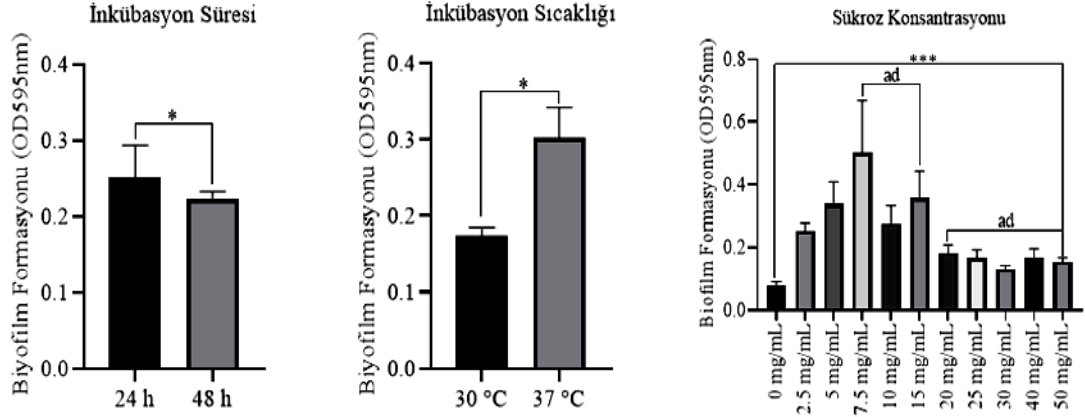


Şekil 4.8 Anerobik koşullar altında iki farklı besiyerinde (TSB-BHI) ve farklı sükroz konsantrasyonlarında *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi

Çizelge 4.3. Üç farklı parametrenin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan etkisi (Univariate analizi)

Biyofilm üretimi OD:595 _{nm}					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.411 ^a	43	.149	8.280	.000
Intercept	7.453	1	7.453	413.913	.000
İnkübasyon süresi	.027	1	.027	1.500	p < 0.05
İnkübasyon sıcaklığı	.544	1	.544	30.211	p < 0.05
Sükroz Konsantrasyonu	1.827	10	.183	10.146	p < 0.001
Süre * Sıcaklık	.933	1	.933	51.799	p < 0.05
Süre * Sükroz Konsantrasyonu	.928	10	.093	5.152	p < 0.01
Sıcaklık * Sükroz Konsantrasyonu	1.094	10	.109	6.077	p < 0.01
Süre * Sıcaklık * Sükroz Konsantrasyonu	1.059	10	.106	5.879	p < 0.01
Error	1.585	88	.018		
Total	15.449	132			
Corrected Total	7.996	131			

Kümülatif etki



Şekil 4.9 İdeal biyofilm oluşumunda inkübasyon süresi ve sıcaklığı ile sükroz konsantrasyonunun kümülatif etkilerinin değerlendirilmesi (ad; anlamlı olmayan fark)

4.3.2 PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine etkisi

Biyofilm çalışmalarının ikinci aşamasında farklı MİK değerlerine ayarlanmış (MİK 100, 75, 50, 25, 10, 1) PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan etkileri; birlikte inkübasyon, eradikasyon ve ön muamele analizleri kapsamında değerlendirilmiştir. 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarda kristal viyole boyama esasına göre gerçekleştirilen birlikte inkübasyon analizleri neticesinde *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin MİK-25 ve üzeri dozlarının *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimini kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$, Şekil 4.10).

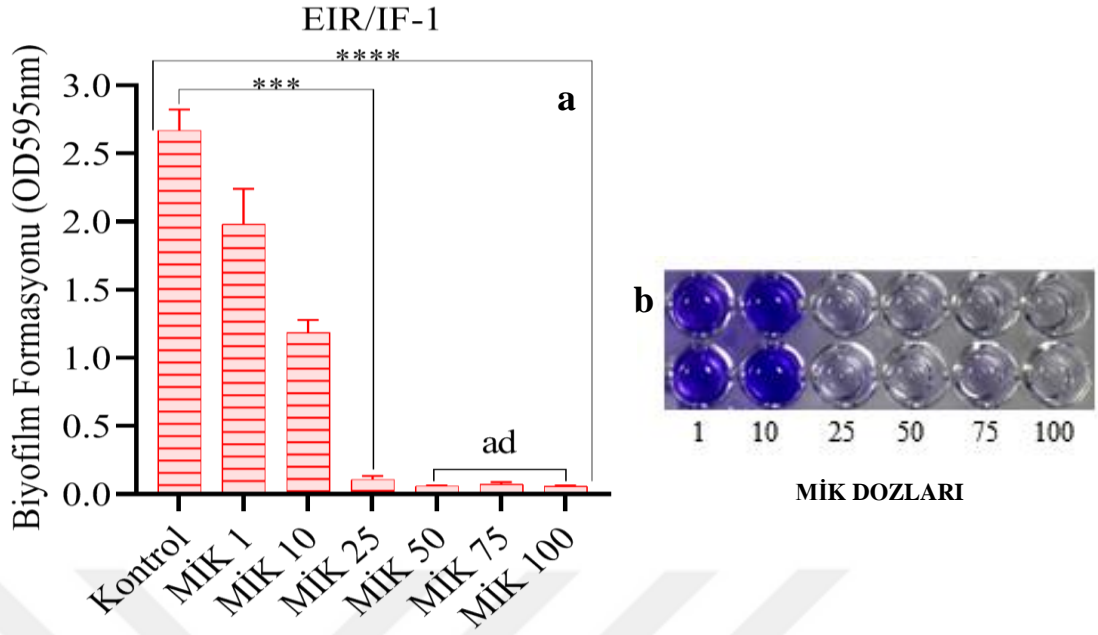
Sonuçlar *L. curvatus* EIR/DG-1 ve *L. curvatus* EIR/BG-2 suşuna ait PM'lerin etkisi değerlendirildiğinde ise MİK-10 ve üzeri dozlarının *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$, Şekil 4.11 ve 4.12). Ön muamele analizlerinde ise en etkin sonuçlar *L. curvatus* EIR/BG-2 suşuna ait PM'de elde edilirken, *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin MİK-50 ve üzeri dozlarının, *L. curvatus* EIR/BG-2 suşuna ait PM'lerin ise

MİK-25 ve üzeri dozlarının *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$, Şekil 4.13-4.15).

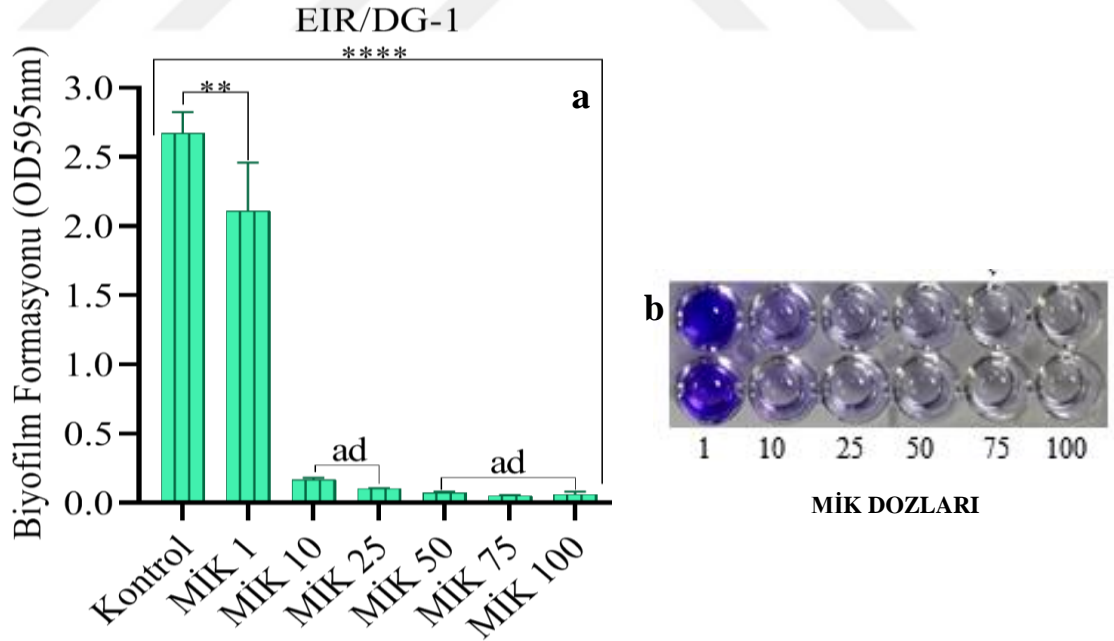
Çalışma kapsamında üç farklı yaklaşımla değerlendirilen PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm giderimleri üzerindeki % azalma sonuçları ise Çizelge 4.4 'de sunulmuştur. EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin, diğer iki PM'ye kıyasla oluşan biyofilmin yok edilmesinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak eradikasyon yaklaşımı açısından PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm giderimleri üzerinde diğer yaklaşımlara göre nispeten etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin, birlikte inkübasyon ve ön muamele analiz sonuçlarına göre en etkili PM olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm giderimi üzerine PM'lerin etkisi (% giderim)

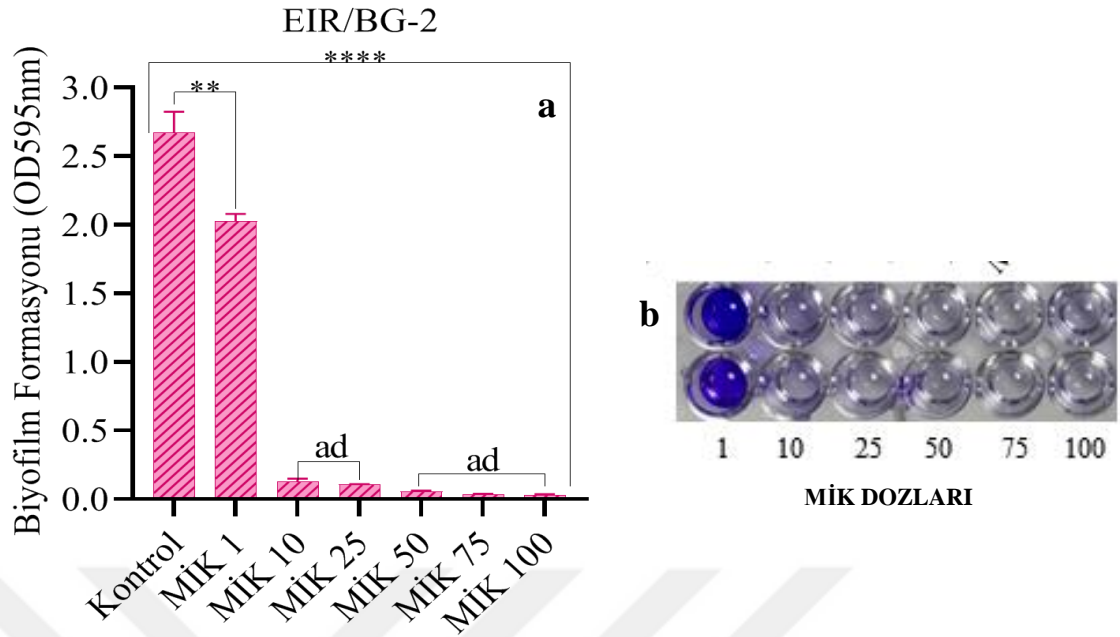
Birlikte İnkübasyon						
Suş Kodu	MIK-1	MIK-10	MIK-25	MIK-50	MIK-75	MIK-100
EIR/IF-1	28.59±2.99	56.10±3.98	96.02±1.91	100	100	100
EIR/DG-1	30.69±3.12	93.74±0.92	96.20±0.32	100	100	100
EIR/BG-2	24.90±3.76	95.20±1.38	96.11±0.25	100	100	100
Ön-muamele						
Suş Kodu	MIK-1	MIK-10	MIK-25	MIK-50	MIK-75	MIK-100
EIR/IF-1	5.86±1.44	7.07±1.26	57.70±1.76	93.69±2.50	95.33±1.10	97.85±0.44
EIR/DG-1	0	19.22±1.26	94.31±1.00	95.30±3.35	93.72±0.78	97.73±0.52
EIR/BG-2	0	93.47±3.40	96.96±2.28	97.54±0.74	95.84±1.37	95.76±1.24
Eradikasyon						
Suş Kodu	MIK-1	MIK-10	MIK-25	MIK-50	MIK-75	MIK-100
EIR/IF-1	39.75±1.99	41.25±1.8	51.67±3.67	48.33±4.84	61.92±3.61	69.08±3.47
EIR/DG-1	51.50±3.51	49.50±4.20	62.00±4.88	63.25±4.08	73.75±2.62	75.83±3.20
EIR/BG-2	31.25±2.89	34.25±2.93	36.33±1.62	46.58±2.18	48.50±3.36	66.92±1.22



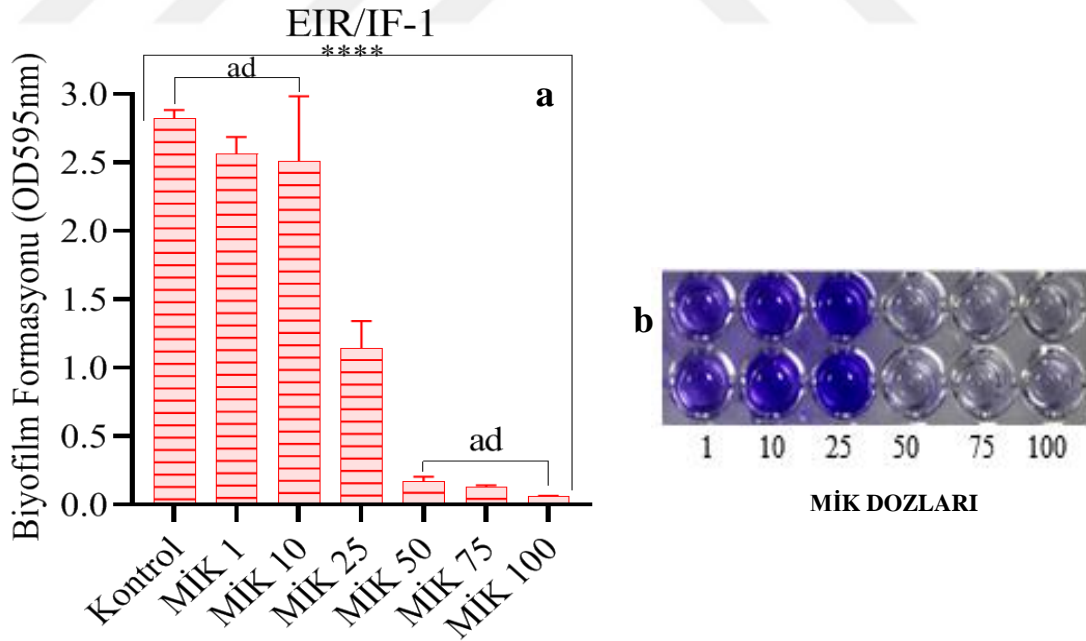
Şekil 4.10 a. *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$; *** $p<0.005$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi



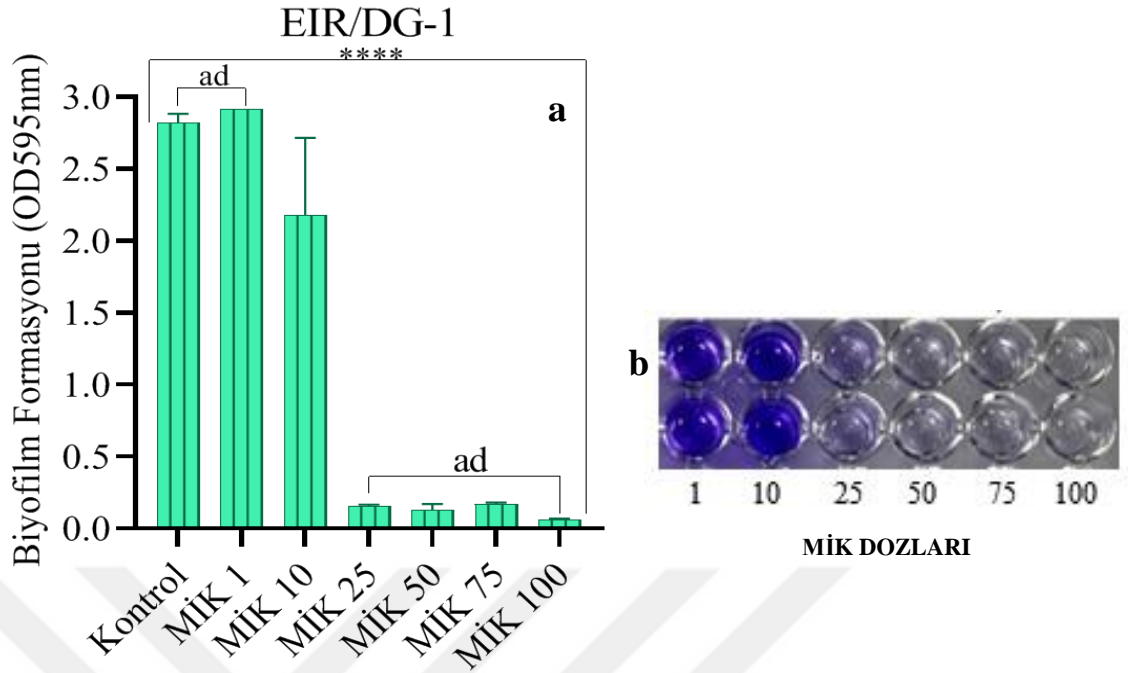
Şekil 4.11 a. *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$, ** $p<0.01$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi



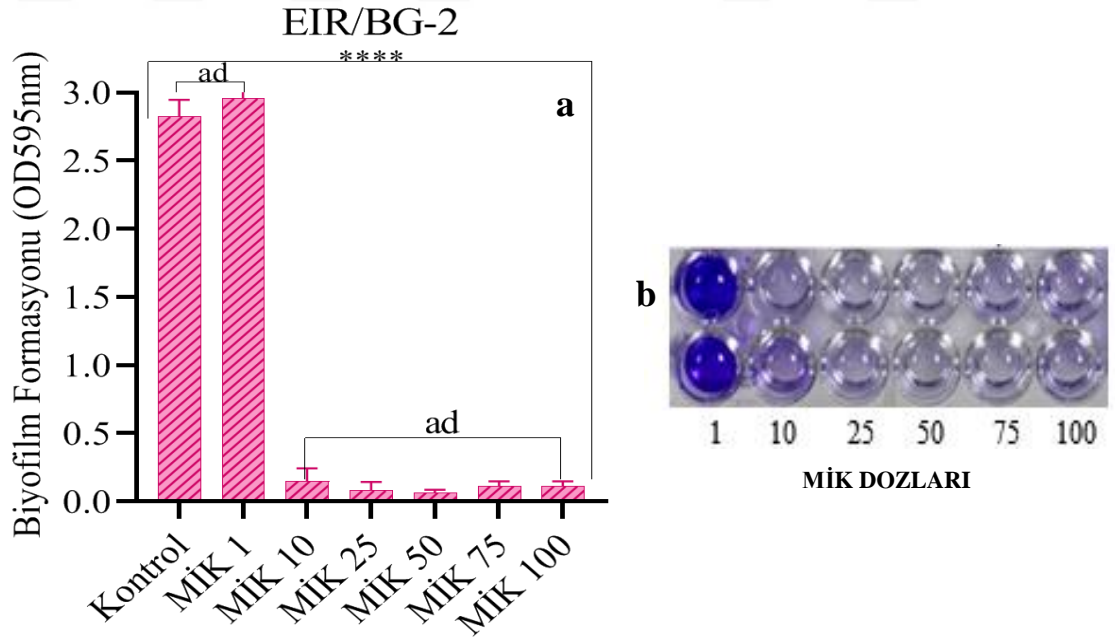
Şekil 4.12 a. *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının birlikte inkübasyon neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$; ** $p<0.01$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi



Şekil 4.13 a. *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p<0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi

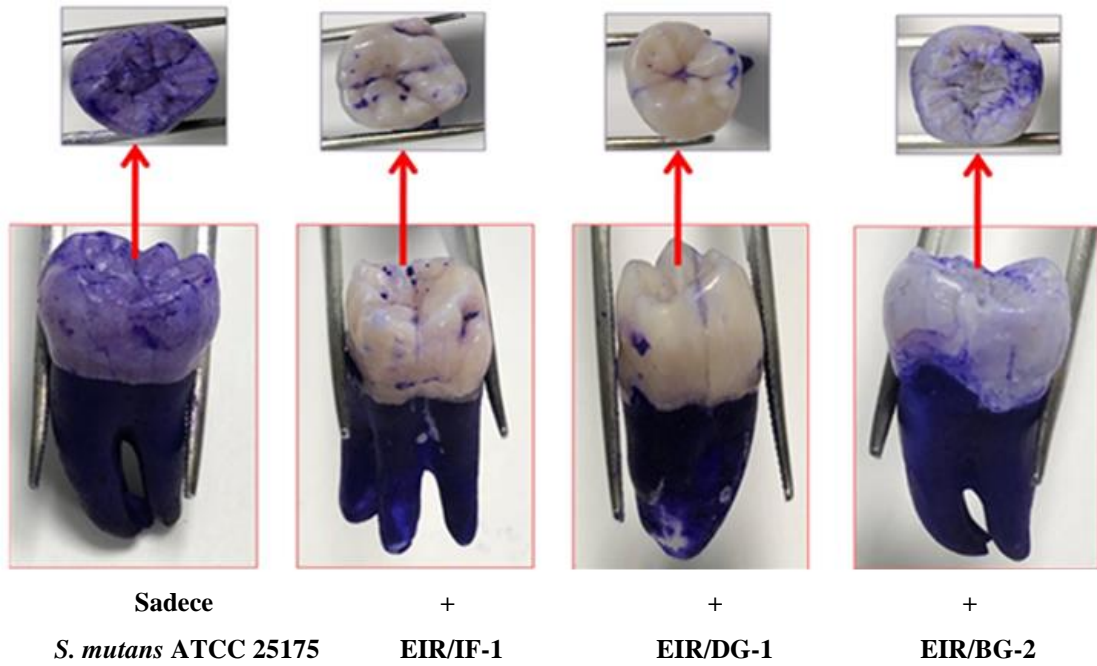


Şekil 4.14 a. *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p < 0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi



Şekil 4.15 a. *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin farklı MİK dozlarının ön-muamele neticesinde *S. mutans* ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi üzerine olan ekisi (birlikte inkübasyon; ad. anlamlı olmayan fark; **** $p < 0.001$), b. Polistiren mikrotitre plaka kuyularında kristal viyole boyama esasına göre biyofilm giderimi

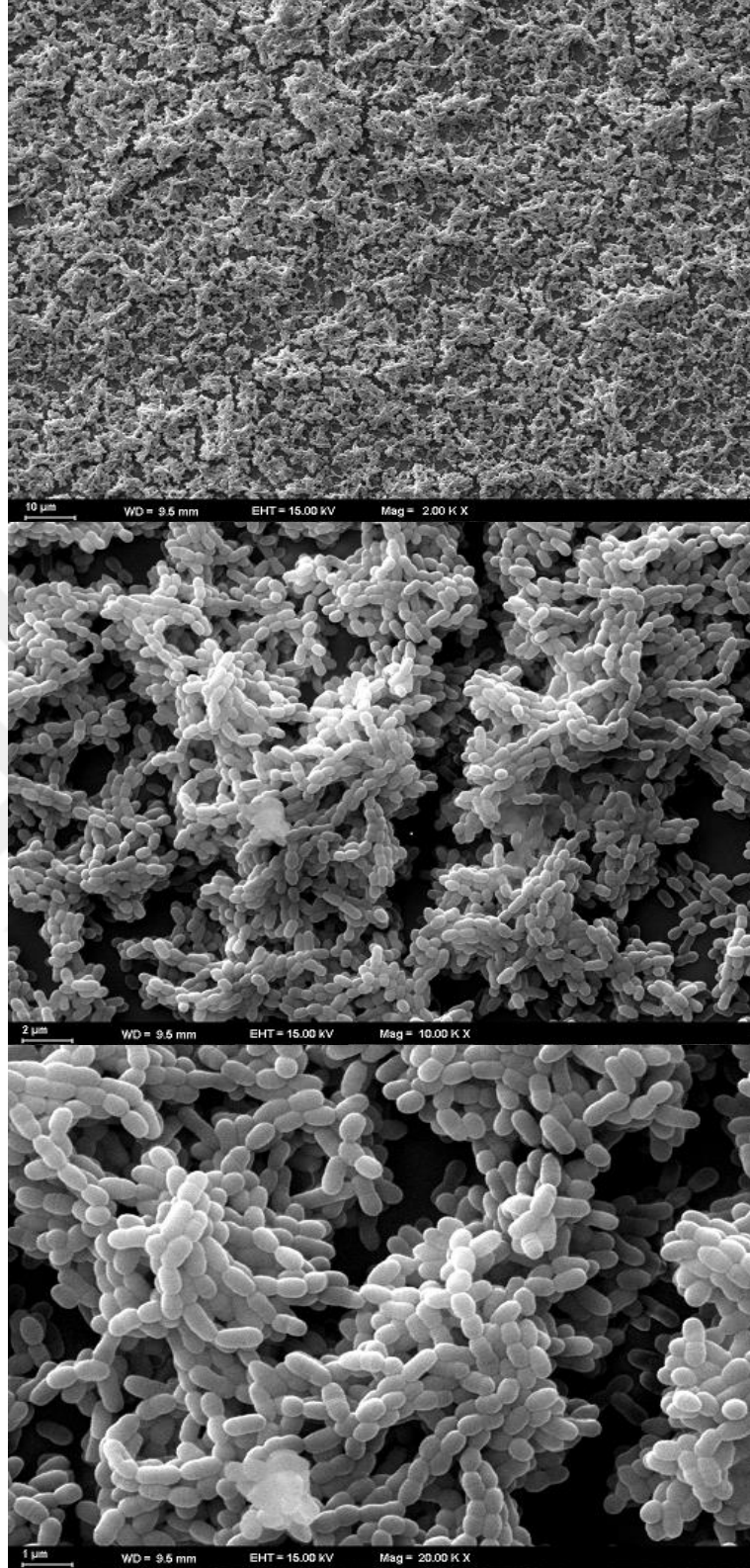
Tüm bu analizler neticesinde en başarılı giderim sonuçları, birlikte inkübasyon yaklaşımı neticesinde elde edilmiştir. PM'lerin biyofilm giderici özelliğinin sadece mikrotitre plakalarında sınırlı olmadığını kanıtlamak için en etkin seçilen bu yöntem diş yüzeylerinde de tekrarlanmıştır. MİK-50 ve MİK-25 konsantrasyonlarındaki PM'ler diş yüzeyinde *S. mutans* ATCC 25175 suşu birlikte inkübe edilmiş ve antibiyofilm etkinlik kristal viyole bağlanma esasına göre değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol diş yüzeyindeki biyofilm tabakasına kıyasla PM'ler ile muamele edilen dişlerin yüzeyinde oluşan biyofilm tabakalarında gözle görülen bir azalma oluğu belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Bakterilere ait PM'lerin sub-MİK (MİK-50) dozlarının *S. mutans* ATCC 25175 suşunun diş yüzeyinde oluşturduğu biyofilm üzerine olan etkisini gösteren kristal viyole boyama sonuçları

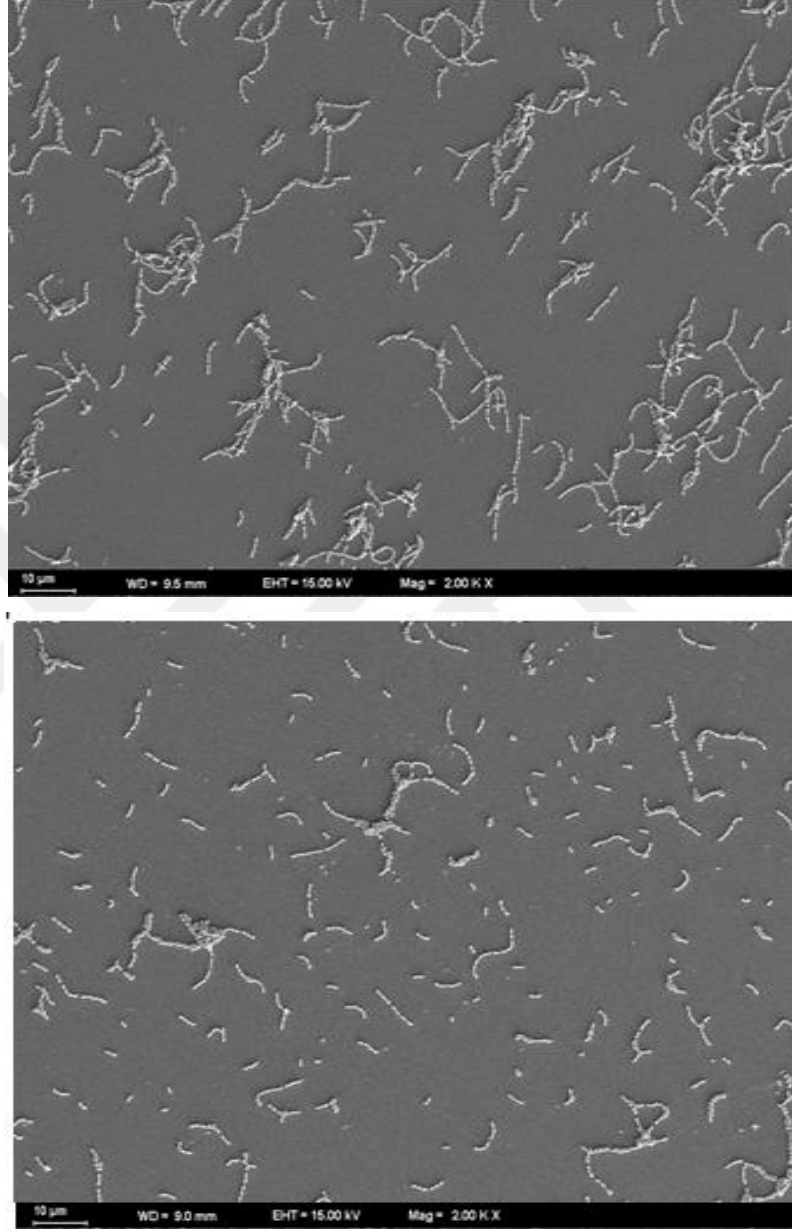
4.3.3 *S. mutans* ATCC 25175 suşunun üretmiş olduğu biyofilmin ve PM'lerin antibiyofilm etkisinin SEM ile değerlendirilmesi

Streptococcus mutans ATCC 25175 suşunun biyofilm üretimi SEM ile incelendiğinde, hücrelerin çok katmanlı agregatlar halinde ekstrasellüler matriks içerisinde kümelendiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).

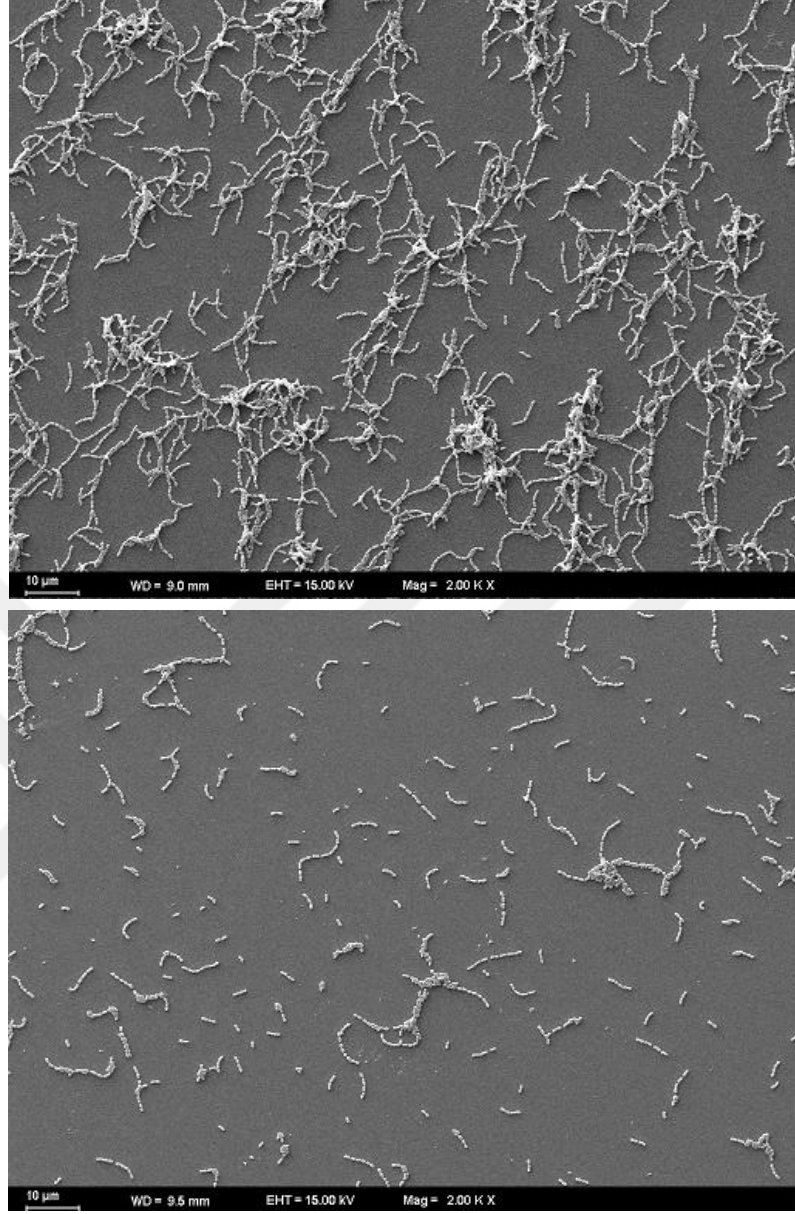


Şekil 4.17 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşunun ideal koşullara biyofilm üretiminin farklı büyütmelerdeki SEM mikrografları

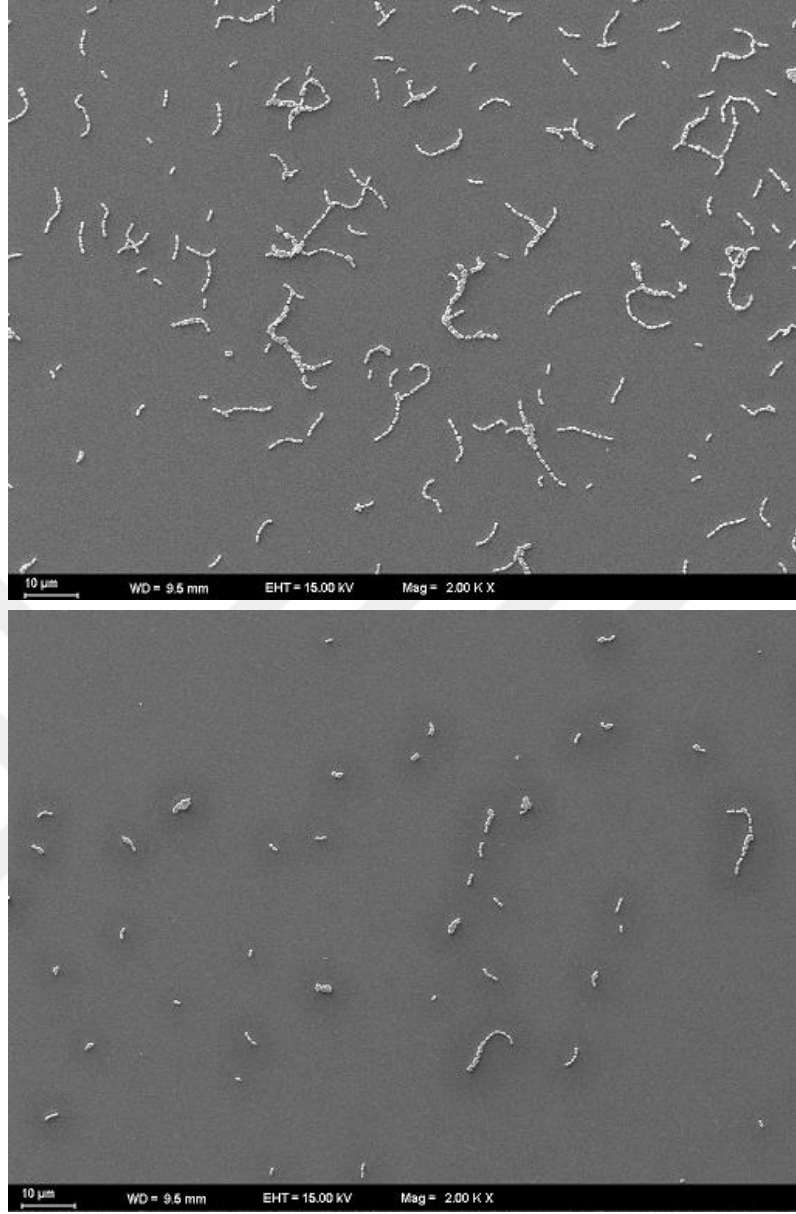
PM'ler ile birlikte muameleyi takiben ise hücrelerin daha düşük yoğunluğa ulaştıkları, biyofilm tabakasının ise oldukça incelmişti tespit edilmiştir (Şekil 4.18-4.20).



Şekil 4.18 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan etkisini gösteren SEM mikrografları



Şekil 4.19 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan ekisini gösteren SEM mikrografları

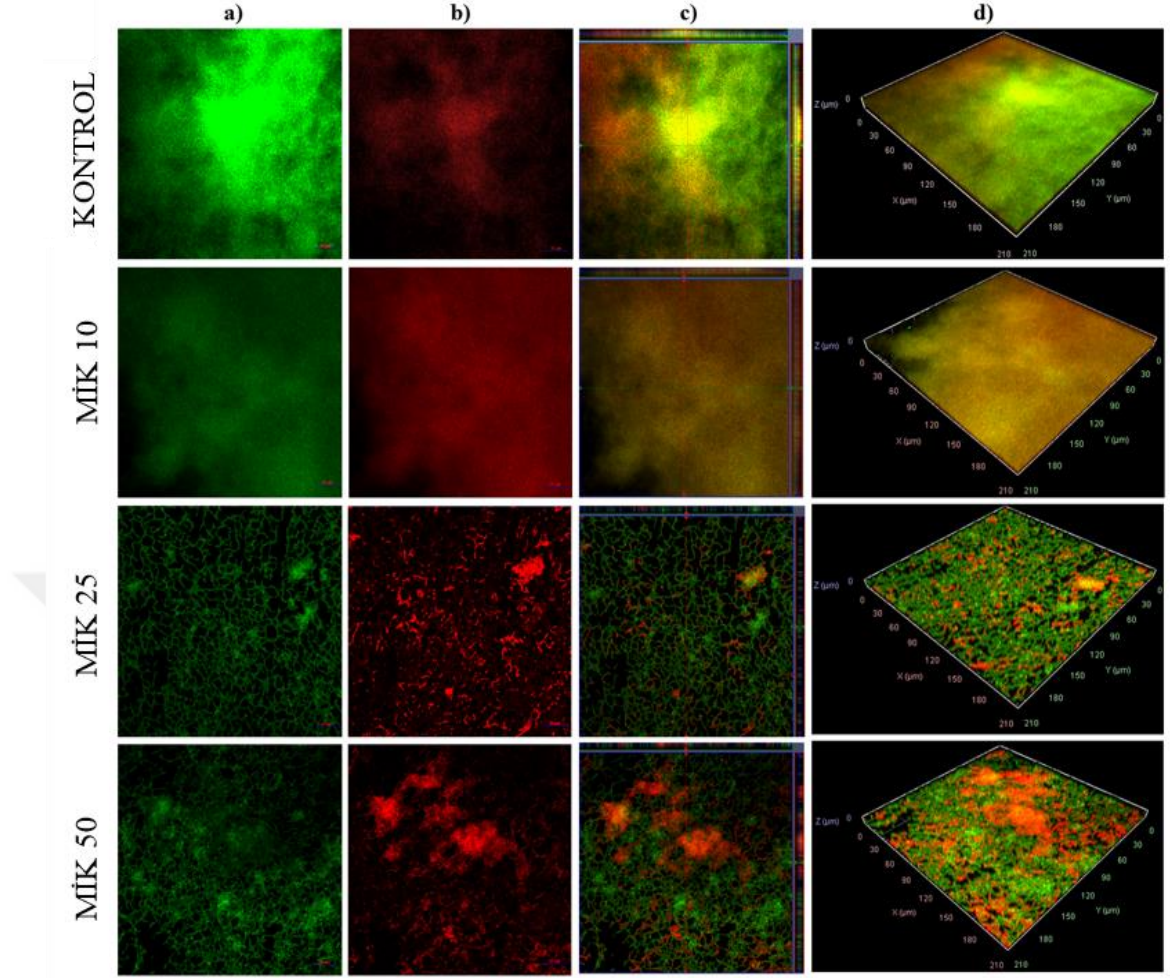


Şekil 4.20 *L. curvatus* EIR/BG-2 suşu tarafından üretilen PM'nin biyofilm üretimi üzerine olan ekisini gösteren SEM mikrografları

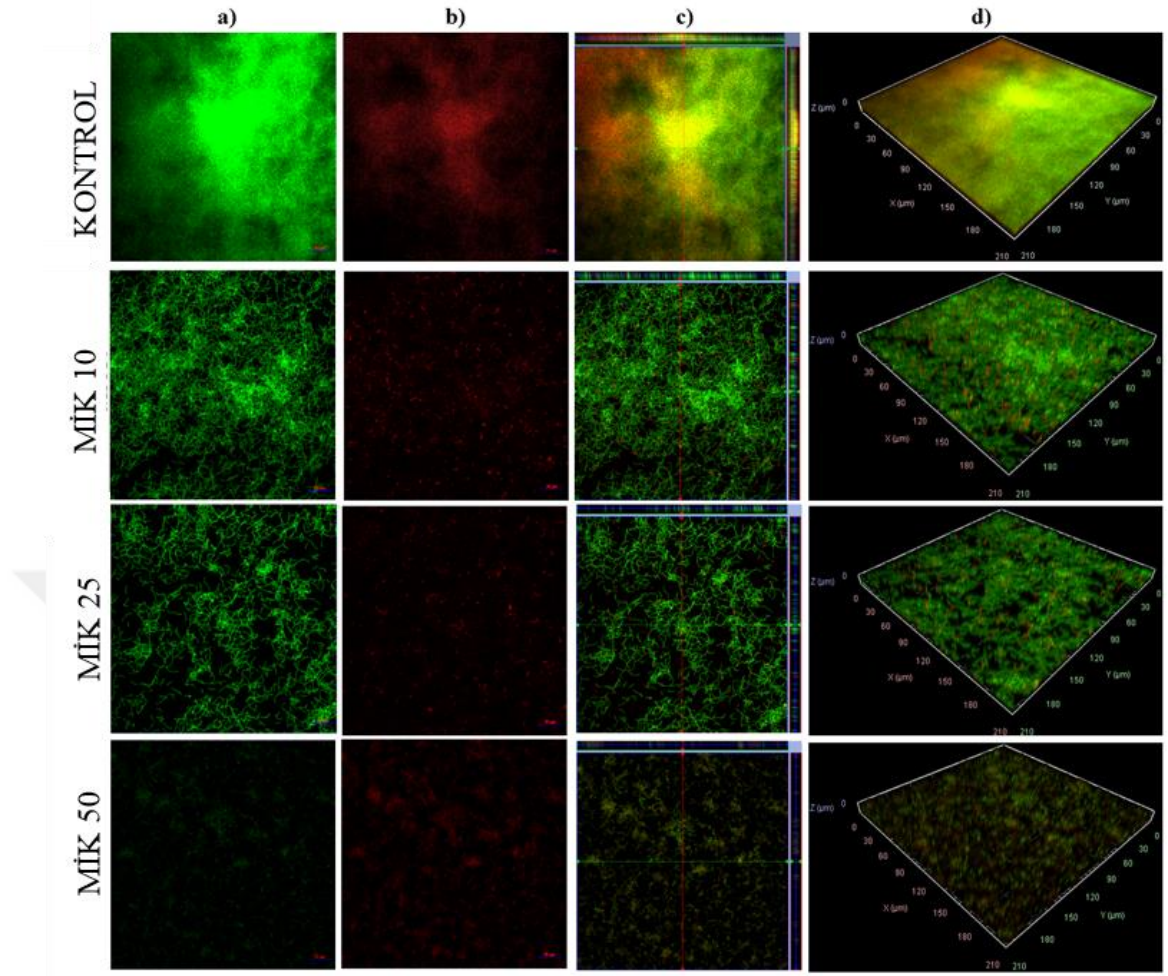
4.3.4 *S. mutans* ATCC 25175 suşunun üretmiş olduğu biyofilmin ve PM'lerin antibiyofilm etkisinin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile değerlendirilmesi

PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşu ile 24 saat birlikte inkübasyonunun patojen suşun hücre canlılığı ve biyofilm oluşturma yeteneği üzerine olan etkisi Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop kullanılarak da incelenmiş ve canlı/ölü hücre yoğunlukları, pozisyonları ve biyofilm morfolojileri değerlendirilmiştir. PM ile muamele edilmeyen örneklerde SYTO-9 pozitif (yeşil/canlı) *S. mutans* bakteri hücrelerinin baskın olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21a, 4.22a, 4.23a, panellerin ilk seti). Farklı dozlarda PM'ler ile birlikte inkübasyonun ardından ise doza bağlı olarak PI pozitif (kırmızı/ölü) hücrelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 4.21b, 4.22b, 4.23b). İki boyutlu (Şekil 4.21c, 4.22c, 4.23c) ve üç boyutlu (Şekil 4.21d, 4.22d, 4.23d) biyofilm yapıları incelendiğinde ise PM'lerle birlikte inkübasyonun artan MİK konsantrasyonları ile birlikte biyofilm oluşumunda dikkate değer bir inhibisyona yol açtığı ve biyofilm yapısının incelendiği doğrulanmıştır.

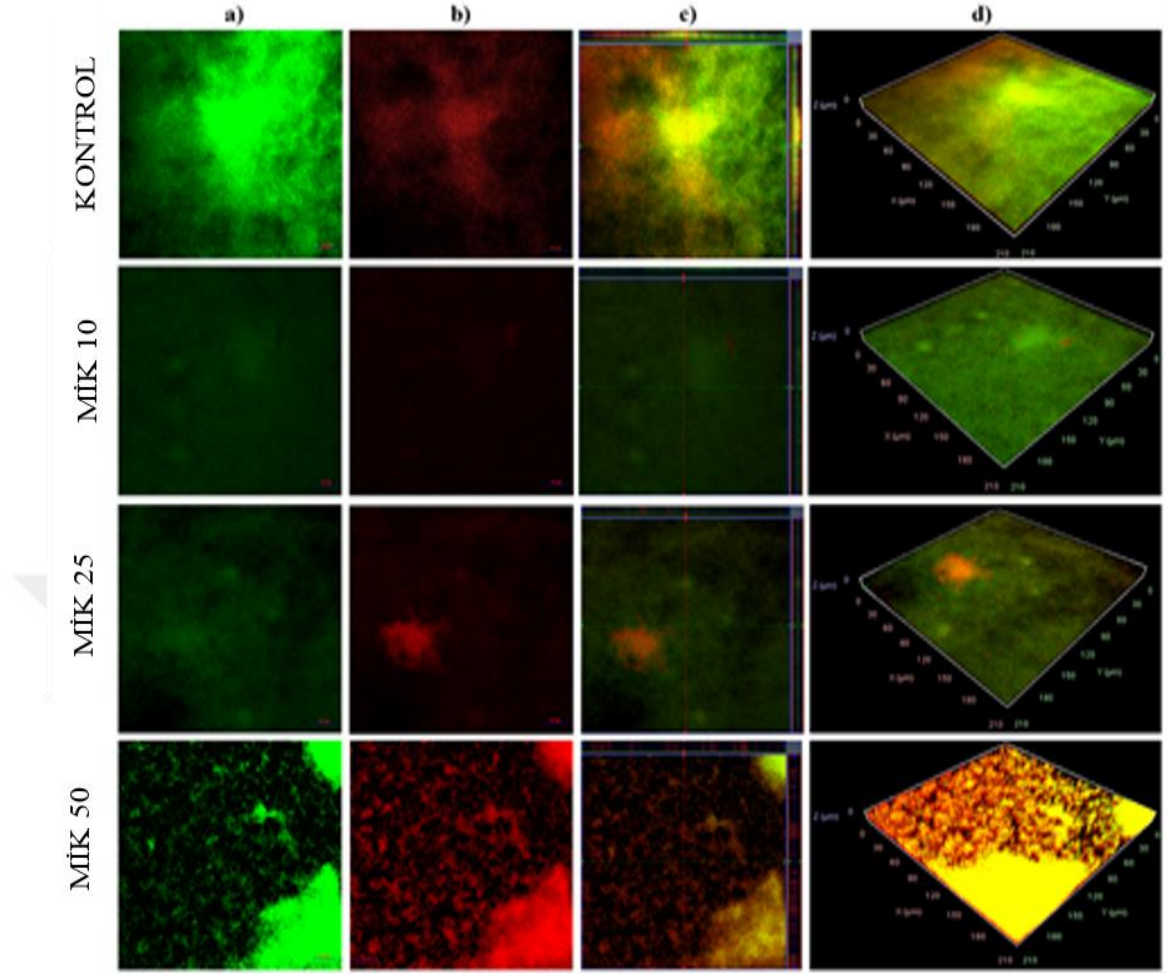
Diş yüzeyinde gerçekleştirilen benzer çalışmadan elde edilen veriler neticesinde ise, EIR/BG-2'den elde edilen PM haricinde diğer PM'lerin sub-MİK değerleri ile birlikte muamelesi sonucunda diş yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin neredeyse yok olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).



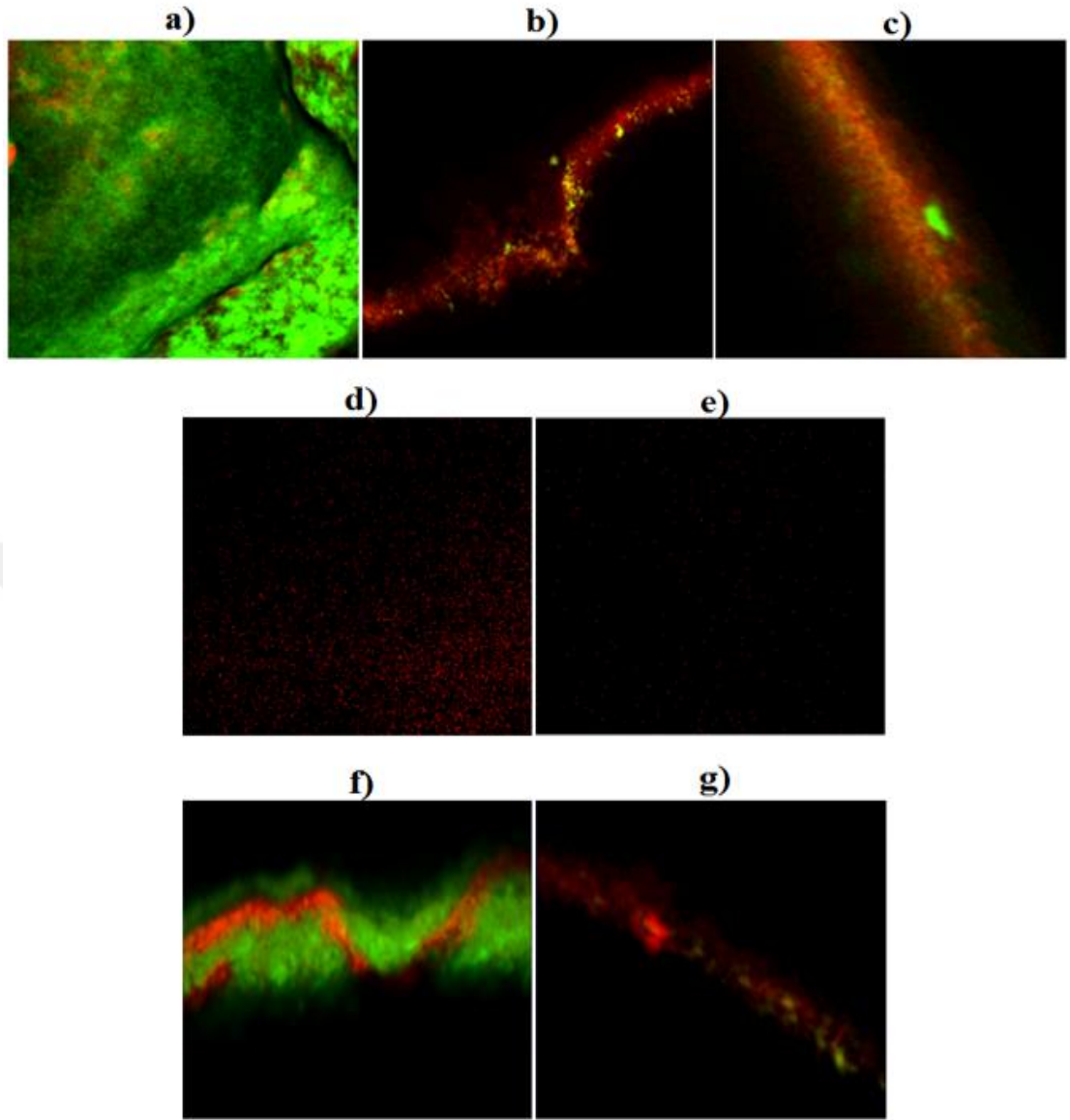
Şekil 4.21 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri a) SYTO 9 2D görünümü, b) PI 2D görünümü, c) örtüşen 2D görünüm, d) biyofilmlerin 3D mimarisi



Şekil 4.22 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri a) SYTO 9 2D görünümü, b) PI 2D görünümü, c) örtüşen 2D görünüm, d) biyofilmlerin 3D mimarisi



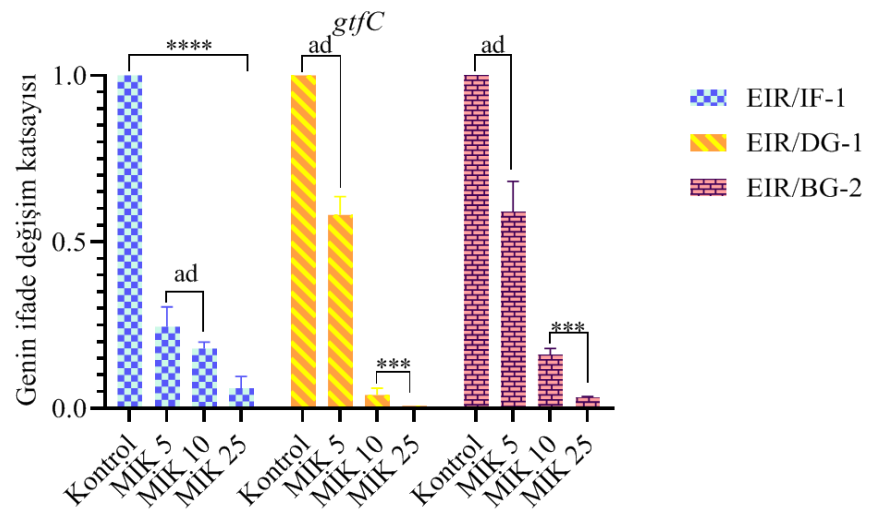
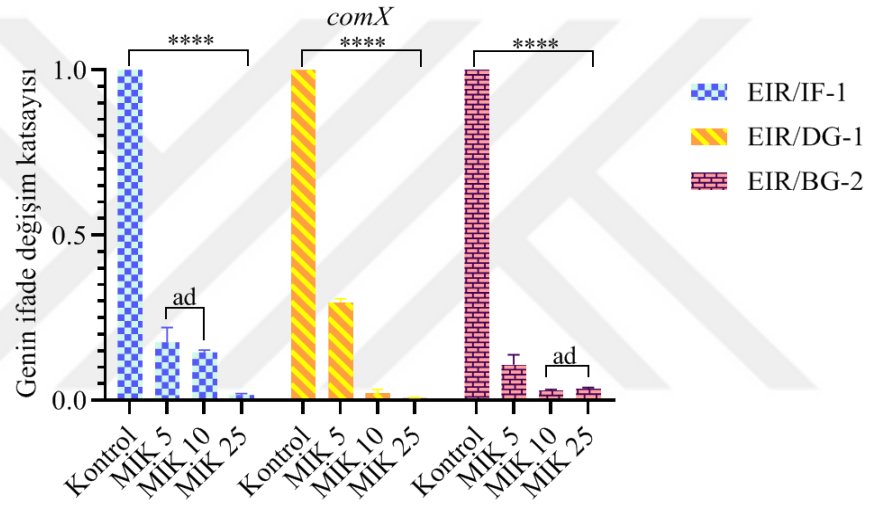
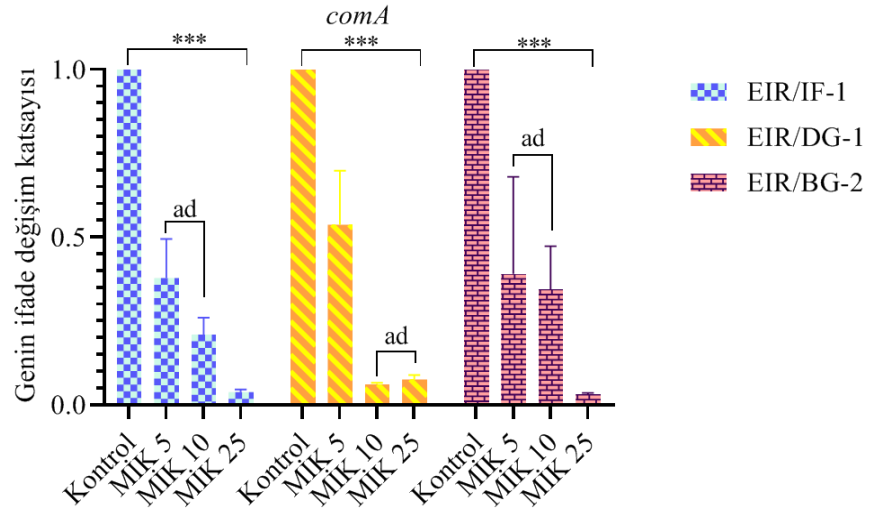
Şekil 4.23 *L. curvatus* EIR/BG-2 suşundan elde edilen PM'nin farklı MİK konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda (kontrol) oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri a) SYTO 9 2D görünümü, b) PI 2D görünümü, c) örtüşen 2D görünüm, d) biyofilmlerin 3D mimarisi



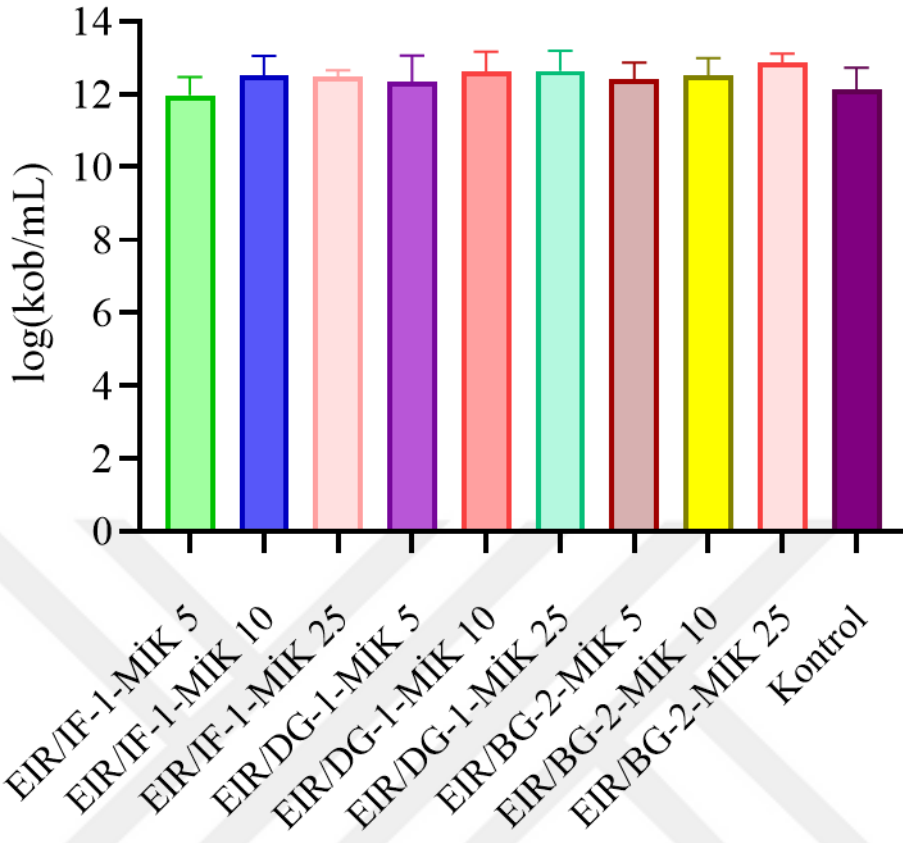
Şekil 4.24 PM'lerin sırasıyla MİK-50 ve MİK-75 konsantrasyonları ile birlikte inkübasyon sonucunda oluşan biyofilmin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntüleri a) PM içermeyen kontrol, b ve c) *L. plantarum* EIR/IF-1, d ve e) *L. curvatus* EIR/DG-1, f ve g) *L. curvatus* EIR/BG-2

4.3.5 PM'lerin *S. mutans* ATCC 25175 suşunun QS ve virülans ilişkili gen ifadesi üzerine etkisi

Yetersayı sinyal iletim sistemi ve virülans ile ilgili gen ifade seviyesini analiz etmek için, kantitatif RT-PZR analizi gerçekleştirilmiş ve ifadelerin kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kullanılarak belirlenmiştir. *S. mutans* ATCC 25175 suşunun farklı PM dozları ile birlikte inkübasyonunu takiben, *comA*, *comX* ve *gtfC*'nin ifade seviyeleri PM'ler ile muamele edilmeyen kontrol grupları ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak önemli ölçüde aşağı regüle olmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 4.25). MİK-25 dozları kullanıldığında ise her genin ifade seviyelerinde dramatik bir düşüş gözlemlenmiştir. EIR/DG-1 ve EIR/BG-2'den elde edilen PM'lerin düşük konsantrasyonları (MİK-5) ile muameleyi takiben sadece *gtfC* geninin ifade seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde değişmemiştir ($p > 0.05$). Hedef genlerin aşağı regülasyonuna neden olan PM dozlarının hücre canlılığı üzerinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı da tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Bu sonuç, üç suştan elde edilen PM'lerin ölümcül olmadığı durumlarda dahi *S. mutans* ATCC 25175 suşunun yetersayı sinyal iletim sistemini (QS) dolaylı olarak bloke edebildiğini göstermiştir.



Şekil 4.25 Gen ifadelerinin değişim katsayıları
(ad. anlamlı olmayan fark, **** $p < 0.001$; *** $p < 0.01$)



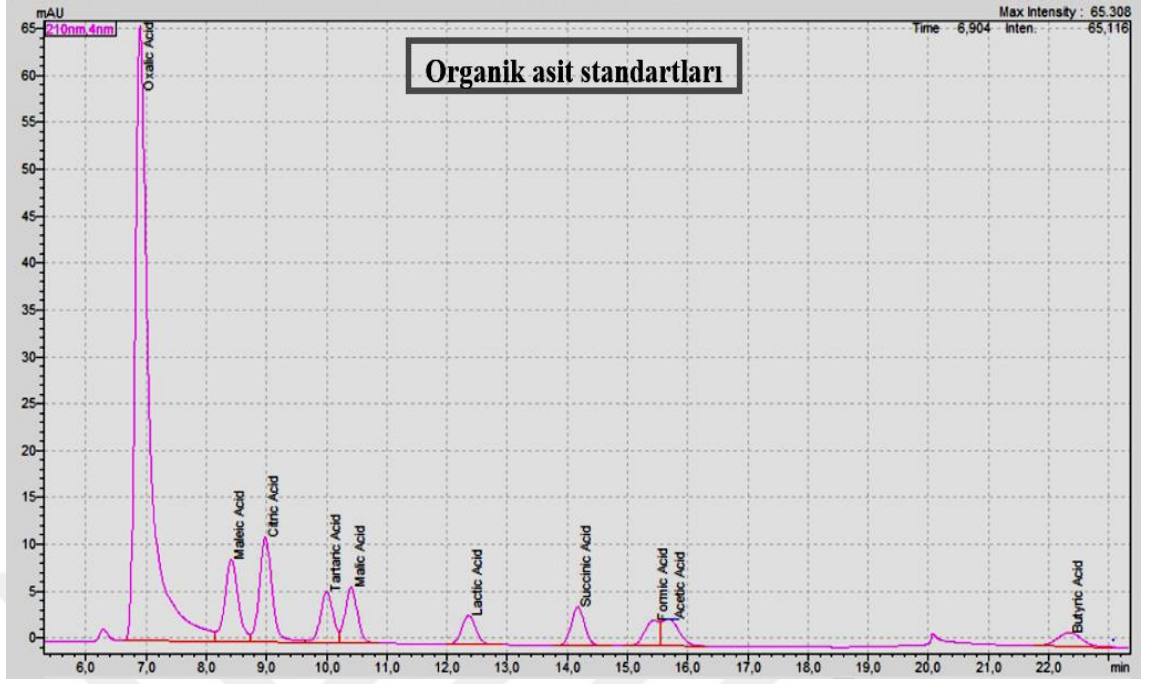
Şekil 4.26 PM'lerin farklı konsantrasyonları ile birlikte muamele edilen *S. mutans* ATCC 25175 suşunun hücre sayım sonuçları (log kob/mL)

4.3.6 PM'lerin metabolit içerikleri

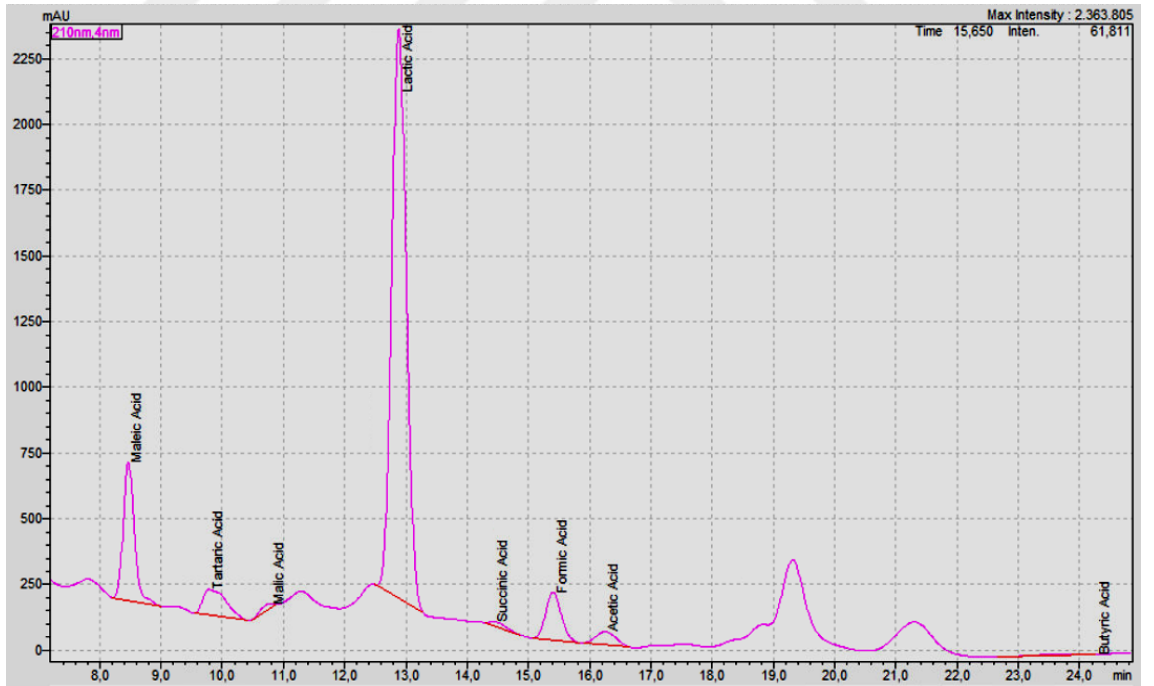
Tez çalışması kapsamında kullanılan PM'lerin içerik analiz sonuçları Çizelge 4.5'de sunulmuştur. Organik asit içeriği her bir organik asit standardı kullanılarak elde edilen kromatograma göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.27). Elde edilen veriler neticesinde PM'lerin içeriğinde okzalik asite rastlanmazken, laktik asit en yoğun miktarda bulunan organik asit olarak belirlenmiştir. En yüksek laktik asit miktarı ise EIR/IF-1 suşu tarafından üretilen PM'de tespit edilmiştir. Süksinik asit ve malik asit yalnızca EIR/IF-1 ve EIR/DG-1'den elde edilen PM'lerde, sitrik asit ise yalnızca EIR/IF-1'den elde edilen PM'de tespit edilmiştir. Her bir bakterinin PM'sine ait organik asit kromatogram görüntüleri Şekil 4.28-4.30'da sunulmuştur

Çizelge 4.5 PM'lerin metabolit içerikleri

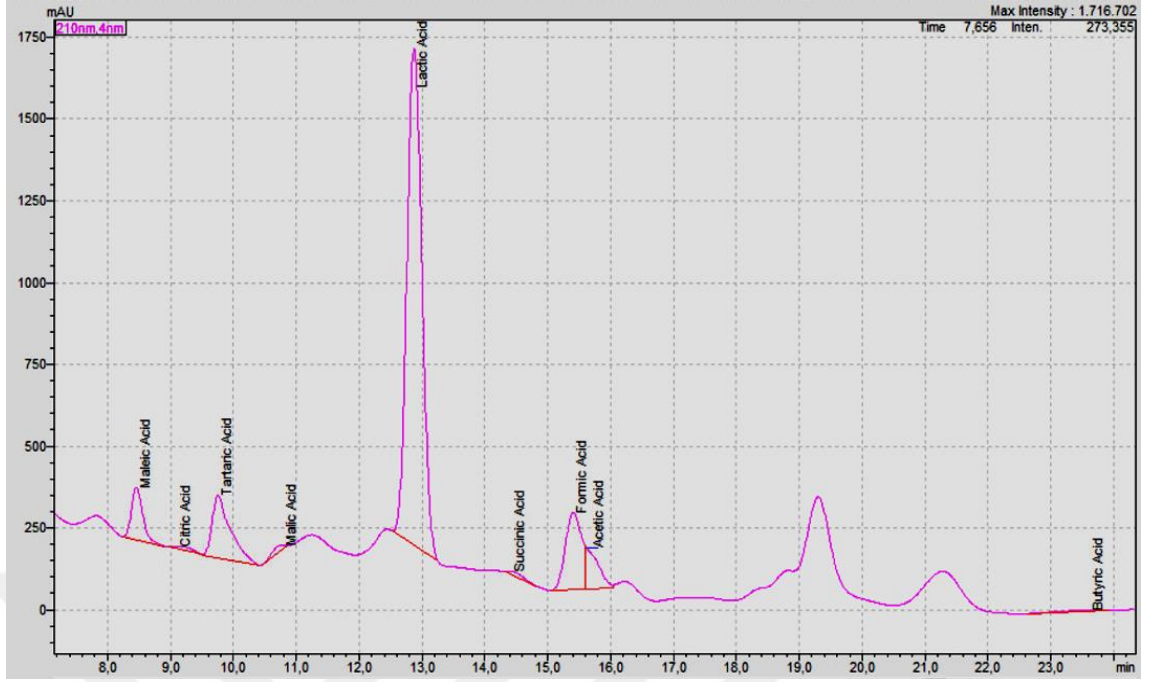
PM:	EIR/IF-1	EIR/DG-1	EIR/BG-2
Organik asitler (mg/mL)			
Maleik Asit	2.47	0.73	0.71
Sitrik Asit	0	0.06	0
Tartarik Asit	1.62	2.29	2.07
Malik Asit	0.18	0.16	0
Laktik Asit	35.82	24.79	25.45
Suksinik Asit	0.20	0.14	0
Formik Asit	3.55	4.64	2.63
Asedik Asit	0.98	1.46	1.52
Bütirik Asit	0.22	0.18	0.19
FAME (%)			
Metil palmitat (C16:0)	0.034	0.019	0.033
Metil stearat (C18:0)	0.088	0.074	0.077
Metil oleat (C18:1 cis-9)	0	0.014	0
Vitaminler (ppb)			
A	0	0	41.06
B1	61.33	46.34	59.28
B2	0	3.87	0.96
B3	10.09	1.52	0.03
B5	117.28	170.83	163.72
B12	387	381	361
D2	0.26	0.19	0.23
D3	0.14	0.26	0.06
E1	41.77	0	66.98
K2	0	0	35.17
K3	7.58	7.70	7.69



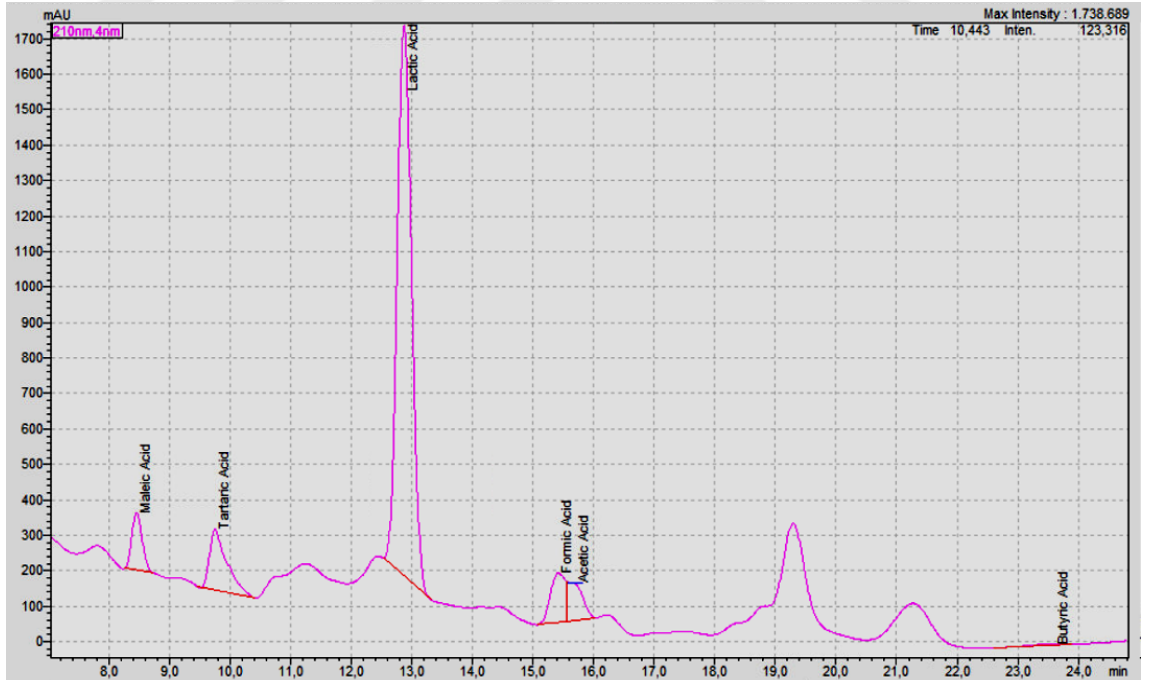
Şekil 4.27 Organik asit standartlarına ait kromatogram



Şekil 4.28 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı



Şekil 4.29 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı



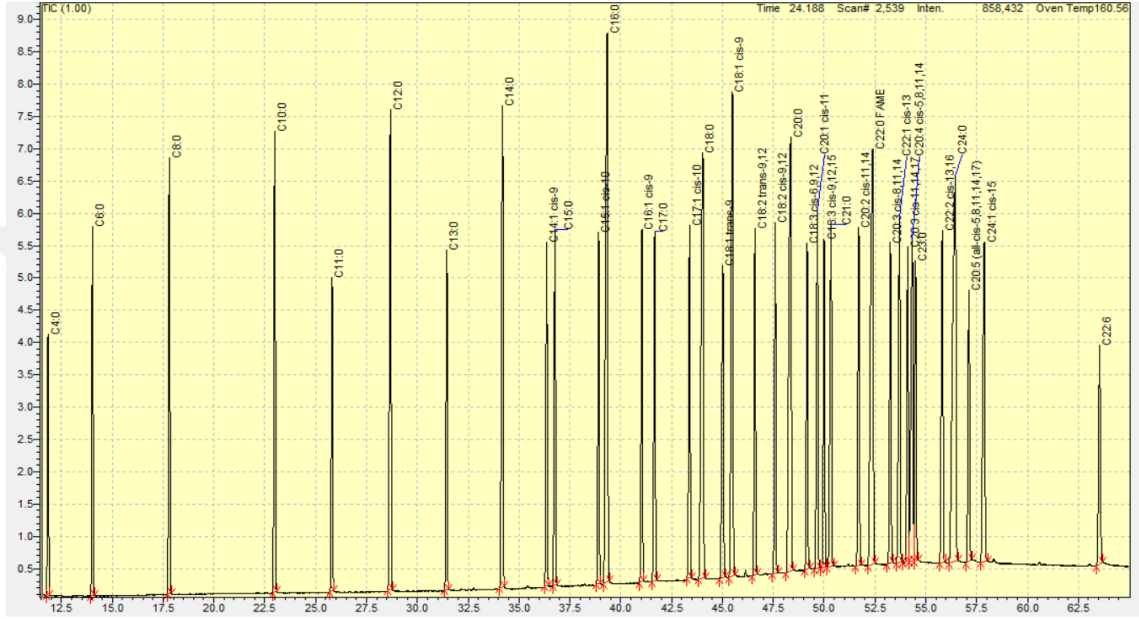
Şekil 4.30 *L. curvatus* EIR/BG-2 suşuna ait PM'nin organik asit kromatogramı

PM'lerin yağ asiti içeriklerinin analizi amacıyla Çizelge 4.6'da sunulan 37 farklı yağ asiti test edilmiştir.

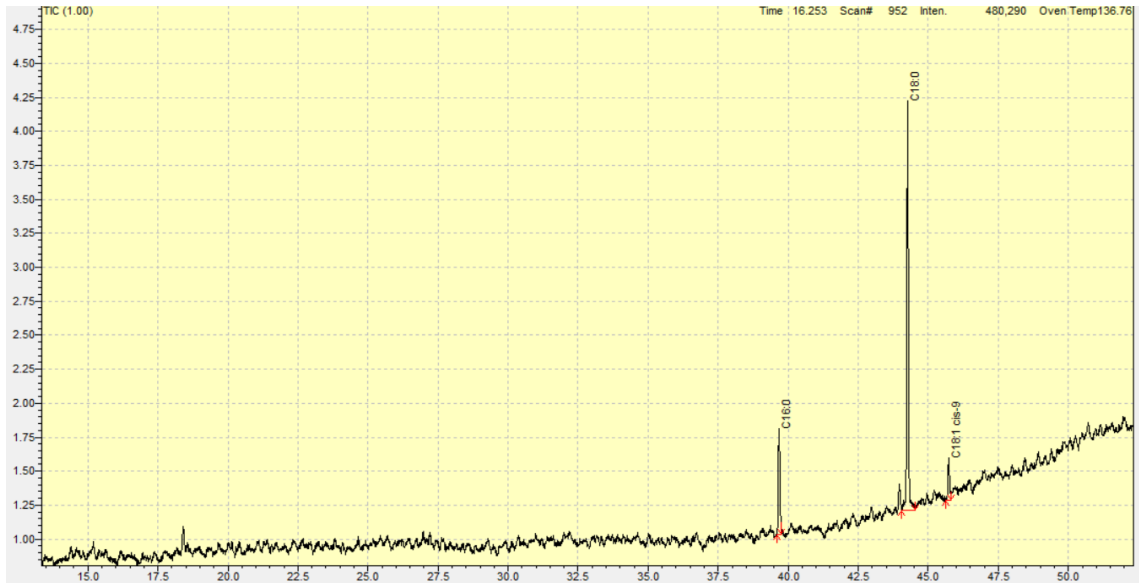
Çizelge 4.6 Çalışma kapsamında analiz edilen yağ asitleri

1	C4:0	Methyl butyrate (623-42-7), 4%
2	C6:0	Methyl caproate (106-70-7), 4%
3	C8:0	Methyl caprylate (111-11-5), 4%
4	C10:0	Methyl decanoate (110-42-9), 4%
5	C11:0	Methyl undecanoate (1731-86-8), 2%
6	C12:0	Methyl dodecanoate (111-82-0), 4%
7	C13:0	Methyl tridecanoate (1731-88-0), 2%
8	C14:0	Methyl myristate (124-10-7), 4%
9	C14:1 cis-9	Methyl myristoleate (56219-06-8), 2%
10	C15:0	Methyl pentadecanoate (7132-64-1), 2%
11	C15:1 cis-10	Methyl pentadecenoate (90176-52-6), 2%
12	C16:0	Methyl palmitate (112-39-0), 6%
13	C16:1 cis-9	Methyl palmitoleate (1120-25-8), 2%
14	C17:0	Methyl heptadecanoate (1731-92-6), 2%
15	C17:1 cis-10	Methyl heptadecenoate (75190-82-8), 2%
16	C18:0	Methyl stearate (112-61-8), 4%
17	C18:1 trans-9	Methyl octadecenoate (1937-62-8), 2%
18	C18:1 cis-9	Methyl oleate (112-62-9), 4%
19	C18:2 trans-9,12	Methyl linolelaidate (2566-97-4), 2%
20	C18:2 cis-9,12	Methyl linoleate (112-63-0), 2%
21	C20:0	Methyl arachidate (1120-28-1), 4%
22	C18:3 cis-6,9,12	Methyl linolenate (16326-32-2), 2%
23	C20:1 cis-11	Methyl eicosenoate (2390-09-2), 2%
24	C18:3 cis-9,12,15	Methyl linolenate (301-00-8), 2%
25	C21:0	Methyl heneicosanoate (6064-90-0), 2%
26	C20:2 cis-11,14	Methyl eicosadienoate (2463-02-7), 2%
27	C22:0 FAME	Methyl behenate (929-77-1), 4%
28	C20:3 cis-8,11,14	Methyl eicosatrienoate (21061-10-9), 2%
29	C22:1 cis-13	Methyl erucate (1120-34-9), 2%
30	C20:3 cis-11,14,17	Methyl eicosatrienoate (55682-88-7), 2%
31	C20:4 cis-5,8,11,14	Methyl arachidonate (2566-89-4), 2%
32	C23:0	Methyl tricosanoate (2433-97-8), 2%
33	C22:2 cis-13,16	Methyl docosadienoate (61012-47-3), 2%
34	C24:0	Methyl lignocerate (2442-49-1), 4%
35	C20:5(all-cis-5,8,11,14,17)	Methyl eicosapentaenoate (2734-47-6), 2%
36	C24:1 cis-15	Methyl nervonate (2733-88-2), 2%
37	C22:6	Methyl docosaheptaenoate (2566-90-7), 2%

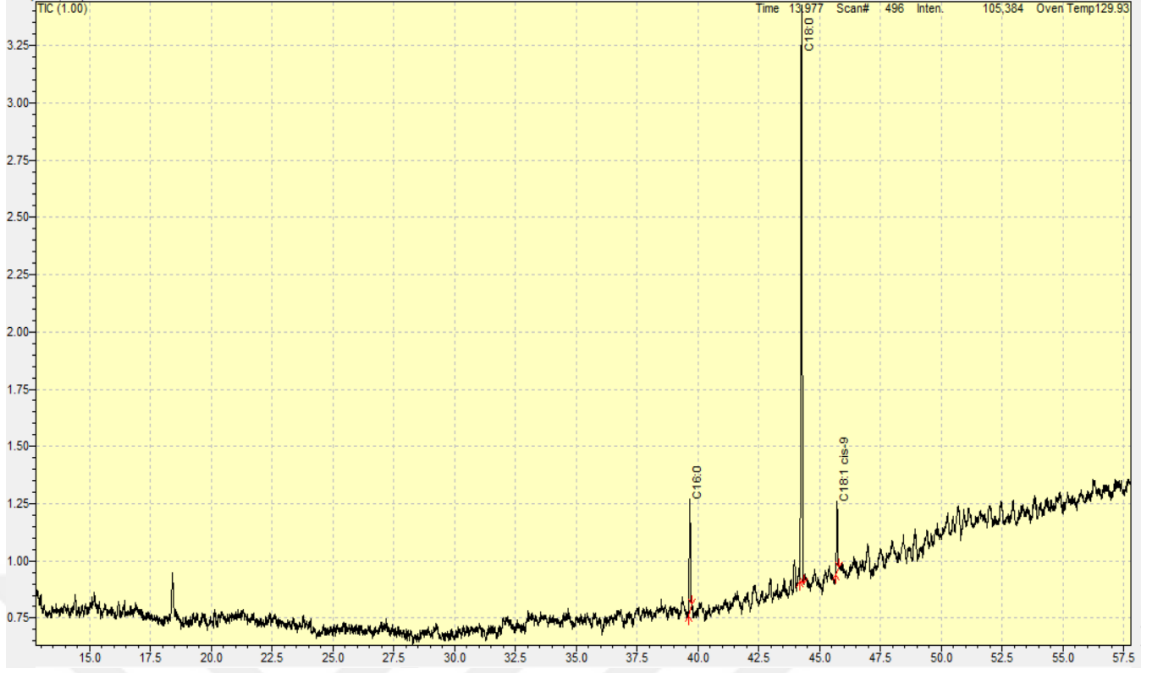
Her bir yağ asitinin standart kromatogramına (Şekil 4.31) göre elde edilen veriler neticesinde, sadece stearik asit (C18: 0; % 0.087) ve palmitik asit (C16: 0; % 0.032) tüm PM'lerde tespit edilmiştir. Oleik asit (C18: 1, cis-9; % 0.014) ise sadece EIR/DG-1 suşundan elde edilen PM içeriğinde belirlenmiştir. Her bir bakterinin PM'sine ait yağ asiti kromatogramları Şekil 4.32-34'de sunulmuştur.



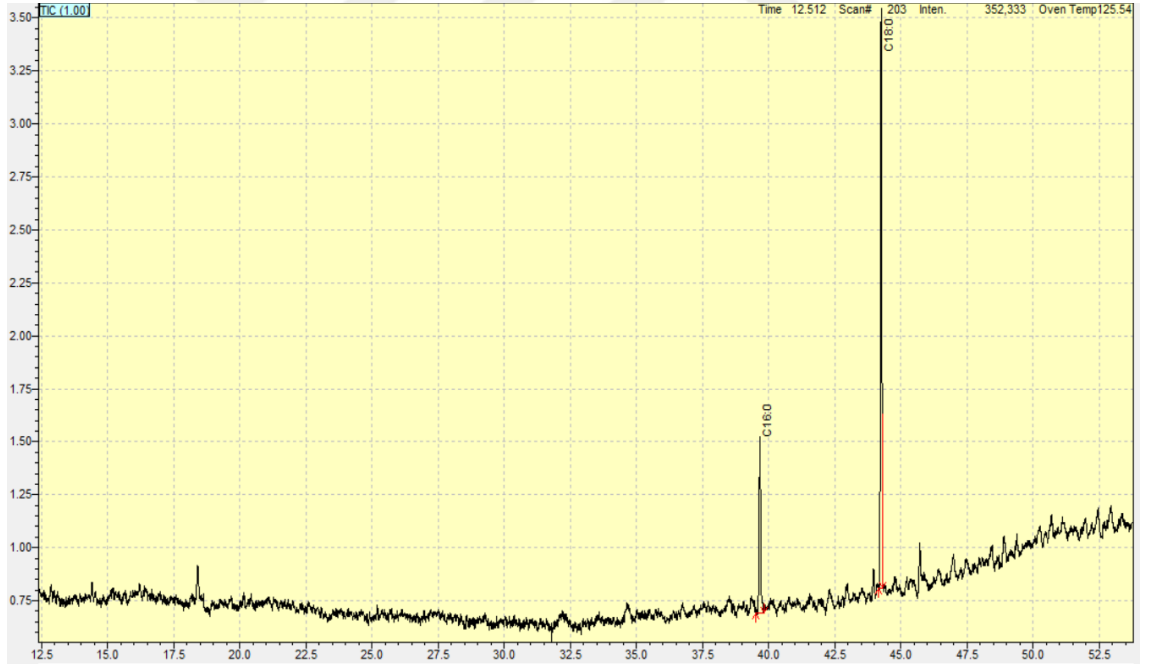
Şekil 4.31 FAME standartlarına ait kromatogram



Şekil 4.32 *L. plantarum* EIR/IF-1 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı



Şekil 4.33 *L. curvatus* EIR/DG-1 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı



Şekil 4.34 *L. curvatus* EIR/BG-2 suşuna ait PM'nin FAME kromatogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlar üzerinde en çok çalışılan biyofilmlerden biri olan dental biyofilmin ve bu biyofilme ilişkili bulaşıcı hastalıkların kontrolü önemli bir küresel sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Jiao vd. 2019, Choudhary vd. 2020). İnsan diş sert dokularına yapışan karyojenik bakteri türleri arasında bulunan Streptokoklar, diş plaklarının oluşumu ve diş çürüklerinin gelişmesinde rol oynaması nedeniyle bilimsel araştırmaların merkezinde yer almaktadır (Rathee ve Sapra 2021). Diş yüzeyinde biyofilm oluşumunu takiben biyofilm içerisinde yerleşen bu bakterinin canlı hücreleri ise antimikrobiyal maddelere, zorlu ortamlara ve konakçı bağışıklık savunma mekanizmalarına güçlü bir şekilde dirençli hale gelmekte ve bu da biyofilm ile ilişkili diş çürüğü başta olmak üzere bulaşıcı hastalıkların kontrol edilmesini oldukça zorlaştırmaktadır (Zhang vd. 2011). Bu nedenle, özellikle güçlü biyofilm oluşturan bakterilerin kontrolü için tasarlanacak yeni bir stratejinin; toplam karyojenik biyofilm miktarının azaltılmasına yönelik olması önerilmektedir. Ticari ürünlerde yaygın olarak kullanılan kimyasal maddelerin yan etkilere sahip olmasından dolayı son çalışmalar, doğal bileşiklerin *S. mutans*'ın canlı hücre ve biyofilm oluşumunu azaltarak diş çürüklerini önlemedeki etkinliği üzerine odaklanmıştır (Chen vd. 2020). Bitkilerden elde edilen fito-kimyasallar diş çürüğünün önlenmesinde güçlü sonuçlar gösterse de, birçok bitki bazlı ajan insan hücrelerine de toksisite gösterebilmektedir (Bodiba vd. 2018). Dolayısıyla, yeni ve etkili doğal bileşikler dahil olmak üzere fonksiyonel antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yönelik hala karşılanmamış bir ihtiyaç bulunmaktadır.

Son yıllarda, diş çürüklerinin önlenmesi için belirli probiyotiklerin uygulanmasına olan ilgi hızla artmaktadır. Bugüne kadar, birçok mikroorganizma karyojenik patojenlere karşı olan güçlü antibakteriyel, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteleri açısından değerlendirilmiş (Wasfi vd. 2018, Jeong vd. 2018, Hasslöf ve Stecksén-Blicks 2020) ve tabletler, pastiller ve sakızlar dahil olmak üzere çeşitli diş bakımı ürünlerinin içeriğine dahil edilmişlerdir (Suzuki vd. 2014, Yang vd. 2021). Ancak, probiyotiklerin özellikle ağız boşluğunda etkilerini gösterebilmeleri için hayatta kalma ve kolonileşme sınırlamalarının üstesinden gelmeleri oldukça önemli kabul edilmektedir (Chen vd.

2020). Canlılığa bağlı temel sorunların üstesinden gelmek amacıyla, probiyotiklerin patojenler üzerindeki temel etki mekanizmasının metabolizma sırasında ürettikleri maddeler olan, antimikrobiyal peptitler, organik asitler ve hidrojen peroksit gibi biyoaktif bileşiklerin üretimine dayandığı dikkate alındığında, PM'lerin de probiyotiklerin yerine kullanılabileceği fikri yaygınlaşmaktadır (Ohshima vd. 2019). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da, üç farklı *Lactobacillus* spp. suşundan elde edilen PM'lerin *S. mutans*'a karşı etkinlikleri hücre canlılığı ve biyofilm giderimi açısından değerlendirilmiştir. En yüksek antibakteriyel aktivite, bir insan mikrobiyota izolatu olan *L. plantarum* EIR/IF-1'den elde edilen PM'de gözlemlenmiştir. Tüm PM'lerin aktivitesi nötralizasyonla tamamen yok olmuş ve asidifikasyonla ilgili bir inhibisyon aktivitesine sahip oldukları anlaşılmıştır. Sonuçlar, *Weissella cibaria* (Lim vd. 2018), *L. kefiranofaciens* (Jeong vd. 2018) ve *L. reuteri* (Yang vd. 2021) suşlarının hücresiz kültür süpernatantlarının periodontal patojenlere karşı sergiledikleri antibakteriyel aktivite ile benzer bulunmuştur.

Diş çürüklerinin, *S. mutans*'ın etki ettiği biyofilm bağımlı diş hastalıklarından biri olduğu kabul edilmektedir (Jeong vd. 2018). Diş çürüklerinin patogeneğinde biyofilm oluşumu önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Biyofilmler içinde/üzerinde büyüme yeteneği, patojen bakterilere hem seçici bir avantaj hem de biyofilm tabakası nedeniyle hedef bölgeye ulaşamayan hemen hemen tüm terapötik ajanlar için doğuştan gelen bir direnç sağlamaktadır (Hall-Stoodley ve Stoodley 2005). Bu nedenle, ümit verici ve güçlü bir tedaviden beklenen birincil etki, sadece patojenleri hedeflemesi değil, aynı zamanda karyojenik biyofilm oluşumunu kontrol etmesi olmaktadır. Çalışmamızda, üç farklı *Lactobacillus* spp. suşu tarafından üretilen PM'lerin *S. mutans* biyofilm oluşumu üzerindeki etkinlikleri üç farklı yaklaşım kullanılarak değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren üç PM arasında, bal arısı bağırsak mikrobiyotası kaynaklı EIR/BG-2 suşundan elde edilen PM'nin, birlikte inkübasyon ve ön muamele işlemini takiben en güçlü antibiyofilm aktivite sergilediği kanıtlanmıştır. Önceden oluşan biyofilmin gideriminde en etkili bulunan PM ise, yunus bağırsağı mikrobiyotasından elde edilen EIR/DG-1 suşuna ait bulunmuştur. İlaveten, SEM ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopu analizleri de, PM'ler ile muamele sonucunda *S. mutans* biyofilmindeki ağ benzeri yapının azaldığını ortaya koymuştur.

PM'lerin *S. mutans* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini daha fazla doğrulayabilmek amacıyla, bir *ex vivo* diş modeli oluşturulmuş ve EIR/DG-1'den türetilen PM'nin daha koruyucu olduğu bulunmuştur. Yunus bağırsağı mikrobiyotasından izole edilen *L. curvatus*'tan elde edilen PM'nin diş modellerinde diş plakları üzerindeki inhibe edici etkisine ilişkin bir rapora literatürde rastlanmamıştır.

Streptococcus mutans, biyofilm oluşturmak yetersayı algılama (QS) sistemleri, yüzey adezinleri, hücre dışı polisakkaritler ve glukan bağlayıcı proteinler dahil olmak üzere birçok virülans faktör sergilemektedir (Krzyściak vd. 2014). Bu faktörler dikkate alınarak PM'lerin *S. mutans*'ın biyofilm oluşumu üzerindeki mekanizmasını anlamak amacıyla, karyojenik biyofilm oluşumunu destekleyen bazı temsili genlerin ifade seviyelerini incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında kullanılan *gtfC* geni, *S. mutans* hücrelerinin diş yüzeylerine bağlanması için sükrozdan glukanları sentezleyen bir virülans faktörü olan glukosiltransferaz C enzimini kodlamaktadır (Koo vd. 2010). Elde edilen veriler göre test edilen tüm PM'lerin varlığında *S. mutans* hücrelerinde suda çözünmeyen glukan sentezleyen genin (*gtfC*) ifadesinde önemli bir azalma tespit edilmiştir. Çözünmeyen glukan sentezi azaltıldığında veya yok edildiğinde, *S. mutans* biyofilm oluşumunun azalması indüklenebilmekte bu da patogenezi etkileyebilmektedir (Jeon vd. 2009). Dolayısıyla, *gtfC* gen ifadesinin azalması, test edilen PM'lerin antibiyofilm etkisini açıklayabilmektedir. Elde edilen veriler benzer şekilde, *gtfC* ifadesinde ve aynı zamanda yapışkan *S. mutans* hücrelerinde önemli bir azalma, *Lactobacillus* sp. suşlarından elde edilen PM'lerin kullanılması neticesinde de gözlemlenmiştir (Wasfi vd. 2018). Ayrıca, *L. fermentum* tarafından üretilen biyosürefektanların da *S. mutans gtfB/C* gen ifadesini azattıkları rapor edilmiştir (Tahmourespour vd. 2011). *GtfC* genine ek olarak, PM'lerin *comA* ve *comX* ifade seviyeleri üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Hücreden hücreye sinyalleşmede yer alan QS sisteminin merkezi bileşenine, bir yeterlilik uyarıcı peptit (CSP) feromon aracılık etmektedir. CSP'ye özgü bir hücre dışına aktarma aparatı, *comA* tarafından kodlanan bir ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısından (*comA*) oluşmaktadır (Lemos vd. 2019). Ayrıca, QS yolağı ComX tarafından kodlanan alternatif sigma faktörü *comX* aracılığıyla yetkinlik aktivasyonundan direk olarak sorumludur. Tez çalışması neticesinde elde edilen veriler, PM'lerin, *S. mutans*'ın QS mekanizması için önemli olan

bu düzenleyici genlerin ifadelerini baskıladığını göstermiştir. Genel olarak, *S. mutans*'ın QS mekanizması ve virülansı için önemli olan anahtar genlerin aşağı regülasyonu, PM'lerin direk olarak biyofilm giderici dolaylı olarak ise çürük önleyici etkisine işaret etmekte ve umut vaad etmektedir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, probiyotikler tarafından üretilen laktik asit, kısa zincirli AHL üretimini ve QS tarafından düzenlenen biyofilm oluşumunu baskılayarak QS üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir (Kıymacı vd. 2018).

Probiyotikler ağız boşluğunda yararlı etkilerini çeşitli mekanizmalarla sergilemektedirler. Bilinen bu temel mekanizmaların başında; organik asitler, hidrojen peroksit, yağ asitleri ve bunlara kıyasla oldukça spesifik olan bakteriyosinler ve enzimler (amilaz, lipaz) gibi çok farklı çeşitlilik sergileyen metabolik son ürünlerin patojenik bakterilerin aktivitesini ve hedef yüzeylere yapışmasını engellemesi, ardından QS ile ilgili biyofilm oluşumunu bloke etmesi, biyofilm bütünlüğüne/kalitesine müdahale ederek biyofilm eradikasyonuna yol açması yer almaktadır (Barzegari vd. 2020). Dolayısıyla PM'lerin *S. mutans* ile nasıl etkileşime gireceğini tanımlayabilmek amacıyla benzersiz metabolik profillerini de tanımlamak önem arz etmektedir. Bu nedenle, yararlı etkilerde yer alan metabolit spektrumu hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla, kromatografik teknikler ve MS kullanılarak PM'lerin metabolit içerikleri analiz edilmiştir. HPLC analizi, PM'lerde gen ifadesi seviyesinde AHL üretimine müdahale edebilen ve biyofilm oluşumunu engelleyebilen QS antagonistleri olan farklı organik asitlerin varlığını doğrulamıştır (Lopes vd. 2017). PM'lerin bileşenlerini açıklığa kavuşturmak amacıyla doymuş ve doymamış yağ asitleri de analiz edilmiştir. Test edilen FAME'ler arasında yer alan oleik asit, Lim vd. (2018) tarafından antibakteriyel aktiviteden sorumlu olabilecek bir metabolit olarak belirtilmiştir. Tanımladığımız vitaminlerden B kompleksleri ise, enerji metabolizmasındaki enzimler için önemli katalizör görevi görebilecek en yaygın vitaminler olarak değerlendirilmiştir (Peluzio vd 2021). Çalışmamıza benzer şekilde, laktik asit bakterilerinin konakçı mekanizmalarını etkileyen çeşitli vitaminler sentezlediği birçok çalışmada bildirilmiştir (Rajakovich ve Balskus 2019).

Bu tez çalışması kapsamında, *Lactobacillus* spp. suşlarından elde edilen PM'lerin, organik asit içeriğine bağlı olarak *S. mutans* gelişimini inhibe ettikleri, QS ve virülans ile ilgili genlerin aşağı regülasyonu yoluyla da karyojenik biyofilm oluşumunun azaltılması yönünde faydalar sundukları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler; biyolojik olarak aktif ve işlevsel moleküller içeren PM'lerin, diş çürüğü patogenezinin önlenmesinde yeni, doğal ve güvenli bir strateji olarak tasarlanabileceğine işaret etmektedir. PM'lerin eşsiz içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin yanı sıra antibiyotik direncini önleyerek biyofilm oluşumunu kontrol etmeye yardımcı olabile potansiyelleri dental ürünlere entegrasyonları için umut vaad etmektedir. Sonuç olarak, PM'ler gelecekte başta diş çürüklerinin yönetimi olmak üzere ağız ve diş sağlığı alanında önemli katkılar sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J.K., Palmer, S., Chakraborty, B., Wen, Z.Z., Richards, V.P., Brady, L.J. and Lemos, J.A. 2018. Biology of oral streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6, 12.
- Adil, M., Singh, K., Verma, P.K. and Khan, A.U. 2014. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 286–292.
- Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology*, 75, 105–114.
- Ahn, K.B., Baik, J.E., Park, O.J., Yun, C.H. and Han, S.H. 2018. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE*, 13(2), 1–16.
- Ahn, S.J., Wen, Z.T. and Burne, R.A. 2007. Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8519–8527.
- Ahn, S.J., Ahn, S.J., Wen, Z.T., Brady, J. and Burne, R.A. 2008. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infection and Immunity*, 76(9), 4259–4268.
- Alshahrani, A.M. and Gregory, R.L. 2020. *In vitro* cariostatic effects of cinnamon water extract on nicotine-induced *Streptococcus mutans* biofilm. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 20, 1–9.
- Anonymous. 2015. <https://www.bakerstreetdental.com> Erişim Tarihi: 20.04.2021
- Anonymous 2016. FDI policy statement on oral health for healthy ageing: Adopted by the FDI General Assembly: 24 September 2015, Bangkok, Thailand. *International Dental Journal*, 66(1), 7–8.
- Bagramian, R.A., Garcia-Godoy, F. and Volpe, A.R. 2009. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, 22(1), 3–8.
- Baker, J.L., Faustoferri, R.C. and Quivey, R.G. 2017. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*—the more we know, the more we don't. *Molecular Oral Microbiology*, 32(2), 107–117.
- Barzegari, A., Kheyrolahzadeh, K., Mahdi, S., Khatibi, H., Sharifi, S., Memar, M.Y. and Vahed, S.Z. 2020. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infection and Drug Resistance*, 13, 659–672.

- Bender, G.R., Sutton, S.V.W. and Marquis, R.E. 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infection and Immunity*, 53(2), 331–338.
- Black, G.V. 1884. The formation of poisons by micro-organisms. A biological study of the germ theory of disease. Philadelphia, PA: P. Blakiston.
- Bodiba, D.C., Prasad, P., Srivastava, A., Crampton, B. and Lall, N.S. 2018. Antibacterial activity of *Azadirachta indica*, *Pongamia pinnata*, *Psidium guajava*, and *Mangifera indica* and their mechanism of action against *Streptococcus mutans*. *Pharmacogn. Mag.* 14, 76.
- Bowen, W.H. and Koo, H. 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45(1), 69–86.
- Bowen, W.H. 2002. We need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 126–131.
- Brady, L.J., Sarah E. M., Matthew, R.L., Nina, F., Karina, P., Champion C.D. and H.F.J. 2010. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Bone*, 23(1), 1–7.
- Burton, J.P., Drummond, B.K., Chilcott, C.N., Tagg, J.R., Thomson, W.M., Hale, J.D.F. and Wescombe, P.A. 2013. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 875–884.
- Bush, R.S. and Milligan, L.P. 1971. Study of the mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver. *Canadian Journal of Animal Science*, 51, 121–127.
- Camilli, A. and Bassler, B.L. 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 311(5764), 1113–1116.
- Cao, X., Ye, Q., Fan, M. And Liu, C. 2019. Antimicrobial effects of the ginsenoside Rh2 on monospecies and multispecies cariogenic biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 740–751.
- Chauhan, D.N., Singh, P.R., Shah, K. and Chauhan, N.S. 2020. Natural oral care in dental therapy: Current and future prospects. *Natural Oral Care in Dental Therapy*, 1–29.
- Chen, X., Daliri, E.B.M., Kim, N., Kim, J.R., Yoo, D. and Oh, D.H. 2020. Microbial Etiology and Prevention of Dental Caries: Exploiting Natural Products to Inhibit Cariogenic Biofilms. *Pathogens*, 9(7), 569.
- Cheng, L., Weir, M.D., Zhang, K., Xu, S.M., Chen, Q., Zhou, X. and Xu, H.H.K. 2012.

- Antibacterial nanocomposite with calcium phosphate and quaternary ammonium. *Journal of Dental Research*, 91(5), 460–466.
- Cheng, L., Zhang, K., Weir, M.D., Liu, H., Zhou, X. and Xu, H.H.K. 2013. Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on *Streptococcus mutans* impregnated in human dentin blocks. *Dental Materials*, 29(4), 462–472.
- Choi, H.A., Cheong, D.E., Lim, H.D., Kim, W.H., Ham, M.H., Oh, M.H., Wu, Y., Shin, H.J. and Kim, G.J. 2017. Antimicrobial and anti-biofilm activities of the methanol extracts of medicinal plants against dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1242–1248.
- Choudhary, P., Singh, S. and Agarwal, V. 2020. Microbial Biofilms, Bacterial Biofilms, Sadik Dincer, Melis Sümengen Özdenefe and Afet Arkut, IntechOpen, Available from: <https://www.intechopen.com/books/bacterial-biofilms/microbial-biofilms>
- Cohen L.K and Jago J.D. 1976. Toward the formulation of sociodental indicators. *International Journal of Health Services*, 6, 681–698.
- Conrads, G., de Soet, J.J., Song, L., Henne, K., Sztajer, H., Wagner-Döbler, I. and Zeng, A.P. 2014. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *Journal of Oral Microbiology*, 6(1), 1–13.
- Cousin, F.J., Louesdon, S., Maillard, M.B., Parayre, S., Falentin, H., Deutsch, S.M., Boudry, G. and Jan, G. 2012. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: a new vector to study probiotic potentialities *in vivo*. *Food Microbiology*, 32 1, 135–146.
- Derr, A.M., Faustoferri, R.C., Betzenhauser, M.J., Gonzalez, K., Marquis, R.E. and Quivey, R.G. 2012. Mutation of the NADH oxidase gene (Nox) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1215–1227.
- Dinic, M., Lukic, J., Djokic, J., Milenkovic, M., Strahinic, I., Golic, N. and Begovic, J. 2017. *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 594.
- Dunne, C., O'mahony, L., Murphy, L., Thorton, G., Morrissey, D., O'halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386–392.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843–7853.

- Ezendam, J. and Van Loveren, H. 2006. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutrition Reviews*, 64, 1–14.
- Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O.C., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. and Van Sinderen, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 2108–2113.
- Fozo, E.M., Kajfasz, J.K. and Quivey, R.G. 2004. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 238(2), 291–295.
- Fozo, E.M. and Quivey, R.G. 2004. Shifts in the Membrane Fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 929–936.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K. and Kato, T. 2013 Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446–450.
- Giacaman, R. 2018. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. *Oral Disease*, 24, 1185–1197.
- Guggenheim, B., Giertsen, E., Schüpbach, P. and Shapiro, S. 2001. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research*, 80(1), 363–370.
- Guo, L., McLean, J.S., Lux, R., He, X. and Shi, W. 2015. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Scientific Reports*, 5, 1–11.
- Gupta, G. 2011. Probiotics and periodontal health. *Journal of Medicine and Life*, 4, 387–94.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiology*, 13(1), 7–10.
- Hassan, M., Javadzadeh, Y., Lotfipour, F. and Badomchi, R. 2011. Determination of comparative minimum inhibitory concentration (MIC) of bacteriocins produced by enterococci for selected isolates of multi-antibiotic resistant *Enterococcus* spp.. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2), 75–79.
- Haslöf, P. and Stecksén-Blicks, C. 2020. Chapter 10: Probiotic bacteria and dental caries. In *The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health*; Zohoori, F.V., Duckworth, R.M., Eds.; Academic Press: London, UK, 28, 99–107.

- Haukioja, A., Yli-Knuutila, H., Loimaranta, V., Kari, K., Ouwehand, A.C., Meurman, J.H. and Tenovuo, J. 2006. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. *Oral Microbiol and Immunology*, 21, 326–32.
- Heilmann A., Tsakos G. and Watt R.G. 2015. Oral health over the life course. In: Burton-Jeangros C., Cullati S., Sacker A., Blane D. A life course perspective on health trajectories and transitions. *Life Course Research and Social Policies*, vol 4. Springer, Cham.
- Hirzy, J.W., Connett, P., Xiang, Q., Spittle, B. and Kennedy, D. 2018. Developmental neurotoxicity of fluoride: A quantitative risk analysis toward establishing a safe dose for children. In *Neurotoxins*; McDuffie, J.E., Ed.; IntechOpen: London, UK, ISBN 978-1-78923-168-7.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F. and Lebranchu, Y. 2008. Supernatant from *Bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLOS ONE*, 3, e2753.
- Homayouni, R.A., Aghebati, M.L., Samadi, K.H. and Abbasi, A. 2020. Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–8.
- Huang, R., Li, M. and Gregory, R.L. 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435–444.
- Jensen, G., Benson, K., Carter, S. and Endres, J. 2010. GanedenBC30 cell wall and metabolites: Anti-inflammatory and immune modulating effects *in vitro*. *BMC Immunology*, 11, 15.
- Jeon, J.G., Klein, M.I., Xiao, J., Gregoire, S., Rosalen, P.L. and Koo, H. 2009. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiology*, 9, 228.
- Jeon, J.G., Rosalen, P.L., Falsetta, M.L. and Koo, H. 2011. Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Research*, 45(3), 243–263.
- Jeong, D., Kim, D.H., Song, K.Y. and Seo, K.H. 2018. Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1).
- Jiao, Y., Tay, R.F, Niu, L. and Chen, J. 2019. Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 11 (3) 28 115–118.

- Jose, J.E., Padmanabhan, S. and Chitharanjan, A.B. 2013. Systemic consumption of probiotic curd and use of probiotic toothpaste to reduce *Streptococcus mutans* in plaque around orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 144(1), 67–72.
- Karoly, M., Gabor, N. Adam and N. Andrea, B. 2019. Characteristics, diagnosis and treatment of the most common bacterial diseases of the oral cavity. *Orvosi Hetilap*, 160, 739–746.
- Keller, M.K., Bardow, A., Jensdottir, T., Lykkeaa, J. and Twetman, S. 2012. Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70, 246–250.
- Khodaii, Z., Ghaderian, S.M. H. and Natanzi, M.M. 2017. Probiotic Bacteria and their supernatants protect enterocyte cell lines from enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) invasion. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 6, 183–189.
- Kiyimaci, M.E., Altanlar, N., Gumustas, M., Ozkan, S.A. and Akin, A., 2018. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbial Pathogenesis*, 121, 190–197.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S. and Palmer, R.J. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 486–505.
- Konstantinov, S.R., Kuipers, E.J. and Peppelenbosch, M.P. 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for crc screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(12), 741–745.
- Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I. and Jeon, J.G. 2010. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *Journal of Bacteriology* 192(12), 3024–3032.
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B. and Skalniak, A. 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(4), 499–515.
- Lee, M.R, Tsai, C.J., Teng, S.H. and Hsueh, P.R. 2015. Identification of *Weissella* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1246–1251.
- Leme, A.F., Koo, H., Bellato, C.M., Bedi, G. and Cury, J.A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - New insight. *Journal of Dental Research*, 85(10), 878–887.

- Lemos, J.A., Palmer, S.R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J.K., Freires, I.A., Abranches, J. and Brady, L.J. 2019. The biology of *Streptococcus mutans*. Gram-Positive Pathogens, 7(1), 435–448.
- Liao, S., Klein, M., Heim, K., Fan, Y., Bitoun, J., Ahn, S.J., Burne, R.A., Koo, H., Brady, L.J. and Wen, Z.T. 2014. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. Journal of Bacteriology, 196, 2355–2366.
- Li, Y.H., Tian, X.L., Layton, G., Norgaard, C. and Sisson, G. 2008. Additive attenuation of virulence and cariogenic potential of *Streptococcus mutans* by simultaneous inactivation of the ComCDE quorum-sensing system and HK/RR11 two-component regulatory system. Microbiology, 154(11), 3256–3265.
- Li, Y.H., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. 2001. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. Journal of Bacteriology, 183(3), 897–908.
- Li, Y.H., Lau, P.C.Y., Tang, N., Svensäter, G., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. 2002. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology, 184(22), 6333–6342.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. Science, 147, 747–748.
- Lim, H.S., Yeu, J.E., Hong, S.P. and Kang, M.S. 2018. Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU. Molecules, 23, 1984.
- Lin, X., Chen, X., Tu, Y., Wang, S. and Chen, H. 2017. Effect of probiotic lactobacilli on the growth of *Streptococcus mutans* and multispecies biofilms isolated from children with active caries. Medical Science Monitor, 23, 4175–4181.
- Loesche, W.J. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews, 50(4), 353–380.
- Lopes, E.G. 2017. Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm in vitro assays. Jurnal of Applied Microbiology, 122(2), 450–461.
- Lu, M., Xuan, S. and Wang, Z. 2019. Oral microbiota: A new view of body health. Food Science and Human Wellness, 8, 8–15.
- Marsh, P. and Martin, M. 2009. Oral microbiology (5th ed). Elsevier.
- Marsh, P., Martin, M.V. and Lewis, M.A. 2009. Oral Microbiology. China, Churchill Livingstone.

- Marsh, P. and Zaura, E. 2017. Dental biofilm: Ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, 12–22.
- Marsh, P.D. and Bradshaw, D.J. 1995. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 169–175.
- Marquis, R.E. 1995. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 198–207.
- Marzec, A. and Feleszko, W. 2020. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, (14) 1–17.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2018. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *Nature Partner Journals Biofilms and Microbiomes*, 4(1), 1–13.
- Matsui, R. and Cvitkovitch, D. 2010. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiology*, 5(3), 403–417.
- Meurman, J.H. 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European Journal of Oral Science*, 113, 188–96.
- Minocha, A. 2009. Probiotics for preventive health. *Nutrition in Clinical Practice*, 24, 227–41.
- Mohammedsaed, W., McBain, A.J., Cruickshank, S.M. and O’Neill, C.A. 2014. *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5773–5781.
- Moradi, M., Kousheh, S.A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J.T., Yılmaz, N. and Lotfi, A. 2020. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews Food in Science and Food Safety*, 19(6), 3390–3415.
- Moradi, M., Mardani, K. and Tajik, H. 2019. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *LWT-Food Science and Technology*, 111, 457–464.
- Nadelman, P., Monteiro, A., Balthazar, C.F., Silva, H.L.A., Cruz, A.G., de Almeida Neves, A., Fonseca-Gonçalves and A., Maia, L.C. 2019. Probiotic fermented sheep’s milk containing *Lactobacillus casei* 01: Effects on enamel mineral loss and *Streptococcus* counts in a dental biofilm model. *Journal of Functional Foods*, 54, 241–248.
- Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M. and Fujiwara, S. 2016. Fragmented lactic acid bacteria cells activate peroxisome

- proliferator-activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2549–2559.
- Nakano, K., Nomura, R. and Ooshima, T. 2008. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. *Japanese Dental Science Review*, 44(1), 29–37.
- Nakano, K. and Ooshima, T. 2009. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiology*, 891–902.
- Nataraj, B.H., Ali, S.A., Bahare, P.V. and Yadav, H. 2020. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19, 168.
- Nyvad, B., and Fejerskov, O. 1987. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *European Journal of Oral Sciences*, 95(4), 287–296.
- Ohshima, T., Kawai, T. and Maeda, N. 2019. Bacterial cell-free probiotics using effective substances produced by probiotic bacteria, for application in the oral cavity, prebiotics and probiotics - potential benefits in nutrition and health, Elena Franco-Robles and Joel Ramírez-Emiliano, IntechOpen, 10.5772/intechopen.89008
- Onbas, T., Osmanagaoglu, O. and Kiran, F. 2019. Potential properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a bio-control strategy for wound infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1110–1123.
- Osborne, C.A., Galic, M., Sangwan, P. and Janssen, P.H. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 248(2), 183–188.
- Palmer, S.R., Ren, Z., Hwang, G., Liu, Y., Combs, A., Söderström, B., Lara Vasquez, P., Khosravi, Y., Brady, L.J. and Koo, H. 2019. *Streptococcus mutans* yidC1 and yidC2 impact cell envelope biogenesis, the biofilm matrix and biofilm biophysical properties. *Journal of Bacteriology*, 201.
- Peluzio, M.C.G., Martinez, J. A. and Milagro, F.I. 2021. Postbiotics: metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. *Trends Food Science and Technology* 108, 11-26.
- Peres, M.A., Macpherson, L.M.D., Weyant, R.J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M.R., Listl, S., Celeste, R.K. and Guarnizo-Herreno, C.C., Kearns, C., 2019. Oral diseases: A global public health challenge. *Lancet*, 394, 249–260.
- Pessan, J.P., Silva, S.M.B., Lauris, J.R.P., Sampaio, F.C., Whitford, G.M. and Buzalaf, M.A.R. 2008. Fluoride uptake by plaque from water and from dentifrice. *Journal of Dental Research*, 87(5), 461–465.

- Petersen, P.E. 2003. 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 Dentistry and Oral Epidemiology*, 31 (1), 3–24.
- Philip, N., Leishman, S.J., Bandara, H. and Walsh, L.J. 2019. Polyphenol-rich cranberry extracts modulate virulence of *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* biofilms implicated in the pathogenesis of early childhood caries. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 41, 56–62
- Pitts, N.B., Zero, D.T., Marsh, P.D., Ekstrand, K., Weintraub, J.A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G. and Ismail, A. 2017. Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–16.
- Piwat, S., Pahumunto, N., Srisommai, P., Mapaisansin, C. and Teanpaisan, R. 2019. Effect of probiotic delivery vehicles for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 in caries prevention: A clinical study. *Journal Food Process*, 43, e14147.
- Rajakovich, L.J. and Balskus, E.P. 2019. Metabolic functions of the human gut microbiota: The role of metalloenzymes. *Natural Product Reports*, 36(4), 593–625.
- Ramanujam, P., Poorni, S., Srinivasan, M.R. and Sureshbabu, N.M. 2019. Probiotics in dental caries prevention. *Indian Journal of Nutrition Dietetics*, 56, 84.
- Rathee, M. and Sapra A. 2021. Dental Caries. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699>
- Razi, M.A., Qamar, S., Singhal, A., Mahajan, A., Siddiqui, S., and Minz, R.S.M. 2020. Role of natural salivary defenses in the maintenance of healthy oral microbiota in children and adolescents. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9, 1603.
- Reid, G., Younes, J.A., Van Der Mai H.C., Gloor, G.B., Knight, R. and Buscher, H.J. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 27–38.
- Righolt, A.J., Jevdjevic, M., Marcenes, W. and Listl, S. 2018. Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *Journal of Dental Research*, 97(5), 501–507.
- Russell, R.R. 2009. Changing concepts in caries microbiology. *American Journal of Dentistry*, 22(5), 304–310.
- Sakaue, Y., Takenaka, S., Ohsumi, T., Domon, H., Terao, Y. and Noiri, Y. 2018. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: An in vitro study. *BMC Oral Health*, 18, 52.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 162, New York.

- Savadogo, A., Cheik, A.T.O., Bassole, H.N.I. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 1174-1179.
- Scharnow, A.M., Solinski, A.E. and Wuest, W.M. 2019. Targeting: *S. mutans* biofilms: A perspective on preventing dental caries. *MedChemComm*, 10(7), 121–126.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L. and Goodwin A.C. 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press.
- Seminario-Amez, M., Lopez-Lopez, J., Estrugo-Devesa, A., Ayuso-Montero, R. and Jane-Salas, E. 2017. Probiotics and oral health. *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia*, 22, 282–288.
- Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405–440.
- Shah, N. 2004. Probiotics and prebiotics. *Agro Food Ind. Hi-Tech.*, 1, 13–16.
- Shanker, E. and Federle, M.J. 2017. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. *Genes*, 8(1).
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K. and Hashemi, A. 2019. Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14689–14708.
- Shibata, Y., Yamashita, Y. and Van Der Ploeg, J.R. 2009. The serotype-specific glucose side chain of rhamnose-glucose polysaccharides is essential for adsorption of bacteriophage M102 to *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 68–73.
- Sim, C.P.C., Dashper, S.G. and Reynolds, E.C. 2016 Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal of Dentistry*, 50, 1–11.
- Siqueira, J.F., Rôças, I. N., Paiva, S.S.M., Guimarães-Pinto, T., Magalhães, K.M. and Lima, K.C. 2007. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 104(1), 122–130.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.
- Sucharit, S. 2020. Investigation into Compound(s) Exhibiting *Streptococcus mutans* Anti-biofilm Activity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 21(1), 1–9.

- Suez, J., Zmora, N., Segal, E. and Elinav, E. 2019. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 6(11), 222–228.
- Suzuki, N., Yoneda, M., Tanabe, K., Fujimoto, A., Iha, K., Seno, K., Yamada, K., Iwamoto T., Masuo, Y. and Hirofuji, T. 2014. *Lactobacillus salivarius* WB21—Containing tablets for the treatment of oral malodor: A double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 117, 462–470.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. and Yaron, S. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2), 200–206.
- Tahmourespour, A., Salehi, R., Kermanshahi, R.K. and Eslami, G. 2011. The anti-biofouling effect of *Lactobacillus fermentum*-derived biosurfactant against *Streptococcus mutans*. *Biofouling*, 27(4), 385–392.
- Thibodeau, E.A., and O’Sullivan, D.M. 1996. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 24(3), 164–168.
- Tinanoff, N. 2019. Dental Caries. In *Pediatric Dentistry* 169–179. Elsevier.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M. T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2–3), 318–326.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 167–177.
- Thibodeau, E.A. and O’Sullivan, D.M. 1996. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 24(3), 164–168.
- Tsilingiri, K. and Rescigno, M. 2013. Postbiotics: What else? *Beneficial Microbes*, 4, 101–107.
- Uchida, M., Ishii, I., Inoue, C., Akisato, Y., Watanabe, K., Hosoyama, S., Toida, T., Ariyoshi, N. and Kitada, M. 2010. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17, 980–988.
- Vargas, M. 1998. Sociodemographic Distribution of Pediatric Dental Caries: NHANES III. 129, 11.
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. and Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed

- factories. BMC Veterinary Research, 5, 1–6.
- Vijayakumar, A., Sarveswari, B.H., Vasudevan, S., Shanmugam, K., Solomon, A.P. and Neelakantan, P. 2021. Baicalein inhibits *Streptococcus mutans* biofilms and dental caries-related virulence phenotypes. Antibiotics, 10, 215.
- Villalobos-Delgado, L.H., Nevárez-Moorillon, G.V., Caro, I., Quinto, E.J., Mateo and J. 2019. Natural antimicrobial agents to improve foods shelf life. In Food Quality and Shelf Life; Galanakis, C.M., Ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 125–157.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O.A., Zafer, M.M. and Ashour, H.M. 2018. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 22(3), 1972–1983.
- Waters, C.M. and Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21, 319–346.
- WHO, 2020. Achieving better oral health as part of the universal health coverage and noncommunicable disease agendas towards 2030.
- Wilson, R.F. and Ashley F.P. 1990. Relationships between the biochemical composition of both free smooth surface and approximal plaque and salivary composition and a 24-hour retrospective dietary history of sugar intake in adolescents. Caries Research, 24, 03–210.
- Yang, K., Kim, J., Kim, H., Oh, J., Jung, H., Park, D. and Bae, W. 2021. *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. Scientific Reports 11, 10.1038/s41598-020-80921
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Song, Z., Høiby, N., Molin, S. and Givskov, M. 2012. Combating biofilms. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 65(2), 146–157.
- Zahradnik, R.T., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C.H., Hillman and J.D. 2009. Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. Journal of Applied Microbiology, 107(2), 682–690.
- Zaura, E. and Twetman, S. 2019. Critical appraisal of oral pre- and probiotics for caries prevention and care. Caries Research, 53, 514–552.
- Zhang, Z., Nadezhina, E. and Wilkinson, K. J. 2011. Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 55, 1075–1081.

Zhang, Q.X., Qin, S.J., Huang, Y., Xu, X.Y., Zhao, J.X., Zhang, H. and Chen, W. 2020. Inhibitory and preventive effects of *Lactobacillus plantarum* FB-T9 on dental caries in rats. *Journal of Oral Microbiology*, 12, 10.

Zolkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczynski, M. and Feleszko, W. 2020. Postbiotics-A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189–2206.



EKLER

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kit Protokolleri

EK 1a DNA izolasyon kit protokolü

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$. Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$.
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

Gram - Pellet cells. Gram + Pellet cells.

Suspend in EDTA. Add lytic enzymes.

Add Nuclei Lysis Solution. Incubate at 80°C for 5 minutes, then add RNase solution and incubate.

Add Protein Precipitation Solution.

Centrifuge.

Transfer supernatant to new tube containing isopropanol.

Centrifuge.

Discard supernatant. Add ethanol.

Centrifuge.

Aspirate ethanol. Air-dry pellet. Rehydrate DNA.

*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com


ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:
www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601


©1999–2010 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Printed in USA. Revised 10/10
Part #5F022

EK 1b Agaroz jelden DNA saflaştırma kit protokolü

For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.

 Print



Agarose Gel DNA Extraction Kit

For the elution of DNA fragments from agarose gels

Cat. No. 11 696 505 001

100 reactions

Version 11
Content version: July 2016
Store at +15 to +25°C

1. What this Product Does

Number of Reactions
For 100 reactions

Contents

Vial	Label	Contents
1	Silica Matrix	Pretreated spherical silica matrix sufficient for 100 standard reactions. White suspension.
2	Agarose Solubilisation Buffer	60 ml Agarose Solubilisation Buffer Suitable for solubilisation of TAE or TBE buffer agarose gels. Contains sodium perchlorate.
3 (green cap)	Nucleic Acid Binding Buffer	100 ml Binding Buffer. ⚠ Contains sodium perchlorate.
4 (blue cap)	Washing Buffer	20 ml Washing Buffer ⚠ Add 80 ml absolute ethanol before use!

Storage and Stability
The kit components are stable when stored at +15 to +25°C through the control date printed on the label.

Additional Equipment and Reagents Required

Optional:

- Agarose MP*
- Agarose LE*
- Agarose MS*

* available from Roche Applied Science

Application
The Agarose Gel DNA Extraction Kit is designed for the efficient isolation of DNA fragments from TAE or TBE agarose gels. The kit is applicable for DNA isolation from standard agarose gels (e.g., Agarose MP* and Agarose LE*). DNA fragments isolated with the agarose gel DNA extraction kit are efficiently ligated into plasmid cloning vectors or labeled to high specific activity using either random primed labeling or nick translation. No inhibition of digestion with restriction endonucleases is observed.

2. Standard Protocol

2.1 Isolation of Electrophoretically separated DNA Fragments with the Agarose Gel DNA Extraction Kit

⚠ Make sure that 80 ml absolute ethanol have been added to the Washing Buffer prior to the first use (Vial 4, blue cap).

- 1 Separate the DNA of interest in an agarose gel of suitable concentration.
 - ③ Use either 1× TAE (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) or 1× TBE running buffer (45 mM Tris-borstat, 1 mM EDTA, pH 8.0).
- 2
 - After sufficient separation cut out the interesting DNA fragment with a sharp scalpel or razor blade.
 - ③ Take care to leave as much of the agarose gel as possible.
 - Transfer in a preweighed reaction tube.
- 3 Use 300 µl of the Agarose Solubilisation Buffer (Vial 2) per 100 mg of agarose gel.
 - ③ Apply 600 µl if the agarose concentration used for the gel preparation is more than 2%.
- 4
 - Resuspend the Silica Suspension (Vial 1) until a homogeneous suspension is obtained.
 - Add 10 µl of the silica suspension to the sample.
 - ⚠ If the sample contains more than 2.5 µg DNA increase the amount of silica suspension by 4 µl for each additional µg of DNA.
- 5 Incubate the mixture for 10 min at +56 to +60°C and vortex every 2 - 3 min.
- 6 Centrifuge in a table top centrifuge for 30 s at maximal speed and discard the supernatant.
- 7
 - Resuspend the matrix containing the DNA with 500 µl Nucleic Acid Binding Buffer (Vial 3, green cap) on a vortex mixer.
 - Centrifuge and discard supernatant as before.
- 8
 - Wash the pellet with 500 µl Washing Buffer (Vial 4, blue cap).
 - Centrifuge and discard supernatant as before.
 - Repeat this step once.
- 9 Remove all the liquid with a pipette, then invert the tube on an adsorbent tissue and let dry at room temperature for 15 min.
 - ⚠ Do not apply vacuum since overdrying may lead to lower yields. The matrix color turns to bright white when dry.
- 10
 - Use 20 - 50 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0 - 8.5) or double dist. water (pH 8 - 8.5) for the elution of DNA.
 - ⚠ The elution efficiency is increased with higher volume of elution buffer applied or application of two elution cycles with 2 × 25 µl.
 - Vortex and incubate for 10 min at +15 to +25°C or +56 to +60°C.
 - Vortex every 2 - 3 min.
 - After centrifugation at maximum speed for 30 s transfer the DNA containing solution to a new reaction tube taking care not to carry over any matrix material.

07611734100001 ©

www.lifescience.roche.com

EK 1c cDNA sentez kiti protokolü

BIO-RAD

iScript™ cDNA Synthesis Kit

Catalog #	Description
1708890	iScript cDNA Synthesis Kit, 25 x 20 µl reactions
1708891	iScript cDNA Synthesis Kit, 100 x 20 µl reactions

For research purposes only.

Introduction

iScript cDNA Synthesis Kit provides a sensitive and easy-to-use solution for two-step reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). This kit includes three tubes, which contain all the reagents required for successful reverse transcription.

The iScript Reverse Transcriptase is RNase H⁻, which provides greater sensitivity than RNase H⁺ enzymes in qPCR. iScript is a modified Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase, optimized for reliable cDNA synthesis over a wide dynamic range of input RNA. The enzyme is provided preblended with RNase inhibitor. The unique blend of oligo(dT) and random hexamer primers in the iScript Reaction Mix works exceptionally well with a wide variety of targets. This blend is optimized for the production of targets <1 kb in length. iScript cDNA Synthesis Kit produces excellent results in both real-time and standard RT-qPCR.

Storage and Stability

Store at -20°C. Guaranteed for 12 months at -20°C in a constant temperature freezer. Nuclease-free water can be stored at room temperature.

Note: Kits whose six-digit lot number begins with a 2 are not compatible with kits whose six-digit lot number begins with a 1. Please make note of this distinction if you have multiple lots of this kit in storage.

Kit Contents

Reagent	Volume for 25 Reactions	Volume for 100 Reactions
5x iScript Reaction Mix	100 µl	400 µl
iScript Reverse Transcriptase	25 µl	100 µl
Nuclease-free water	1.5 ml	1.5 ml

Reaction Setup

Note: The 5x iScript Reaction Mix may generate some precipitation upon thawing; this does not affect the quality of the mixture. If you do experience precipitation, please mix thoroughly to resuspend and use as directed in the following table.

Component	Volume per Reaction, µl
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nuclease-free water	Variable
RNA template (100 fg–1 µg total RNA)*	Variable
Total volume	20

*When using larger amounts of input RNA (>1 µg), the reaction should be scaled up (for example, 40 µl reaction for 2 µg, or 100 µl reaction for 5 µg) to ensure optimum synthesis efficiency.

Reaction Protocol

Incubate the complete reaction mix in a thermal cycler using the following protocol:

Priming	5 min at 25°C
Reverse transcription	20 min at 46°C
RT inactivation	1 min at 95°C
Optional step	Hold at 4°C

Recommendation for Optimal Results Using the iScript cDNA Synthesis Kit

The maximum amount of the cDNA reaction that is recommended for downstream PCR is one-tenth of the reaction volume, typically 2 µl.

Related Products

Catalog #	Description
Reverse Transcription Reagents for Real-Time qPCR	
1708840	iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR
1725037	iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR
1708896	iScript Select cDNA Synthesis Kit
1725034	iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit
Reagents for Real-Time qPCR	
1725270	SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
1725280	SsoAdvanced Universal Probes Supermix
1725120	iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix
1725130	iTaq Universal Probes Supermix
1725160	SsoAdvanced ProAmp Supermix

Visit bio-rad.com/web/iscriptcDNA for more information.